

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2022.



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

ANÁLISE FUNCIONAL DO microRNA-1914-5p NO METABOLISMO LIPÍDICO E ASSOCIAÇÃO COM O PROCESSO PRÓ-ESTEATÓTICO EM HEPATÓCITOS HUMANOS.

LETÍCIA FERREIRA RAMOS

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

Fevereiro - 2020

ANÁLISE FUNCIONAL DO microRNA-1914-5p NO METABOLISMO LIPÍDICO E ASSOCIAÇÃO COM O PROCESSO PRÓ-ESTEATÓTICO EM HEPATÓCITOS HUMANOS.

Letícia Ferreira Ramos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Cristiane Martinez de Moraes

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

Fevereiro – 2020

R175a	Ramos, Letícia Ferreira Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e associação com o processo pró-esteatótico em hepatóticos humanos. / Letícia Ferreira Ramos. -- Rio Claro, 2020 166 f. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes 1. Esteatose hepática. 2. Células HepG2. 3. Metabolismo lipídico. 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 DISSERTAÇÃO: Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e sua correlação com o processo pró-esteatótico em hepatócitos humanos.

AUTORA: LETÍCIA FERREIRA RAMOS

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO APARECIDO DOS SANTOS PINTO
Pós Doutorando do PPGCB (Biologia Celular e Molecular) / IB Rio Claro



Prof. Dr. WILLIAM TADEU LARA FESTUCCIA
Departamento de Fisiologia e Biofísica / Universidade de São Paulo



Rio Claro, 27 de fevereiro de 2020

Título alterado para: "Análise funcional do micro RNA 1914-5p no metabolismo lipídico e associação com o processo pró-esteatótico em hepatócitos humanos"

Dedico essa pesquisa ao meu companheiro de vida, Jonathan.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Mirian e José Augusto e ao meu irmão, Lucas, por todo o amor, incentivo e apoio incondicional. Ao meu noivo, Jonathan William, por estar sempre ao meu lado, como melhor amigo e confidente, pela compreensão nos momentos difíceis, pela motivação nos momentos necessários e pelo compartilhamento de amor e alegrias.

À professora Dr^a Karen, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de crescimento e amadurecimento profissional, pelos ensinamentos proporcionados.

Agradeço aos membros do Grupo de Pesquisa Terapia do RNA do Laboratório de Biologia Molecular – UNESP, Rio Claro: Marina, Priscila, Caio, Thaís, Camila, Lúgia e Lara pela paciência, pelo conhecimento compartilhado e pela convivência diária.

Agradeço à Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Biologia e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular). Agradeço àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa, Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, Prof. Dr. Osmar Malaspina, Prof^a. Dr^a Maria Aparecida Marin Morales, Prof. Dr. Giovani Gozzi, Dr^a. Bibiana Monson de Souza e Sebastião Zanão Filho.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2018/05286-3.

*“Metade dos problemas da vida decorre de dizer
sim depressa demais e não dizer não cedo o
bastante.”*

Josh Billings

RESUMO

Devido ao estilo de vida da população, os casos de doenças gordurosas hepáticas assumem proporções alarmantes, caracterizando-as como um grave problema de saúde pública. A esteatose hepática é definida pelo acúmulo de triglicerídeos e ésteres de colesterol em mais de 5% do peso total do órgão. Essa doença geralmente aparece associada com a resistência à insulina, obesidade, diabetes do tipo 2 e outras síndromes metabólicas como dislipidemias. O acúmulo lipídico ocorre pelo desequilíbrio entre a aquisição e a liberação lipídica, processos regulados pela absorção de lipídeos circulantes, lipogênese *de novo*, oxidação de ácidos graxos e exportação de lipídeos. Esse desbalanço metabólico no uso das fontes energéticas pode acarretar quadros clínicos mais graves tais como esteatohepatite, cirrose e até mesmo o hepatocarcinoma. A prevalência mundial de casos de esteatose hepática é de 25% da população. Nesse contexto, o estudo das particularidades moleculares do metabolismo lipídico e sua correlação com o desenvolvimento do quadro hepático esteatótico assume posição de destaque, considerando-se que um tratamento eficaz para a reversão ou controle da esteatose ainda não está disponível. Paralelamente, nos últimos anos, microRNAs vêm sendo apontados como elementos reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional e estudos apontam a utilização deles no desenvolvimento de terapias inovadoras e diagnósticos não-invasivos. Dentro desse contexto, o microRNA-1914-5p se destaca pela sua atuação funcional na modulação de elementos centrais do metabolismo lipídico em células estreladas hepáticas, reforçando seu papel no metabolismo hepático. Assim sendo, a funcionalidade do microRNA-1914-5p foi estudada no processo pró-esteatótico em linhagem de hepatócitos HepG2. Para isso, o estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico, análises de perfil lipídico e dos níveis transcricionais de genes envolvidos no metabolismo lipídico e análise proteômica foram realizados. Nas células onde há um aumento da quantidade do microRNA-1914-5p, há um aumento no acúmulo lipídico e nos níveis transcricionais de genes importantes da lipogênese *de novo*. Por sua vez, a inibição do microRNA-1914-5p também apresenta aumento no acúmulo lipídico, mas não há grandes modulações em genes importantes nesse processo. Além disso, as análises proteômicas indicam vias de metabolismo energético e vias epigenéticas ativadas em ambos, sendo que a inibição do microRNA-1914-5p apresenta proteínas com funções sistêmicas opostas. Dessa forma, é possível observar que o aumento do microRNA-1914-5p pode piorar o quadro pró-esteatótico, enquanto a inibição dele estaria atuando na manutenção do quadro. Nesse contexto, os resultados obtidos indicam que o microRNA-1914-5p é um importante regulador da lipogênese *de novo* no metabolismo lipídico.

Palavras-chave: Esteatose hepática. Células HepG2. Metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Due to the lifestyle of the population, cases of fatty liver disease assume alarming proportions, characterizing them as a serious public health problem. Liver steatosis is defined by the accumulation of triglycerides and cholesterol esters in more than 5% of the total weight of the organ. This disease usually appears associated with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes and other metabolic syndromes such as dyslipidemias. Lipid accumulation occurs due to the imbalance between lipid acquisition and release, processes regulated by the absorption of circulating lipids, lipogenesis *de novo*, oxidation of fatty acids and export of lipids. This metabolic imbalance in the use of energy sources can lead to more severe clinical conditions such as steatohepatitis, cirrhosis and even hepatocarcinoma. The worldwide prevalence of cases of hepatic steatosis is 25% of the population. In this context, the study of the molecular peculiarities of lipid metabolism and its correlation with the development of the steatotic liver condition assumes a prominent position, considering that an effective treatment for the reversal or control of steatosis is not yet available. In parallel, in recent years, microRNAs have been identified as regulatory elements of gene expression at the post-transcriptional level and studies have pointed out their use in the development of innovative therapies and non-invasive diagnoses. Within this context, microRNA-1914-5p stands out for its functional role in modulating central elements of lipid metabolism in hepatic stellate cells, reinforcing its role in hepatic metabolism. Therefore, the functionality of microRNA-1914-5p was studied in the pro-steatotic process in HepG2 hepatocyte lineage. For this, the establishment of a pro-steatotic cell model, analyzes of lipid profile and transcriptional levels of genes involved in lipid metabolism and proteomic analysis were performed. In cells where there is an increase in the amount of microRNA-1914-5p, there is an increase in lipid accumulation and in the transcriptional levels of *de novo* lipogenesis genes. In turn, the inhibition of microRNA-1914-5p also shows an increase in lipid accumulation, but there are no major modulations in important genes in this process. In addition, proteomic analysis indicates energy metabolism pathways and epigenetic pathways activated in both, and the inhibition of microRNA-1914-5p presents proteins with opposite systemic functions. Thus, it is possible to observe that the increase in microRNA-1914-5p may worsen the pro-steatotic condition, while its inhibition would be acting in maintaining the condition. In this context, the results obtained indicate that microRNA-1914-5p is an important regulator of lipogenesis *de novo* in lipid metabolism.

Keywords: Liver steatosis. HepG2 cells. Lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema histológico do fígado. HSC – células estreladas hepáticas, KC – células de Kupffer.....	22
Figura 2. Lipogênese <i>de novo</i> hepática.....	27
Figura 3. Via canônica e não-canônica da biogênese dos microRNAs.....	32
Figura 4. Modelo experimental 1. Neste modelo, após 24 horas de cultivo celular, foi adicionado a mistura de ácidos graxos, 48 horas após o início do cultivo o meio contendo AGs foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a transfecção celular foi realizada. Oito (8) horas após a transfecção, a mesma concentração de AGs foi adicionada (400 μ M) e as células foram coletadas para ensaios após 72 horas de cultivo.....	36
Figura 5. Modelo experimental 2. Neste modelo experimental, as células foram transfectadas com o miRNA após 24 horas de cultivo. Ao completar 24 horas de transfecção celular, foram adicionados 400 μ M da mistura de AGs e 24 horas após as células foram coletadas para os experimentos posteriores.....	36
Figura 6. Ensaio de viabilidade celular. A) Células cultivadas na presença de AGs por um intervalo de 24 horas. B) Células cultivadas na presença de AGs por um intervalo de 48 horas. Gráficos do cocultivo HepG2+LX-2; HepG2 isolada e LX-2 isolada, apresentados respectivamente. Células cultivadas em 10% de SBF (controle), 800 μ M, 600 μ M, 400 μ M e 200 μ M de AGs. Os resultados foram submetidos à análise estatística <i>One Way ANOVA</i> , seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.....	54
Figura 7. Ensaio enzimático colorimétrico de triglicerídeos. A) Células HepG2+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. B) Células HuH7+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística <i>One Way ANOVA</i> , seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.....	55
Figura 8. Ensaio enzimático colorimétrico de colesterol total. A) Células HepG2+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. B) Células HuH7+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística <i>One Way ANOVA</i> , seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.....	56
Figura 9. Análise de expressão dos níveis transcricionais de <i>fasn</i> , <i>mlycd</i> , <i>acc1</i> , <i>acc2</i> , <i>ppary</i> , <i>ppara</i> e <i>srebp1</i> . Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo	

experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 57

Figura 10. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *ppary*, *ppara* e *srebp1*. Células HuH7+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 58

Figura 11. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *acsl4* e *acsl5*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 60

Figura 12. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1*, *atgl*, *srebp1*, *ppara*, *ppary*, *cpt1a* e *cpt2*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 61

Figura 13. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 63

Figura 14. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acc2*, *acsl4*, *acsl5* e *srebp1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 64

Figura 15. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1*, *dgat2*, *atgl* e *scd1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 66

Figura 16. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *pparα*, *ppary*, *cpt1a* e *cpt2*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde ****p*<0,0005, ***p*<0,005 e **p*<0,05 em comparação com o controle..... 67

Figura 17. Análise de eficiência de transfecção através de microscopia de fluorescência com *BLOCK-iT™ Alexa Fluor®*. A) Células HepG2 transfectadas com 40 nM antes da adição dos AGs – modelo experimental 2. B) Células HepG2 transfectadas com 40 nM depois da adição dos AGs – modelo experimental 1. C) Gráfico quantitativo de células HepG2 transfectadas antes e depois da adição da mistura de AGs. Núcleos celulares marcados em azul (DAPI) e microRNA transfectado marcado em vermelho (*BLOCK-iT™ Alexa Fluor®*)..... 69

Figura 18. Níveis relativos do miRNA-1914-5p em células HepG2+LX2 cultivadas com 10% SBF (controle), cultivadas em 400 μM de AGs e transfectadas com 40 nM de moléculas mímicas do miRNA-1914-5p e 40 nM de moléculas inibidoras do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One way ANOVA* seguido pelo teste de Dunnett, onde ****p*<0.0005, ***p*<0.005, **p*<0.05 em comparação com o controle..... 71

Figura 19. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2* e *acsl4*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde ****p*<0,0005, ***p*<0,005 e **p*<0,05 em comparação com o controle..... 72

Figura 20. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1*, *atgl*, *gpat1* e *scd1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde ****p*<0,0005, ***p*<0,005 e **p*<0,05 em comparação com o controle..... 73

Figura 21. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *srebpl*, *pparα*, *ppary*, *cpt1a*, *cpt2* e *cs*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde ****p*<0,0005, ***p*<0,005 e **p*<0,05 em comparação com o controle..... 74

Figura 22. Níveis relativos do miRNA-1914-5p em células HepG2 cultivadas com 10% SBF (controle), cultivadas em 400 μM de AGs e transfectadas com 40 nM de moléculas mímicas do miRNA-1914-5p e 40 nM de moléculas inibidoras do miRNA-1914-5p. Os resultados foram

submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 77

Figura 23. Ensaio enzimático colorimétrico de triglicerídeos. Células HepG2 cultivadas com 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs, transfectadas com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfectadas com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 79

Figura 24. Ensaio enzimático colorimétrico de colesterol total. Células HepG2 cultivadas com 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs, transfectadas com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfectadas com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 80

Figura 25. Análise de gotículas lipídicas por microscopia de campo claro. A) Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Gotículas lipídicas marcadas em vermelho por *Oil Red O*, núcleo celular em roxo marcado com hematoxilina de Harris. B) Gráfico da quantidade de gotículas lipídicas presentes por célula em pixel. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 82

Figura 26. Análise de lipídeos totais por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A) Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. B) Espectro de absorção das células HepG2. Seta indicativa dos picos correspondentes à absorção lipídica. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 84

Figura 27. Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 87

Figura 28. Análise de espécies reativas de oxigênio (EROs). Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μM da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de cópia do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 88

Figura 29. Análise de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF, 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de mimico do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 90

Figura 30. Análise de viabilidade celular. Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de mimico do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 91

Figura 31. Via da síntese *de novo* e da formação de triacilglicerol..... 92

Figura 32. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1* e *acc2*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 94

Figura 33. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acsl4*, *acsl5*, *gpat1* e *gpat3*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 97

Figura 34. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *agpat1*, *agpat2*, *agpat3*, *lpin1*, *lpin2* e *lpin3*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 99

Figura 35. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1* e *dgat2*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 100

Figura 36. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *atgl*, *hsl* e *magl*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-

5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 102

Figura 37. Esquema ilustrativo da β -oxidação. AGCML – ácido graxo de cadeia muito longa, AGCC – ácido graxo de cadeia curta..... 103

Figura 38. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *cpt1a*, *cpt2* e *cs*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o cómiico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 104

Figura 39. Via de alongamento e dessaturação de ácidos graxos. PoA – ácido palmitoleico, cVA – ácido vacênico cis, PA – ácido palmítico, SA – ácido esteárico, ArA – ácido eicosanoico, BA – ácido docosanoico, OA – ácido oleico, GA – ácido gondoico, EA – ácido erúico e NA – ácido nervônico..... 105

Figura 40. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *scd1* e *cidec*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o cómiico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 106

Figura 41. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *srebp1c*, *chrebp*, *ppara* e *ppary*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o cómiico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 109

Figura 42. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *lxra*, *lxr β* , *rxra*, *apob*, *cd36* e *fgf21*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o cómiico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 112

Figura 43. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *pepck1* e *g6pc*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o cómiico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle..... 114

Figura 44. Análise de expressão dos níveis transcricionais de lc3, atg5 e atg7. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística <i>One Way ANOVA</i> , seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.....	115
Figura 45. Distribuição das proteínas identificadas em funções moleculares nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.....	120
Figura 46. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.....	120
Figura 47. Distribuição das proteínas identificadas nas funções moleculares de ligação e atividade catalítica encontradas nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.....	121
Figura 48. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico de processo metabólico encontrado nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.....	122
Figura 49. Distribuição das proteínas identificadas em funções moleculares nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.....	130
Figura 50. Distribuição das proteínas identificadas em processos biológicos nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.....	130
Figura 51. Distribuição das proteínas identificadas nas funções moleculares de atividade catalítica encontradas nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.....	131
Figura 52. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico de processo metabólico e processo celular encontrado nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.....	132
Figura 53. Atuação funcional do miRNA-1914-5p mímico e inibidor na lipogênese de novo. Em laranja genes que apresentaram um aumento em seu nível transcricional.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\psi$	Potencial de membrana mitocondrial
ACADS	<i>Short-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACLY	Adenosina trifosfato citrato liase
ACN	Acetonitrila
ACS	Acil-CoA sintetase
ACSL	Acil-CoA sintetase de cadeia longa
AFLD	Esteatose hepática alcoólica
AGO	Argonauta
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase
AGs	Ácidos graxos
AKT1	RAC α serina/treonina quinase
ApoB	Apolipoproteína B
AR	Receptor de andrógeno
ATAD2B	<i>ATPase Family AAA domain-containing protein 2B</i>
ATG	Proteína relacionada à autofagia
ATGL	Lipase triglicerídica adiposa
ATP	Adenosina trifosfato
ATP5B	<i>ATP synthase subunit beta</i>
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CD36	Ácido graxo translocase
cDNA	DNA complementar
CES1	<i>Liver carboxylesterase 1</i>
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo à carboidrato
CIC	Transportador mitocondrial de citrato
CIDEC	Efector C indutor de morte celular semelhante à DFFA
CPTs	Carnitinas palmitoiltransferases
CS	Citrato sintase
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DGCR8	<i>Di George syndrome critical region gene 8</i>
DLD	<i>Dihydrolipoamide dehydrogenase</i>

DLG5	<i>Discs large homolog 5</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELOVL	Elongadora de cadeias muito longas de ácidos graxos 1-7
ER	Receptor de estrógeno
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Exp-5	Exportina 5
FABPs	Proteínas ligadoras de ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
FATPs	Proteínas transportadoras de ácido graxo
FGF21	Fator de crescimento de fibroblasto 21
FH	<i>Fumarate hydratase</i>
FOXJ2	<i>Forkhead box J2</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G6PC	Glicose-6-fosfatase subunidade catalítica
G6PD	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HDACs	Desacetilase de histona
HSC	Células estreladas hepáticas
HSL	Lipase sensível ao hormônio
IAA	Iodoacetamida
IL6	Interleucina 6
KC	Células de Kupffer
KOH	Hidróxido de potássio
LC3	Proteína relacionada à autofagia LC3 A
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPIN	Lipina

LXRs	Receptores hepáticos X
MAGL	Lipase de monoacilglicerol
MCP1	Proteína de quimioatração de monócitos
MiR	MicroRNA
MiRNA	MicroRNA
MLYCD	Malonil-CoA descarboxilase
MS	Espectrometria de massas
mTOR	Proteína alvo da Rapamicina
MTT	3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide
NAD⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAFLD	Esteatose hepática não-alcoólica
NASH	Esteato-hepatite não-alcoólica
NASP	<i>Nuclear autoantigenic sperm protein</i>
NCOA4	<i>Nuclear receptor coactivator 4</i>
NCOR2	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>
NFκB	Fator nuclear κ B
NLRX1	<i>NOD-like receptor X1</i>
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Piruvato carboxilase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGC1α	Coativador 1 α de PPAR γ
PIKKs	Proteínas quinases relacionadas com fosfatidilinositol 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNPLA3	Fosfolipase patatina-como proteína contendo o domínio 3
PPARGC1B	Receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama coativador 1 b
PPARs	Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos
PRKDC	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
PSMA6	<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
RISC	Complexo indutor de silenciamento de RNA
RPS3	<i>Ribosomal protein S3</i>
RXR	Receptor de retinoide X

SBF	Soro bovino fetal
SCD1	Estearoil-CoA dessaturase
SMG1	<i>Serine/threonine protein kinase</i>
SREBP1	Proteína 1 de ligação ao elemento regulatório de esterol
TCA	Ciclo do ácido cítrico
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Triacilglicerol
TGFβ	Fator transformador de crescimento
TIAM1	<i>T cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TR	Receptor de hormônio tireoideano
UCKL1	Uridina-citidina quinase-like 1
UFLC	Cromatógrafo líquido ultrarrápido
VLCAD	<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</i>
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa
VTN	Vitronectina
ZNF366	<i>Zinc finger 366</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.	21
1.1	O fígado e as doenças hepáticas.	21
1.2	A esteatose hepática e a correlação com o metabolismo lipídico.	25
1.3	MicroRNAs e a modulação na homeostase celular hepática.	30
2	OBJETIVOS.	34
2.1	Objetivos gerais.	34
2.2	Objetivos específicos.	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.	35
3.1	Estabelecimento do modelo pró-esteatótico.	35
3.2	Microscopia de fluorescência: <i>BLOCK-iT™ Alexa Fluor®</i> .	36
3.3	Cultivo celular, transfecção e indução do processo pró-esteatótico.	37
3.4	Análise de perfil lipídico: mensuração de triacilgliceróis e colesterol total.	38
3.5	Análise de perfil lipídico: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).	40
3.6	Análise de perfil lipídico: microscopia de campo claro com <i>Oil Red O</i> .	40
3.7	Análise de perfil lipídico: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).	41
3.8	Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROS).	42
3.9	Mensuração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).	42
3.10	Análise de níveis transcricionais.	43
3.10.1	Extração de RNA total.	43
3.10.2	Transcrição reversa de RNA total.	44
3.10.3	Extração de miRNA.	44
3.10.4	Transcrição reversa de miRNA.	45
3.10.5	Análise de expressão dos níveis transcricionais por reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR).	45
3.10.6	Análise de expressão diferencial por qPCR: miRNA-1914-5p.	48
3.11	Análise proteômica.	49
3.12	Análise bioinformática.	51
3.13	Análise estatística.	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO I - O modelo pró-esteatótico.	52
4.1	A escolha da concentração de ácidos graxos.	52
4.2	Análises lipídicas das linhagens hepáticas.	55
4.3	Análise de expressão gênica das linhagens hepáticas.	56
4.4	Padronização das concentrações de moléculas mímicas e inibidoras do miRNA-1914-5p no modelo experimental.	59

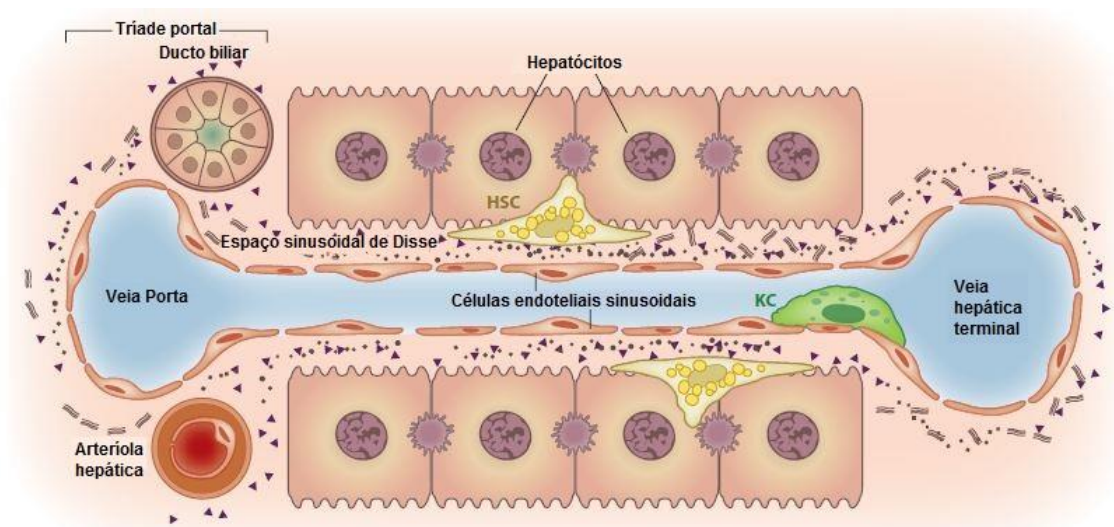
4.5 Análise da atuação funcional do miRNA-1914-5p no modelo celular.	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO II – Análises celulares e moleculares da pró-esteatose na linhagem celular HepG2.....	77
5.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miRNA: mensuração dos níveis do miRNA-1914-5p em células HepG2.	77
5.2 Análise do perfil lipídico.	78
5.2.1 Análise do perfil lipídico: mensuração de triacilgliceróis e colesterol total.	78
5.2.2 Análise do perfil lipídico: microscopia de campo claro com marcação de gotículas lipídicas por Oil Red O.....	80
5.2.3 Análise de lipídeos totais através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	82
5.2.4 Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	84
5.3 Análises de estresse oxidativo e de disfunção mitocondrial.....	88
5.4 Análise de viabilidade celular.....	90
5.5 Análise dos níveis transcricionais de genes correlatos ao metabolismo lipídico.....	91
5.5.1 Síntese de novo e formação de triacilglicerol.	92
5.5.2 Degradação de ácidos graxos por lipases e pela β -oxidação.....	101
5.5.3 Dessaturação de ácidos graxos e mobilização lipídica.	105
5.5.4 Fatores de transcrição e receptores nucleares.	107
5.5.5 Gliconeogênese.....	113
5.5.6 Autofagia.	114
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO III – Análise proteômica da linhagem HepG2.....	116
7 CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
APÊNDICE	156

1 INTRODUÇÃO.

1.1 O fígado e as doenças hepáticas.

O fígado, considerado a maior glândula e o segundo maior órgão do nosso organismo, possui uma arquitetura em lóbulos hexagonais, que permite o desempenho de muitas funções importantes no equilíbrio celular e na homeostase do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RUI, 2014; TARASENKO; MCGUIRE, 2017). Dentre as funções metabólicas mais importantes estão a metabolização de carboidratos, aminoácidos e gorduras, a oxidação de ácidos graxos, o controle dos níveis de colesterol, a ureagênese e a desintoxicação de resíduos endógenos e xenobióticos. Além disso, por receber 30% do volume sanguíneo total por minuto, o fígado também pode atuar como imunovigilante, sendo também conhecido pela produção de proteínas de fase aguda em respostas inflamatórias, além de dar suporte aos sistemas digestório e hematopoiético (KOO, 2013; GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015; ROBINSON; HARMON; O'FARRELLY, 2016; PREZIOSI; MONGA, 2017; TARASENKO; MCGUIRE, 2017). Os processos que resultam nas 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). Particularmente, o fígado é constituído pelos hepatócitos (células epiteliais, que constituem 80% do volume do órgão), pelas células endoteliais e pelas células não-parenquimatosas associadas ao fígado que incluem as células de Kupffer (KC), células dendríticas e células estreladas hepáticas (HSC) (Figura 1) (SENOO *et al.*, 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015). Considerando ser o órgão de maior exposição tóxica do organismo, o fígado possui uma capacidade única de se regenerar. Entretanto, uma constante exposição tóxica pode suplantiar a capacidade regenerativa e auxiliar no desenvolvimento de diversas doenças hepáticas (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015; PREZIOSI; MONGA, 2017).

Figura 1. Esquema histológico do fígado. HSC – células estreladas hepáticas, KC – células de Kupffer.



Adaptado de Hernandez-Gea; Friedman (2011).

Infelizmente, o número de pessoas acometidas pelos problemas hepáticos é crescente, o que se caracteriza como grave problema de saúde pública e responsável pela nona causa de morte em países de renda média-baixa e média-alta (WHO, 2016). As doenças hepáticas, entre as quais as hepatites virais, esteatoses, cirrose e hepatocarcinoma, podem ser decorrentes de injúrias oriundas de diferentes etiologias tais como pela ação de vírus, álcool, má alimentação, desordens metabólicas, parasitas, toxicidade por drogas, entre outros, mas que apresentam como característica comum o desenvolvimento de quadros de fibrose hepática (ZHAO *et al.*, 2014; BATALLER; GAO, 2015; WALLACE; MANN; FRIEDMAN, 2015).

A esteatose hepática, também denominada como doença gordurosa do fígado, é definida quando mais que 5% do peso total do órgão é correspondente à triglicerídeos e ésteres de colesterol. Geralmente, aparece associada com a resistência à insulina, obesidade, diabetes do tipo 2 e/ ou com outras anormalidades metabólicas como dislipidemia. O acúmulo de lipídeos ocorre em associação com a injúria lipotóxica causada por elevados ácidos graxos livres, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos no tecido hepático. Ademais, outros mecanismos podem ser ativados como a disfunção mitocondrial com o estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático (FERRAMOSCA; ZARA, 2014; ENOMOTO *et al.*, 2015; ANANIA *et al.*, 2018; CAI; ZHANG; LI, 2018). Antigamente, a esteatose era conhecida por ser ocasionada exclusivamente pelo consumo excessivo de álcool. Entretanto, atualmente é de

conhecimento que vários tipos de estímulos podem resultar na resposta metabólica encontrada nessa condição. Sendo assim, atualmente ela é dividida em esteatose hepática alcoólica (*alcoholic fatty liver disease* - AFLD) e esteatose hepática não-alcoólica (*non-alcoholic fatty liver disease* - NAFLD) (WOBSER *et al.*, 2009; LAKSHMAN *et al.*, 2015). A estimativa mais precisa da prevalência de casos de NAFLD e esteatohepatite não-alcoólica (*non-alcoholic steatohepatitis* – NASH) no mundo é de 24% a 25% da população mundial, sendo que de acordo com Younossi *et al.* (2016) e Younossi *et al.* (2017) as maiores taxas estão presentes na América do Sul (31%) e no Oriente Médio (32%), seguidos pela Ásia (27%), Estados Unidos da América (24%) e Europa (23%) (ARAÚJO *et al.*, 2018; CAI; ZHANG; LI, 2018).

A presença de NAFLD em adultos, crianças e adolescentes e a possibilidade da piora do quadro clínico do paciente, que pode progredir a quadros de cirrose e até hepatocarcinoma demonstra a importância de pesquisas nessa área, considerando-se que detalhes dos mecanismos responsáveis pela patogênese ainda não estão completamente esclarecidos (FERRAMOSCA; ZARA, 2014; ANANIA *et al.*, 2018). Antigamente, entendia-se que o desenvolvimento da NAFLD se dava por uma teoria nomeada de dois *hits* ou etapas. Nessa teoria, a primeira etapa seria representada pela sensibilização do órgão ocasionado pelo aumento da gordura hepática através do acúmulo de triglicerídeos e resistência à insulina. A segunda etapa incluiria a ação de citocinas inflamatórias, adipocinas, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, podendo ocorrer o desenvolvimento de necroinflamação e fibrogênese. Entretanto, com as tecnologias e estudos atuais, os pesquisadores entenderam que essa teoria é muito simplista para o esclarecimento da progressão complexa da patologia e uma nova teoria foi estabelecida (BETTERMAN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014; BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; FANG *et al.*, 2018). A teoria de múltiplos *hits* ou etapas indica que fatores ambientais agem em conjunto com predisposições genéticas para a indução de NAFLD. Essas etapas podem incluir como fatores o acúmulo de gordura, a resistência à insulina, ativação de vias inflamatórias, a secreção de hormônios do tecido adiposo, fatores nutricionais, microbiota intestinal e fatores genéticos e epigenéticos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; CAI; ZHANG; LI, 2018; FANG *et al.*, 2018; SELVAKUMAR; KABBANY; ALKHOURI, 2018). Dentre esses fatores, a resistência à insulina se destaca como um dos fatores chave auxiliando na diminuição da lipogênese *de novo* e aumentando a lipólise

do tecido adiposo, dessa forma, aumentando o fluxo de ácidos graxos para o fígado (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Além disso, a presença de mecanismos inflamatórios, como o perfil alterado de adipocinas, a alta produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α), da proteína de quimioatração de monócitos (MCP1) e de interleucina 6 (IL6), em conjunto com o início de uma resposta fibrosante no tecido leva a progressão de um quadro de NAFLD para um quadro de NASH (ROSSO *et al.*, 2014). Um ponto que ambas as teorias do desenvolvimento de NAFLD têm em comum é o entendimento que a simples esteatose é a base para o desenvolvimento e progressão de NASH (BETTERMANN; HOHENSEE; HAYBAECK, 2014).

No Brasil, a mudança no estilo de vida populacional aumentou o número da prevalência de obesos. Junto a isso, a cultura brasileira de consumo alcoólico pode acarretar alta predisposição ao desenvolvimento dessas doenças hepáticas crônicas como esteatose (NADER; MATTOS; BASTOS, 2014; BARROS *et al.*, 2017). A obesidade é considerada por muitos como o principal fator desencadeador de doenças gordurosas hepáticas e vários estudos demonstram essa alta correlação entre a obesidade e a presença de NAFLD/NASH (SEIXAS, 2010; ARSLAN, 2014; COREY; KAPLAN, 2014; CHALASANI *et al.*, 2017; BARROS *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.* 2018; ANANIA *et al.*, 2018). Além disso, a presença de NAFLD e NASH aumenta o risco do desenvolvimento de doenças cardiometabólicas; e crianças e adolescentes que apresentam a esteatose, tem um aumento no risco de morte ou necessidade de transplante 14 vezes maior na vida adulta (CAI; ZHANG; LI, 2018; UTZ-MELERE *et al.*, 2018). Estudos ainda apontam que a maioria dos pacientes com quadros de doença hepática gordurosa primária podem desenvolver uma piora no quadro clínico, com o aparecimento de fibrose e cirrose, que podem aumentar as taxas de mortalidade (SEIXAS, 2010; STAL, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2018).

Apesar de ter uma incidência global e uma grande importância médica, o diagnóstico de NAFLD pode se basear em técnicas de imagem ou mais precisamente pela biópsia do fígado. A biópsia hepática consiste no diagnóstico mais completo, entretanto, não é facilmente aceita pelos pacientes e por alguns médicos. Ademais, não é de consenso geral em como realizar o melhor tratamento farmacológico da esteatose. Atualmente, intervenções no estilo de vida do paciente são o pilar para manutenção do quadro. Assim sendo, uma nutrição balanceada e a perda moderada de peso são considerados a melhor abordagem terapêutica (ROMERO-

GOMÉZ; ZELBER-SAGI; TRENELL, 2017; ANANIA *et al.*, 2018; DUMITRASCU; NEUMAN, 2018). Nesse contexto, investigar aspectos celulares e moleculares do processo esteatótico e sua correlação com o metabolismo lipídico é pertinente na busca de um melhor detalhamento molecular e sistêmico.

1.2 A esteatose hepática e a correlação com o metabolismo lipídico.

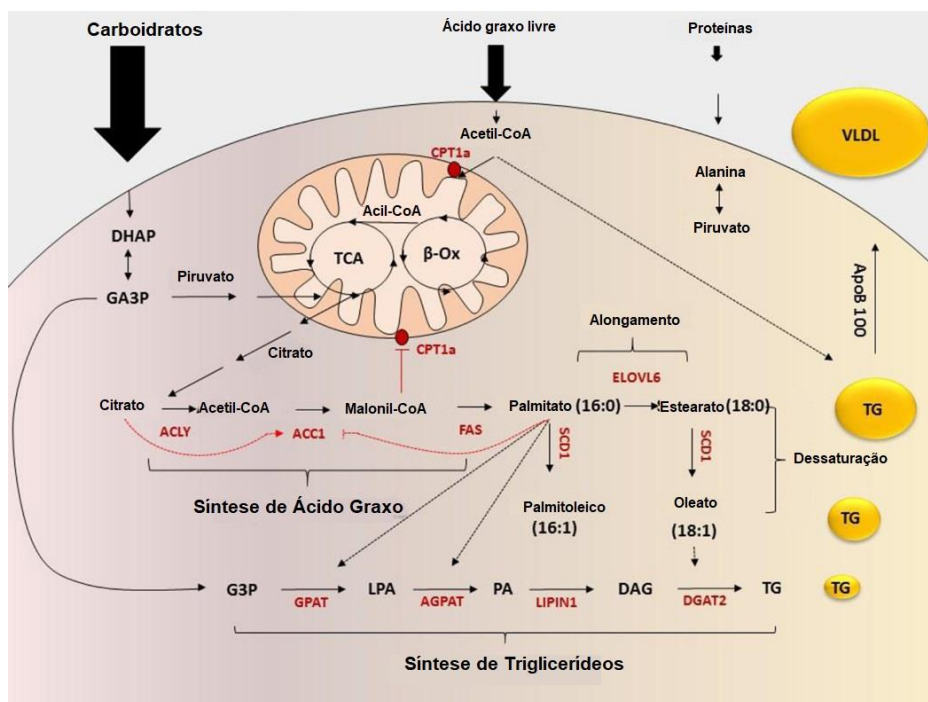
O fígado controla diversos aspectos do metabolismo e no que se refere ao metabolismo de lipídeos, o órgão assume posição ímpar, considerando sua função principal na síntese de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, na produção de corpos cetônicos, na formação de triacilgliceróis para originar apolipoproteínas específicas como lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e na oxidação dos ácidos graxos (SILVERTHORN, 2010; NELSON; COX, 2014). Quando há um desbalanço metabólico crônico, quando o órgão enfrenta por um tempo prolongado altas quantidades lipídicas oriundas da alimentação ou alta quantidade de acetil-CoA proveniente do metabolismo do álcool, podem-se estabelecer as doenças gordurosas hepáticas (MOUSTAFA *et al.*, 2012; JUÁREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

Os ácidos graxos (AGs) se apresentam em estruturas diversas que variam de ácidos graxos simples saturados a moléculas complexas. Podem atuar como moldes biológicos em paredes e membranas celulares, além de atuarem em vários processos celulares importantes como homeostase energética, proliferação celular, modificação proteica por fosforilação e ubiquitinação, regulação da atividade de fatores de transcrição e sinalização em diferentes processos celulares através de metabólitos primários e secundários como biotina, ácido lipoico, entre outros (JUMP; TRIPATHY; DEPNER, 2013; BELD; LEE; BURKART, 2015; JUÁREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). O fígado obtém os ácidos graxos livres de três diferentes fontes: a absorção de ácidos graxos livres do sangue, a absorção de remanescentes de quilomícrons e/ou da lipogênese *de novo* (CANBAY; BECHMANN; GERKEN, 2007; MASHEK, 2013; NASSIR *et al.*, 2015; PERLA *et al.*, 2017). O acúmulo de lipídeos no fígado ocorre pelo desequilíbrio entre a aquisição e a liberação lipídica, processos que são regulados pela absorção de lipídeos circulantes, lipogênese *de novo*, oxidação de ácidos graxos e a exportação de lipídeos em forma de VLDL (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). A

absorção dos ácidos graxos ocorre através do transporte de proteínas transportadoras de ácido graxo (FATPs), pela ácido graxo translocase (CD36) ou por difusão. Por sua vez, a movimentação dos ácidos graxos no interior celular ocorre pelo auxílio das proteínas ligadoras de ácido graxo (FABPs). Dentro da lipogênese *de novo*, ao comparar pacientes com acúmulo lipídico e pacientes saudáveis, os primeiros apresentam porcentagem maior do processo realizado no fígado (NASSIR *et al.*, 2015). O processo de obtenção dos ácidos graxos é dividido em três etapas: a síntese de ácidos graxos, o alongamento e dessaturação dos ácidos graxos e a produção de triglicerídeos (KOO, 2013; NASSIR *et al.*, 2015; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Em condições normais, as células hepáticas utilizam o piruvato, para alimentar o ciclo do ácido cítrico (TCA) na mitocôndria. No interior celular, a piruvato desidrogenase atua convertendo o piruvato em acetil-CoA, que pode ser utilizado para a produção de energia. Entretanto, quando o armazenamento energético está completo, ocorre acúmulo de citrato dentro da mitocôndria. Esse citrato é transportado para o citoplasma e convertido em acetil-CoA pela enzima adenosina trifosfato citrato liase (ACLY), sendo esse o primeiro passo para a síntese de ácido graxo endógena (Figura 2) (NASSIR *et al.*, 2015; RÖHRIG; SCHULZE, 2016; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Além disso, o citrato é ativador alostérico da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que é responsável pela conversão de acetil-CoA em malonil-CoA pela adição de CO₂ na reação de carboxilação. Malonil-CoA é a fonte primária de carbono utilizada para a síntese de ácido graxo. Em seguida, a enzima ácido graxo sintase (FASN) utiliza o malonil-CoA para aumentar a cadeia carbônica formando um ácido graxo de 16 carbonos conhecido como ácido palmítico. Ademais, quando as taxas de lipogênese *de novo* são altas e há o acúmulo de malonil-CoA, ele pode atuar na inibição da atividade das carnitinas palmitoiltransferases (CPTs), enzimas importantes no transporte de cadeias acilas para a β -oxidação mitocondrial, impedindo que a célula realize um ciclo fútil (NASSIR *et al.*, 2015; RÖHRIG; SCHULZE, 2016; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Figura 2. Lipogênese *de novo* hepática.



Adaptado de Softic, Cohen e Kahn (2016).

O ácido palmítico produzido pela FASN pode ser metabolizado em diferentes ácidos graxos e também pode atuar como regulador, pois em altas concentrações de palmitato, a enzima ACC é inibida alostericamente, o que pode reduzir a lipogênese *de novo*. Ao ser catalizado pela enzima alongadora de cadeias muito longas de ácidos graxos 6 (ELOVL6), o palmitato pode ser alongado em um ácido graxo de 18 carbonos, conhecido como ácido esteárico ou para ácidos graxos mais longos. Tanto palmitato quanto o estearato podem ser dessaturados para a formação de palmitoleato (16:1) e oleato (18:1) pela enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD1). Essa enzima tem a capacidade de converter ácidos graxos saturados em monoinsaturados (MASHEK, 2013; AMEER *et al.*, 2014; RÖHRIG; SCHULZE, 2016; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Outras enzimas alongases e dessaturases também contribuem para a formação de ácidos graxos maiores e complexos como o ácido araquidônico (20:4). As alongases e as dessaturases atuam em ácidos graxos diferentes, segundo a especificidade de cada uma. Enquanto as ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 e ELOVL7 utilizam como substrato os ácidos graxos saturados e monoinsaturados, as ELOVL2 e ELOVL5 utilizam como substrato os ácidos graxos

poliinsaturados e a ELOVL4 alonga os ácidos graxos saturados e ácidos graxos poliinsaturados muito longos. Por sua vez, as dessaturases de ácidos graxos 1 e 2 ($\Delta 5$ e $\Delta 6$ dessaturases, respectivamente) geram como produtos finais ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 e ômega-3 (JUMP, 2009; PARK *et al.*, 2018). Além dessas enzimas, as acil-CoAs sintetases (ACS) estão envolvidas neste metabolismo pela atuação na ativação dos ácidos graxos e regulação da incorporação de triacilgliceróis (NGUYEN *et al.*, 2008; MASHEK, 2013; NELSON; COX, 2014).

Uma vez que os ácidos graxos foram sintetizados, alongados e dessaturados, eles podem seguir para a via de esterificação em cadeias de glicerofosfato para formar lipídeos mais complexos, como os triglicerídeos (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A primeira etapa da formação de triacilgliceróis ocorre com a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), que possui como função adicionar grupos acil-CoA em glicerol-3-fosfato para a formação de ácido lisofosfatídico (LPA) (Figura 2). Em seguida, para a produção de ácido fosfatídico (PA), a enzima 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) adiciona um segundo acil-CoA na cadeia carbônica. O ácido fosfatídico pode ser utilizado para a produção de fosfatidilinositol e fosfatidilglicerol, ou pode ser utilizado para a produção de 1,2-diacilglicerol pela desfosforilação da enzima lipina 1 (LPIN1). O passo final da reação ocorre com a enzima diacilglicerol aciltransferase (DGAT), que converte o diacilglicerol gerado em triacilglicerol. Ao finalizar sua formação, os triacilgliceróis são armazenados em gotículas lipídicas citosólicas (MASHEK, 2013; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

Paralelamente, a via metabólica da lipogênese *de novo* possui reguladores transcricionais chaves que em conjunto coordenam a expressão dos genes lipogênicos. Dentre eles estão os fatores de transcrição proteína 1C de ligação ao elemento regulatório de esterol (SREBP1c) e proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP). Ambos regulam a expressão de genes lipogênicos em resposta à insulina e à glicose, respectivamente. Além de ambos, os fatores de transcrição receptores hepáticos X (LXRs) são de grande importância, pois além de regular o metabolismo de colesterol, são essenciais para o controle transcricional de SREBP1c, ChREBP e enzimas chaves da via metabólica como FASN e SCD1 (POSTIC; GIRARD, 2008; MASHEK, 2013). Os fatores de transcrição receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) também atuam no metabolismo de ácidos graxos

podendo regular a expressão de genes importantes como CD36, FABP1 e ACSLs, além de aumentarem a lipogênese *de novo* principalmente em pacientes com NAFLD (MASHEK, 2013).

Interessantemente, análises de bioinformática em bancos de dados (miRBase, TargetScan, miRDB, entre outros) apontam que muitos dos RNAs mensageiros (mRNAs) das enzimas acima mencionadas (FASN, DGAT1, ACC1, LPIN1, MLYCD, SCD1, CPT1B, CPT1C, PPARGC1 β , PPAR α) apresentam sítios putativos de interação ao miRNA-1914-5p, o que reforça ainda mais seu papel como um potencial modulador do metabolismo lipídico.

Segundo Moustafa *et al.* (2012), Schwabe e Maher (2012) e Ipsen, Lykkesfeldt e Tveden-Nyborg (2018), a homeostase hepática lipídica é uma determinante fundamental no aparecimento de doenças hepáticas, que pode ser comprometida por um desbalanço entre os diversos tipos de lipídeos presentes no tecido, frente a ingestão inadequada de alimentos, álcool e mesmo pela síndrome metabólica. Estudos mais recentes indicaram, por exemplo, que a ingestão de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (ômega 3) é responsável pela limitação da deposição de triglicerídeos no tecido hepático. Todavia, a ausência dos mesmos da dieta em conjunto com um aumento na razão entre os ácidos graxos n-6/ n-3 (ômega 6/ ômega 3) pode induzir a doença gordurosa hepática ou outras doenças crônicas (FERRAMOSCA; CONTE; ZARA, 2011). Além disso, a presença dos ácidos graxos poliinsaturados tem um papel especial na regulação negativa do transportador mitocondrial de citrato (CIC), sensor para mudanças que ocorrem na lipogênese hepática. Esse fato indica uma correlação entre a mitocôndria e as reações citosólicas (FERRAMOSCA *et al.*, 2006; FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Em outros estudos, a presença de ácidos graxos livres, especialmente os saturados e os monoinsaturados apresentaram um aumento na indução da condição esteatótica no tecido (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006; LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013; FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Ademais, Thompson e colaboradores (2016) demonstraram que uma dieta baseada em gordura pode apresentar consequências a longo termo. Em um estudo com ratos, ao alimentar as mães com uma dieta altamente gordurosa, os pesquisadores observaram que alguns indivíduos da prole adulta destas mães apresentavam desenvolvimento de fibrose e NAFLD (THOMPSON *et al.*, 2016). Pelo exposto, observa-se uma estreita correlação entre o metabolismo lipídico e a presença de esteatose, mas os aspectos moleculares que sustentam

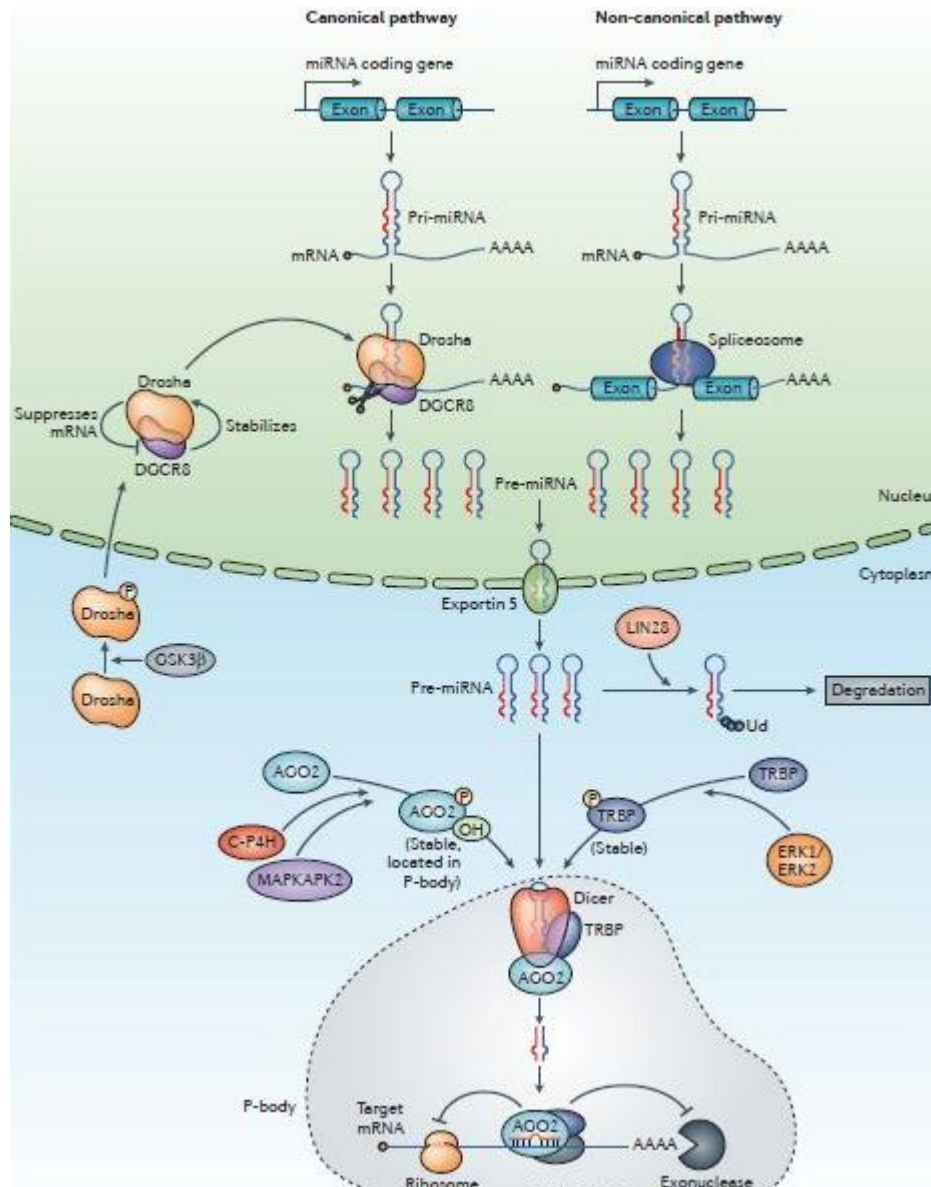
esse metabolismo e que poderão futuramente subsidiar inovações terapêuticas ainda não estão bem esclarecidos.

1.3 MicroRNAs e a modulação na homeostase celular hepática.

Nos últimos anos, estudos apontam a potencial utilização de microRNAs (miRNAs) no desenvolvimento de terapias inovadoras e diagnósticos não-invasivos (SCHMIDT, 2014; WANG; CHEN; TONG, 2014; SCHWARZENBACH, 2015; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). MiRNAs são pequenas moléculas de RNAs endógenos não codificantes, contendo de 18 a 23 nucleotídeos, que regulam a expressão de genes em níveis pós-transcricionais (VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; LOOSEN *et al.*, 2017). Os miRNAs podem ser sintetizados por vias canônicas ou por vias não-canônicas. Na via canônica os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e resultam em um transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) (Figura 3). Esse transcrito é processado dentro do núcleo celular por um complexo enzimático nomeado de Microprocessador composto pelas enzimas Drosha e DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*). O resultado desse processamento é um miRNA precursor (pré-miRNA) de aproximadamente 70 a 120 nucleotídeos. Os pré-miRNAs produzidos são exportados para o citoplasma pela proteína exportina-5 (Exp-5) e no citoplasma são finalmente processados a miRNAs maduros pela ação da enzima Dicer-1. Esse processamento citoplasmático consiste na clivagem do pré-miRNA para a formação de dúplex de RNAs 18 a 23 nucleotídeos (AMBROS, 2004; BHASKARAN; MOHAN, 2013; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; AWASTHI *et al.*, 2017; LOOSEN *et al.*, 2017). Esse duplex de miRNA é posteriormente associado com proteínas Argonautas (AGO) e formam o complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC). Uma das fitas do miRNA é degradada, enquanto a outra fita se caracteriza como o miRNA maduro que atua modulando o silenciamento gênico (BHASKARAN; MOHAN, 2013; HA; KIM, 2014; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; AWASTHI *et al.*, 2017; LOOSEN *et al.*, 2017). A diferença entre a síntese de miRNAs pela via canônica e não-canônica ocorre dentro do núcleo celular. Enquanto a via canônica depende da atuação da enzima Drosha para a formação do pré-miRNA, na via não-canônica essa necessidade é contornada e a formação de pré-miRNAs ocorre de outra maneira (Figura 3) (LI; RANA, 2014). Essa via foi descrita pela

primeira vez durante a formação de microRNAs localizados nos íntrons dos mRNAs (Mirtrons), onde os pré-miRNAs são formados através da maquinaria de processamento de mRNA (*splicing*). Após a formação dos pré-miRNAs, ocorre a exportação para o citoplasma através da exportina-5 e o processamento continua da mesma forma que a via canônica (ERSON-BENSAN, 2013; HA; KIM, 2014; LI; RANA, 2014). Os microRNAs podem atuar no silenciamento gênico de duas maneiras; podem clivar e degradar o mRNA alvo ou podem reprimir a tradução proteica. O mecanismo de regulação depende da complementaridade de bases entre miRNA-mRNA alvo. MiRNAs que se alinham perfeitamente com seus mRNA alvos levam a degradação do mRNA, enquanto miRNAs que possuem uma complementaridade imperfeita levam a inibição da tradução. Essa característica permite que os miRNAs atuem como reguladores de diversos genes alvos diferentes (SIMONSON; DAS, 2015).

Figura 3. Via canônica e não-canônica da biogênese dos microRNAs.



Fonte: Li; Rana, (2014).

De maneira importante, miRNAs apresentam diferentes alvos, sendo que um único miRNA pode potencialmente interagir com mais de 100 alvos (JIANG *et al.*, 2010) e estudos atuais apontam que essa interação pode ocorrer de maneiras diferentes, dependendo da fisiopatologia celular (GUO *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2014). Complementar a isso, predições computacionais sugerem que aproximadamente 60% dos genes codificadores de proteínas nos mamíferos podem ser regulados por essas pequenas moléculas (MOQADAM; PIETERS; BOER, 2012; LAGANÀ, 2015; DONGIOVANNI *et al.*, 2018), o que reforça o seu potencial

uso no desenvolvimento de fármacos (SZABO; BALA, 2013; VAN ROOIJ; KAUPPINEN, 2014; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017), mas as particularidades do mecanismo de atuação dessas moléculas dentro do contexto da biologia dos sistemas devem ser elucidadas, antes de análises clínicas.

Considerando-se o metabolismo lipídico no fígado e sua correlação com o quadro esteatótico, pode-se antever a participação de microRNAs (SOBOLEWSKI *et al.*, 2015; LIN; LIN-HUI; XIANG-HUO, 2016). No caso de quadros de NAFLD, os microRNAs podem ser utilizados por estarem presentes nos fluidos corporais e pela possibilidade de realizar um diagnóstico não-invasivo. Além disso, a expressão diferencial de microRNAs presentes em hepatocarcinoma derivados de NASH pode ser utilizada como um indicador da doença. Nesse sentido, o miRNA-122, que é comumente superexpresso no fígado humano e atua como um supressor tumoral, é encontrado em baixos níveis nos casos de esteatohepatite. Assim sendo, o silenciamento do miRNA-122 pode ser utilizado para identificar eventos de carcinogênese em pacientes com NASH (CHEUNG *et al.*, 2008; TAKAKI *et al.*, 2014; DEL CAMPO *et al.*, 2018). Além desse microRNA, outros se apresentam envolvidos na progressão da esteatose hepática. Yamada e colaboradores (2013) identificaram a expressão diferencial dos miRNAs -451, -21 e -34a em pacientes com NASH, enquanto Cermelli *et al.* (2011) identificaram um aumento de expressão nos miRNAs -34a e -16 em pacientes com esteatose hepática não alcoólica. A identificação de miRNAs presentes em amostras de plasma também se mostra importante. Pirola e colaboradores (2014) identificaram a superexpressão dos miRNA-122, -192, -19a/b e -375 em pacientes com esteatose simples e em particular, os miRNA-122, -192 e -375 estavam com um aumento maior em pacientes com NASH. Esses estudos reforçam a atuação de miRNAs no metabolismo do fígado gorduroso (DEL CAMPO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o detalhamento da funcionalidade do miRNA-1914-5p é relevante. O microRNA-1914-5p é codificado de uma sequência localizada no cromossomo 20, na região codificadora do gene uridina-citidina quinase-like-1 (UCKL1, 20q13.33). O miRNA-1914 passou a ser investigado recentemente, em 2015 ele foi descrito por Li *et al.* (2015) em um estudo com tecidos de câncer de estômago, onde apresentou uma expressão diferencial negativa. Em 2017, Liu e colaboradores (2017) demonstraram a elevada presença do miRNA-1914 em conjunto com o miRNA-647 em amostras de câncer colorretal. No ano seguinte, Zheng

e colaboradores (2018) identificaram três miRNAs (-1293, -873 e -1914) diferencialmente expressos em pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Nesse estudo, os três miRNAs se encontram em superexpressão e extremamente relacionados com a sobrevivência geral dos pacientes. No mesmo ano, De Oliveira da Silva e colaboradores (2018), demonstraram a atuação do miRNA-1914-5p na modulação do metabolismo lipídico em células estreladas hepáticas de linhagem LX-2; e na cocultura de células LX-2 e hepatócitos HepG2. No ambiente hepático, o microRNA-1914-5p mostrou-se 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. Dessa forma, essa forte correlação com o metabolismo lipídico reforça a relevância do presente estudo, aprofundando na correlação da função deste microRNA com o processo pró-esteatótico.

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivos gerais.

Analisar a atuação funcional do miRNA-1914-5p no metabolismo lipídico do processo pró-esteatótico em cultura celular de hepatócitos.

2.2 Objetivos específicos.

1. Estabelecer um modelo celular simulador de condições pró-esteatóticas em cultura de hepatócitos humanos, que viabilize as análises funcionais do miRNA-1914-5p;
2. Avaliar a composição do perfil lipídico e da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos e ao processo pró-esteatótico hepático no modelo celular a ser adotado, transfectado ou não com o miRNA-1914-5p;
3. Analisar e identificar de forma qualitativa as proteínas presentes nas condições de cultivo celular pela estratégia *shotgun*, para se avaliar sistemicamente a funcionalidade do miRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico avaliado.

7 CONCLUSÕES

O acúmulo de lipídeos no fígado ocorre pelo desequilíbrio entre a aquisição e a liberação lipídica, processos que são regulados pela absorção de lipídeos circulantes, lipogênese *de novo*, oxidação de ácidos graxos e a exportação de lipídeos em forma de VLDL. Com os resultados apresentados se observa que ao realizar o aumento do miRNA-1914-5p com a transfecção de moléculas mímicas em comparação com as células da condição controle, as células HepG2:

- Apresentam um aumento nos triglicerídeos, lipídeos totais e gotículas lipídicas;
- Apresentam modulação de vários genes importantes no metabolismo lipídico: aumentam os níveis transcricionais de *acly*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *acsl4*, *acsl5*, *agpat1*, *agpat2*, *agpat3*, *cpt1a*, *dgat2*, *hsl*, *atgl*, *chrebp*, *ppary*, *lxrβ*, *atg5* e *atg7*.
- Apresentam modulação de vários genes importantes no metabolismo lipídico: diminuem os níveis transcricionais de *scd1*, *cs* e *sreb1c*.

Por sua vez, ao realizar a inibição do miRNA-1914-5p com as moléculas inibidoras em comparação com as células controle, as células HepG2:

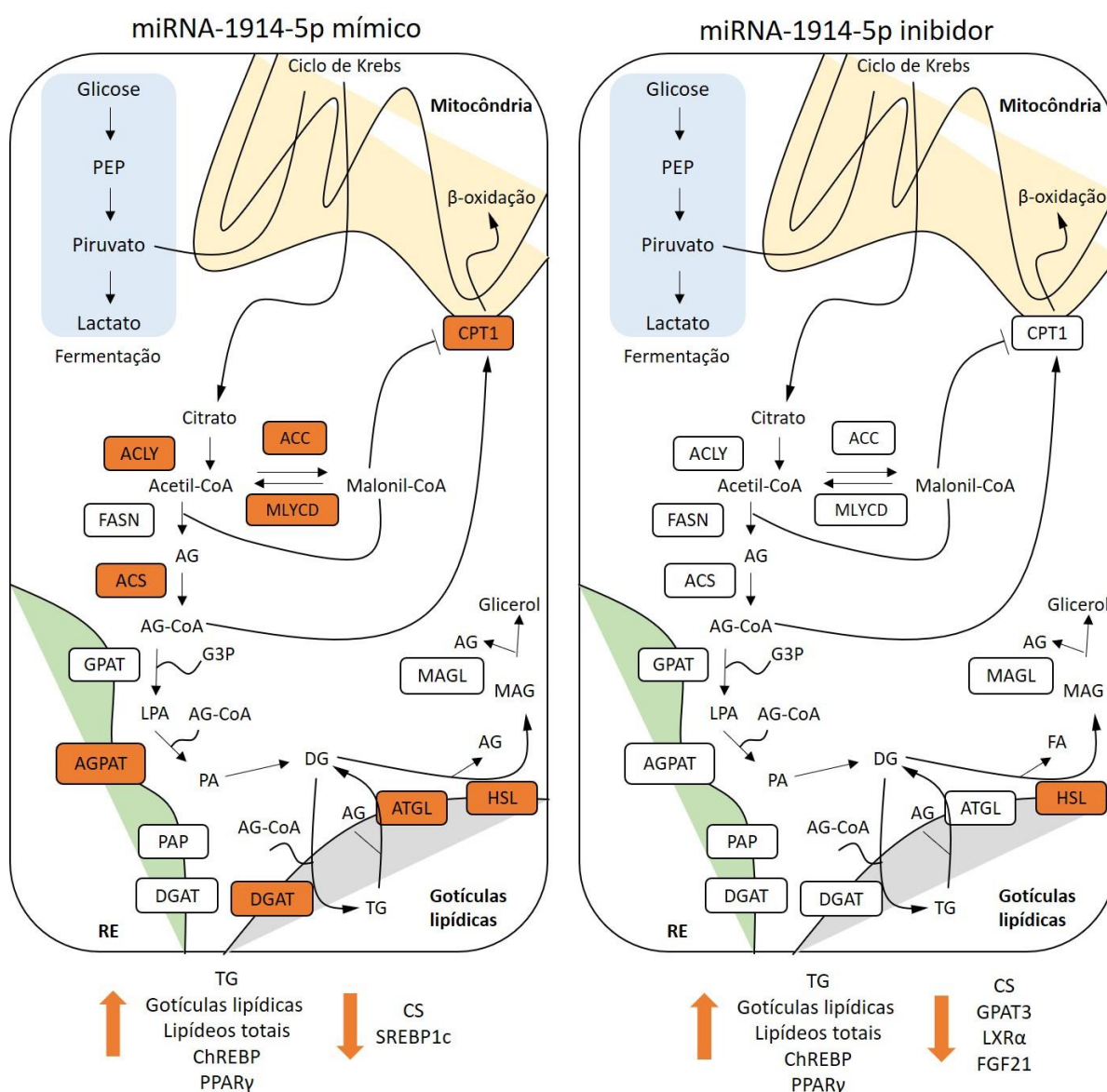
- Apresentaram um aumento nos níveis de triglicerídeos, lipídeos totais e gotículas lipídicas;
- Apresentam modulação de alguns genes importantes no metabolismo lipídico: aumentam os níveis transcricionais de *cd36*, *hsl*, *chrebp*, *ppary* e *atg7*.
- Apresentam modulação de alguns genes importantes no metabolismo lipídico: diminuem os níveis transcricionais de *scd1*, *cs*, *gpat3*, *lxra*, *rxra* e *fgf21*.

Além disso, os resultados obtidos na análise proteômica indicam que as duas condições de células transfectadas podem apresentar uma via energética mais presente. Isso pode ser indicado pela presença de proteínas importantes como FH e VLCAD no mímico e PC e G6PD no inibidor. Ambas as condições também apresentaram proteínas envolvidas com regulação epigenética, o que explicaria algumas modulações celulares indiretas. Ainda, nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-1914-5p observa-se a presença de várias proteínas que atuam de maneiras opostas, algumas piorando o quadro patológico e outras o melhorando. Isso indica novamente uma possível atuação homeostática da inibição do miRNA.

Com os resultados apresentados conclui-se que apesar do aumento dos níveis lipídicos (triglicerídeos, lipídeos totais e gotículas lipídicas) em ambas as condições, a mimetização da molécula do miRNA-1914-5p parece atuar mais acentuadamente nos genes da via lipídica,

aumentando-os e possivelmente ocasionando a piora do quadro pró-esteatótico. Por sua vez, a condição de inibição do miRNA-1914-5p apresenta menos modulações gênicas, apesar de manter os níveis lipídicos altos. Isso pode sugerir que a inibição do miRNA em estudo esteja atuando na manutenção do quadro instalado, sem necessariamente atuar na sua progressão ou regressão. Assim sendo, o miRNA-1914-5p se mostrou um importante modulador do metabolismo lipídico, especificamente na lipogênese *de novo*, nas condições estudadas e estudos mais aprofundados na relação entre miRNA-mRNA-proteína se fazem importantes.

Figura 53. Atuação funcional do miRNA-1914-5p mímico e inibidor na lipogênese *de novo*. Em laranja genes que apresentaram um aumento em seu nível transcricional.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E. Triglyceride Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, dez. 2017.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, [s.l.], v. 431, n. 7006, p.350-355, set. 2004.
- AMEER, F. *et al.* De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, [s.l.], v. 63, n. 7, p.895-902, jul. 2014.
- ANANIA, C. *et al.* Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 24, n. 19, p.2083-2094, mai. 2018.
- ANDERSON, N. M. *et al.* The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. **Protein & Cell**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.216-237, jul. 2018.
- ANSEMS, M. *et al.* Crosstalk and DC-SCRIPT: Expanding nuclear receptor modulation. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1806, n. 2, p.193-199, dez. 2010.
- ARAÚJO, A. *et al.* Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, [s.l.], v. 38, p.47-51, fev. 2018.
- ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 44, p.16452-16463, nov. 2014.
- ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 49, n. 12, p.1405-1418, ago. 2015.
- AWASTHI, R. *et al.* Therapeutic prospects of microRNAs in cancer treatment through nanotechnology. **Drug Delivery And Translational Research**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.97-110, nov. 2017.
- BAI, X. *et al.* Influences of sterol regulatory element binding protein-1c silencing on glucose production in HepG2 cells treated with free fatty acid. **Lipids In Health And Disease**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-12, abr. 2019.
- BARB, D. *et al.* Plasma Fibroblast Growth Factor 21 Is Associated With Severity of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients With Obesity and Type 2 Diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 104, n. 8, p.3327-3336, mar. 2019.
- BARBERO-BECERRA, V. J. *et al.* The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1753-1758, out. 2015.

- BARROS, B. *et al.* Type 1 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: When Should We Be Concerned? A Nationwide Study in Brazil. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.878-888, ago. 2017.
- BATALLER, R.; GAO, B. Liver Fibrosis in Alcoholic Liver Disease. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 35, n. 02, p.146-156, mai. 2015.
- BELD, J.; LEE, D. J.; BURKART, M. D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. **Molecular Biosystems**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.38-59, jan. 2015.
- BELLELLI, R. *et al.* NCOA4 Transcriptional Coactivator Inhibits Activation of DNA Replication Origins. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.123-137, jul. 2014.
- BETTERMANN, K.; HOHENSEE, T.; HAYBAECK, J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.9924-9944, jun. 2014.
- BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs. **Veterinary Pathology**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.759-774, set. 2013.
- BJERRE, D.; RASMUSSEN, H. B.; CONSORTIUM, T. I. Novel approach for CES1 genotyping: integrating single nucleotide variants and structural variation. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.349-359, mar. 2018.
- BOONE, A. N. *et al.* Regulation of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.223-227, abr. 2006.
- BOWMAN, T. A. *et al.* Acyl CoA synthetase 5 (ACSL5) ablation in mice increases energy expenditure and insulin sensitivity and delays fat absorption. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.210-220, mar. 2016.
- BURACZYNSKA, M. *et al.* Association between functional variant of inflammatory system gene (PSMA6) and end-stage kidney disease. **International Urology And Nephrology**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.2083-2087, set. 2016.
- BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, [s.l.], v. 65, n. 8, p.1038-1048, ago. 2016.
- CAI, J.; ZHANG, X.; LI, H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.328-348, mai. 2018.
- CANBAY, A.; BECHMANN, L.; GERKEN, G. Lipid Metabolism in the Liver. **Zeitschrift Für Gastroenterologie**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.35-41, jan. 2007.
- CAO, J. *et al.* Mice deleted for GPAT3 have reduced GPAT activity in white adipose tissue and altered energy and cholesterol homeostasis in diet-induced obesity. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 306, n. 10, p.1176-1187, mai. 2014.

CAO, Y. *et al.* The relationship between vitronectin and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Endocrine Journal**, [s.l.], v. 65, n. 7, p.747-753, 2018.

CAVE, M. C. *et al.* Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s.l.], v. 1859, n. 9, p.1083-1099, set. 2016.

CERMELLI, S. *et al.* Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.23937-23944, ago. 2011.

CHALASANI, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.328-357, set. 2017.

CHEN, J. *et al.* Expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2) promotes proliferation and invasion of liver cancer. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 130, n. 6, p.1302-1313, mai. 2011.

CHEN, X. *et al.* Modulation of G6PD affects bladder cancer via ROS accumulation and the AKT pathway in vitro. **International Journal Of Oncology**, [s.l.], jul. 2018.

CHEN, Y. *et al.* Deficiency in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase protects mice against diet-induced obesity and insulin resistance. **The Faseb Journal**, [s.l.], v. 33, n. 12, p.13722-13733, dez. 2019b.

CHEN, Z. *et al.* Correlation of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio with nonalcoholic fatty liver disease among the non-obese Chinese population with normal blood lipid levels: a retrospective cohort research. **Lipids In Health And Disease**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-7, ago. 2019a.

CHEUNG, O. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. **Hepatology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1810-1820, ago. 2008.

COBBINA, E.; AKHLAGHI, F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. **Drug Metabolism Reviews**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.197-211, mar. 2017.

COLEMAN, R. A.; MASHEK, D. G. Mammalian Triacylglycerol Metabolism: Synthesis, Lipolysis, and Signaling. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 111, n. 10, p.6359-6386, out. 2011.

CONTOIS, J. H. *et al.* Apolipoprotein B and Cardiovascular Disease Risk: Position Statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. **Clinical Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 3, p.407-419, jan. 2009.

COOK, A. J. L. *et al.* A Specific Function for the Histone Chaperone NASP to Fine-Tune a Reservoir of Soluble H3-H4 in the Histone Supply Chain. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 44, n. 6, p.918-927, dez. 2011.

COREY, K. E.; KAPLAN, L. M. Obesity and Liver Disease: the epidemic of the twenty-first century. **Clinics In Liver Disease**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-18, fev. 2014.

CSONKA, C. *et al.* Isolated hypercholesterolemia leads to steatosis in the liver without affecting the pancreas. **Lipids In Health And Disease**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-14, jul. 2017.

CURRIE, E. *et al.* Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. **Cell Metabolism**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.153-161, ago. 2013.

DE OLIVEIRA DA SILVA, B. *et al.* Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1–7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 98, p.137-155, mai. 2018.

DEL CAMPO, J. *et al.* Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.911-921, mar. 2018.

DESSEIN, A. *et al.* Fluxomic evidence for impaired contribution of short-chain acyl-CoA dehydrogenase to mitochondrial palmitate β -oxidation in symptomatic patients with ACADS gene susceptibility variants. **Clinica Chimica Acta**, [s.l.], v. 471, p.101-106, ago. 2017.

DETTLAFF-POKORA, A.; SLEDZINSKI, T.; SWIERCZYNSKI, J. Up-Regulation Mttp and Apob Gene Expression in Rat Liver is Related to Post-Lipectomy Hypertriglyceridemia. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.1767-1777, jul. 2015.

DING, J. *et al.* Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.13729-13739, set. 2015.

DING, J.; YANG, F.; WU, W. Tiam1 high expression is associated with poor prognosis in solid cancers. **Medicine**, [s.l.], v. 98, n. 45, p.17529-17538, nov. 2019.

DONGIOVANNI, P. *et al.* MiRNA Signature in NAFLD: A Turning Point for a Non-Invasive Diagnosis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 12, p.3966-3990, dez. 2018.

DUMITRASCU, D. L.; NEUMAN, M. G. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Update on Diagnosis. **Medicine And Pharmacy Reports**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.147-150, abr. 2018.

EISINGER, K. *et al.* Lipidomic Analysis of Serum from High Fat Diet Induced Obese Mice. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.2991-3002, fev. 2014.

ENOMOTO, H. *et al.* Liver fibrosis markers of nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 24, p.7427-7435, jun. 2015.

ERSON-BENSAN, A. E. Introduction to MicroRNAs in Biological Systems. **Mirnomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis**, [s.l.], v. 1107, n. 1, p.1-14, nov. 2013.

ESLAM, M.; VALENTI, L.; ROMEO, S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. **Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.268-279, fev. 2018.

FANG, Y. *et al.* DNA-PKcs deficiency sensitizes the human hepatoma HepG2 cells to cisplatin and 5-fluorouracil through suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 399, n. 1-2, p.269-278, out. 2014.

FANG, Y. *et al.* Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model”. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 24, n. 27, p.2974-2983, jul. 2018.

FENG, X. *et al.* ATP-citrate lyase (ACLY) in lipid metabolism and atherosclerosis: An updated review. **Progress In Lipid Research**, [s.l.], v. 19, n. 163, p.30049-30099, set. 2019.

FERRAMOSCA, A. *et al.* Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 47, n. 9, p.1994-2003, jun. 2006.

FERRAMOSCA, A.; CONTE, L.; ZARA, V. A krill oil supplemented diet reduces the activities of the mitochondrial tricarboxylate carrier and of the cytosolic lipogenic enzymes in rats. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.295-306, fev. 2011.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.1746-1755, fev. 2014.

FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der Ester. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.3252-3258, out. 1895.

FUCHS, C. D.; CLAUDEL, T.; TRAUNER, M. I. Role of metabolic lipases and lipolytic metabolites in the pathogenesis of NAFLD. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.576-585, nov. 2014.

GOEDEKE, L. *et al.* Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. **Hepatology**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.2197-2211, nov. 2018.

GÓMEZ-MANZO, S. *et al.* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 12, p.2069-2084, dez. 2016.

GOODSON, M. L. *et al.* Alteration of NCoR Corepressor Splicing in Mice Causes Increased Body Weight and Hepatosteatosis without Glucose Intolerance. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 34, n. 22, p.4104-4114, set. 2014.

GORDEN, D. L. *et al.* Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.722-736, jan. 2015.

GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V.. Orchestrating liver development. **Development**, [s.l.], v. 142, n. 12, p.2094-2108, jun. 2015.

GRAIFER, D. *et al.* Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes. **Biochimie**, [s.l.], v. 99, p.8-18, abr. 2014.

GREEN, C. J. *et al.* From whole body to cellular models of hepatic triglyceride metabolism: man has got to know his limitations. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 308, n. 1, p.1-20, jan. 2015.

GUNN, P. J. *et al.* In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. **Physiological Reports**, [s.l.], v. 5, n. 24, p.13532-13544, dez. 2017.

GUO, C. *et al.* MiR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis. **Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.766-778, abr. 2009.

GUO, C. *et al.* Therapeutic Potential of MicroRNA: A New Target to Treat Intrahepatic Portal Hypertension?. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2014, p.1-8, mar. 2014.

GUO, L. *et al.* Enhanced acetylation of ATP-citrate lyase promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 294, n. 31, p.11805-11816, jun. 2019.

GUO, L. *et al.* Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. **Drug Metabolism And Disposition**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.528-538, dez. 2010.

HA, M.; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.509-524, jul. 2014.

HAN, J.; KAUFMAN, R. J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 57, n. 8, p.1329-1338, mai. 2016.

HAN, L. *et al.* Expression and significance of the novel tumor-suppressor gene SMG-1 in hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.2569-2578, abr. 2014.

HAYASHIDA, M. *et al.* Vitronectin deficiency attenuates hepatic fibrosis in a non-alcoholic steatohepatitis-induced mouse model. **International Journal Of Experimental Pathology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.72-82, mar. 2019.

HE, X. *et al.* Chromatin Remodeling Factor LSH Drives Cancer Progression by Suppressing the Activity of Fumarate Hydratase. **Cancer Research**, [s.l.], v. 76, n. 19, p.5743-5755, 14 jun. 2016.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.425-456, fev. 2011.

HEYMAN-LINDÉN, L. *et al.* Berry intake changes hepatic gene expression and DNA methylation patterns associated with high-fat diet. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 27, p.79-95, jan. 2016.

HONG, M.; YOON, S.; WILSON, I. Structure and Functional Characterization of the RNA-Binding Element of the NLRX1 Innate Immune Modulator. **Immunity**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.337-347, mar. 2012.

IOANNOU, G. N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. **Trends In Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.84-95, fev. 2016.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 75, n. 18, p.3313-3327, jun. 2018.

IRIE, M. *et al.* Levels of the Oxidative Stress Marker γ -Glutamyltranspeptidase at Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal Of International Medical Research**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.924-933, jun. 2012.

JAYASINGHE, N. S.; DIAS, D. A. A Robust GC-MS Method for the Quantitation of Fatty Acids in Biological Systems. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], v. 1055, p.39-56, jul. 2013.

JIANG, X. *et al.* MicroRNAs and the regulation of fibrosis. **Febs Journal**, [s.l.], v. 277, n. 9, p.2015-2021, abr. 2010.

JOIS, T. *et al.* Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.1381-1394, nov. 2017.

JONES, J. E. C. *et al.* Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase 1 (ACC1) and 2 (ACC2) Reduces Proliferation and De Novo Lipogenesis of EGFRvIII Human Glioblastoma Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.169566-16986, jan. 2017.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E. *et al.* Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Journal**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-2, dez. 2015.

JUMP, D. B. Mammalian Fatty Acid Elongases. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.375-389, ago. 2009.

JUMP, D. B.; TRIPATHY, S.; DEPNER, C. M. Fatty Acid-Regulated Transcription Factors in the Liver. **Annual Review Of Nutrition**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.249-269, jul. 2013.

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

KAKUMU, T. *et al.* Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer. **Cancer Science**, [s.l.], v. 108, n. 4, p.732-743, abr. 2017.

KALEMBA, K. M. *et al.* Glycerol induces G6pc in primary mouse hepatocytes and is the preferred substrate for gluconeogenesis both in vitro and in vivo. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 294, n. 48, p.18017-18028, out. 2019.

KANG, X. *et al.* NASP antagonize chromatin accessibility through maintaining histone H3K9me1 in hepatocellular carcinoma. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1864, n. 10, p.3438-3448, out. 2018.

KE, Y. *et al.* Discs large homolog 5 decreases formation and function of invadopodia in human hepatocellular carcinoma via Girdin and Tks5. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 141, n. 2, p.364-376, mai. 2017.

- KILLION, E. A. *et al.* A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 9, p.43-56, mar. 2018.
- KIM, Y. *et al.* Ribosomal protein S3 (rpS3) secreted from various cancer cells is N-linked glycosylated. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 49, jun. 2015.
- KOLLARA, A.; BROWN, T. J. Expression and function of nuclear receptor co-activator 4: evidence of a potential role independent of co-activator activity. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 69, n. 23, p.3895-3909, mai. 2012.
- KOO, S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical And Molecular Hepatology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.210-215, set. 2013.
- KORS, L. *et al.* Deletion of NLRX1 increases fatty acid metabolism and prevents diet-induced hepatic steatosis and metabolic syndrome. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1864, n. 5, p.1883-1895, mai. 2018.
- KREZEL, W.; RÜHL, R.; LERA, A. R. Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [s.l.], v. 491, p.1104-1136, jul. 2019.
- KWAK, H. *et al.* Overexpression of Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 5 Increases Fatty Acid Oxidation and Free Radical Formation While Attenuating Insulin Signaling in Primary Human Skeletal Myotubes. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 16, n. 7, p.1157-1172, mar. 2019.
- LAGANÀ A. Computational Prediction of microRNA Targets. In: SANTULLI G. (eds) **microRNA: Basic Science. Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1ª edição.[s.l.]: Springer, Cham. 2015. p 231-252.
- LAKSHMAN, R. *et al.* Synergy between NAFLD and AFLD and potential biomarkers. **Clinics And Research In Hepatology And Gastroenterology**, [s.l.], v. 39, p.29-34, set. 2015.
- LEACHMAN, N. T. *et al.* ATAD2B is a phylogenetically conserved nuclear protein expressed during neuronal differentiation and tumorigenesis. **Development, Growth & Differentiation**, [s.l.], v. 52, n. 9, p.747-755, dez. 2010.
- LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Progress In Lipid Research**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.165-174, jan. 2013.
- LEE, J.; PARK, J.; ROH, Y. S. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. **Archives Of Pharmacal Research**, [s.l.], p.1-12, set. 2019.
- LI, F. Q. *et al.* Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.739-747, jan. 2015.
- LI, P *et al.* A preliminary study on the differential expression of long noncoding RNAs and messenger RNAs in obese and control mice. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 121, n. 2, p.1126-1143, ago. 2019a.

- LI, T. T. *et al.* Changes in peroxisome proliferator-activated receptor alpha target gene expression in peripheral blood mononuclear cells associated with non-alcoholic fatty liver disease. **Lipids In Health And Disease**, [s.l.], v. 17, n -1, nov. 2018.
- LI, X. *et al.* One potential hotspot ACADVL mutation in Chinese patients with very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, [s.l.], nov. 2019b.
- LI, Z.; RANA, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.622-638, jul. 2014.
- LIN, H.; LIN-HUI, L.; XIANG-HUO, H. Role of microRNAs in inflammation-associated liver cancer. **Cancer Biology & Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.407-425, dez. 2016.
- LIN, L. *et al.* Functional lipidomics: Palmitic acid impairs hepatocellular carcinoma development by modulating membrane fluidity and glucose metabolism. **Hepatology**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.432-448, jun. 2017.
- LISS, K. H. H.; FINCK, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimie**, [s.l.], v. 136, n. 1, p.65-74, mai. 2017.
- LIU, J. *et al.* DLG5 in Cell Polarity Maintenance and Cancer Development. **International Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.543-549, 2014.
- LIU, S. *et al.* MiR-647 and miR-1914 promote cancer progression equivalently by downregulating nuclear factor IX in colorectal cancer. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.8189-8199, set. 2017.
- LLOYD, J. T.; GLASS, K. C. Biological function and histone recognition of family IV bromodomain-containing proteins. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 233, n. 3, p.1877-1886, jun. 2017.
- LOOSEN, S. H *et al.* Role of circulating microRNAs in liver diseases. **World Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.586-594, abr. 2017.
- LOPEZ-GARCIA, J. *et al.* ZNF366 is an estrogen receptor corepressor that acts through CtBP and histone deacetylases. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 34, n. 21, p.6126-6136, 3 nov. 2006.
- MA, T. *et al.* ATP Citrate Lyase and LncRNA NONMMUT010685 Play Crucial Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Based on Analysis of Microarray Data. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 2, p.871-885, nov. 2018.
- MARRA, F.; SVEGLIATI-BARONI, G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. **Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.280-295, fev. 2017.
- MASHEK, D. G. *et al.* Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 5 Increases Fatty Acid Uptake and Partitioning to Cellular Triacylglycerol in McArdle-RH7777 Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 2, p.945-950, nov. 2005.
- MASHEK, D. G. Hepatic Fatty Acid Trafficking: Multiple Forks in the Road. **Advances In Nutrition**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.697-710, nov. 2013.

MAYR, J. A. *et al.* Lipoic acid biosynthesis defects. **Journal Of Inherited Metabolic Disease**, [s.l.], v. 37, n. 4, p.553-563, abr. 2014.

MEEH, S. J. R. *et al.* Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion?. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.152-158, out. 2010.

MENG, Y. *et al.* Oleic acid stimulates HC11 mammary epithelial cells proliferation and mammary gland development in peripubertal mice through activation of CD36-Ca²⁺ and PI3K/Akt signaling pathway. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 16, p.12982-12994, jan. 2018.

MINET, A. D.; GASTER, M. Pyruvate carboxylase is expressed in human skeletal muscle. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 402, n. 2, p.196-197, nov. 2010.

MOQADAM, F. A.; PIETERS, R.; BOER, M. L. D.. The hunting of targets: challenge in miRNA research. **Leukemia**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.16-23, jul. 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983.

MOTA, M. *et al.* ATP Synthase Subunit Beta Immunostaining is Reduced in the Sclerotic Hippocampus of Epilepsy Patients. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.149-160, dez. 2018.

MOUSTAFA, T. *et al.* Alterations in Lipid Metabolism Mediate Inflammation, Fibrosis, and Proliferation in a Mouse Model of Chronic Cholestatic Liver Injury. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 142, n. 1, p.140-151, jan. 2012.

NADER, L. A.; MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. Burden of liver disease in Brazil. **Liver International**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.844-849, fev. 2014.

NAKAJIMA, S. *et al.* Oleic acid is a potent inducer for lipid droplet accumulation through its esterification to glycerol by diacylglycerol acyltransferase in primary cortical astrocytes. **Brain Research**, [s.l.], v. 1725, p.1464-1484, dez. 2019.

NASSIR, F. *et al.* Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.167-175, mar. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, P. *et al.* Liver lipid metabolism. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, [s.l.], v. 92, n. 3, p.272-283, jun. 2008.

NISO-SANTANO, M. *et al.* Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1025-1041, jan. 2015.

NOBILI, V. *et al.* Oxidative stress parameters in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal Of Molecular Medicine**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.471-476, set. 2010.

NTRANOS, A.; CASACCIA, P. Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 625, p.4-10, jun. 2016.

ORE, A.; AKINLOYE, O. A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Medicina**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.26-39, jan. 2019.

PARADIES, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 39, p.14205-14218, out. 2014.

PARK, H. G. *et al.* The role of fatty acid desaturase (FADS) genes in oleic acid metabolism: FADS1 Δ 7 desaturates 11-20. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.21-25, jan. 2018.

PATTERSON, R. E. *et al.* Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 310, n. 7, p.484-494, abr. 2016.

PERLA, F. *et al.* The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Children**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.46-59, jun. 2017.

PHANNASIL, P. *et al.* Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1863, n. 2, p.537-551, fev. 2017.

PIRGON, Ö. *et al.* Association Between Insulin Resistance and ^[1]Oxidative Stress Parameters in Obese Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Journal Of Clinical Research In Pediatric Endocrinology**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.33-39, mar. 2013.

PIROLA, C. *et al.* Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Gut**, [s.l.], v. 62, n. 9, p.1356-1363, ago. 2012.

PIROLA, C. J. *et al.* Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. **Gut**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.800-812, jun. 2014.

POSTIC, C.; GIRARD, J.. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. **Diabetes & Metabolism**, [s.l.], v. 34, n. 6, p.643-648, dez. 2008.

PREUSS, J. *et al.* Identification and Characterization of Novel Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Inhibitors. **Journal Of Biomolecular Screening**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.286-297, mar. 2012.

PREZIOSI, M.; MONGA, S. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 37, n. 02, p.141-151, mai. 2017.

PRIVALSKY, M. L.; SNYDER, C. A.; GOODSON, M. L. Corepressor diversification by alternative mRNA splicing is species specific. **Bmc Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 16, n. 1, out. 2016.

QUIROGA, A. D. *et al.* Deficiency of carboxylesterase 1/esterase-x results in obesity, hepatic steatosis, and hyperlipidemia. **Hepatology**, [s.l.], v. 56, n. 6, p.2188-2198, dez. 2012.

RAMOS, L. F. **Análise funcional do microRNA-769-3p no processo fibrosante hepático e sua correlação com elementos pró-inflamatórios em células estreladas humanas.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2017.

RESSEGUIE, E. A.; BROOKES, P. S.; O'REILLY, M. A. SMG-1 kinase attenuates mitochondrial ROS production but not cell respiration deficits during hyperoxia. **Experimental Lung Research**, [s.l.], v. 43, n. 6-7, p.229-239, jul. 2017.

ROBINSON, M. W; HARMON, C.; O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular & Molecular Immunology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.267-276, abr. 2016.

RÖHRIG, F.; SCHULZE, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 11, p.732-749, set. 2016.

ROHWEDDER, A. *et al.* Lipid droplet formation in response to oleic acid in Huh-7 cells is mediated by the fatty acid receptor FFAR4. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 127, n. 14, p.3104-3115, mai. 2014.

ROMERO-GÓMEZ, M.; ZELBER-SAGI, S.; TRENELL, M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. **Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.829-846, out. 2017.

ROSS, M. K. *et al.* Examination of the carboxylesterase phenotype in human liver. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 522, n. 1, p.44-56, jun. 2012.

ROSSO, N *et al.* Translational approaches: from fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.] v. 20, n. 27, p.9038-9049, jul. 2014.

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

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.203-222, fev. 2017.

SAJNANI, K. *et al.* Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. **Biochimie**, [s.l.], v. 135, p.164-172, abr. 2017.

SAKANE, K. K. *et al.* Cellular and molecular studies of the effects of a selective COX-2 inhibitor celecoxib in the cardiac cell line H9c2 and their correlation with death mechanisms. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.50-59, nov. 2013.

SAMOVSKI, D.; ABUMRAD, N. A. Regulation of lipophagy in NAFLD by cellular metabolism and CD36. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.755-757, fev. 2019.

SANYAL, A. J.; PACANA, T. A Lipidomic Readout of Disease Progression in A Diet-Induced Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Transactions Of The American Clinical And Climatological Association**, [s.l.], v. 126, n. 1, p.271-288, mai. 2015.

SATAPATI, S. *et al.* Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. **Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 53, n. 6, p.1080-1092, abr. 2012.

SCHLICH, R. *et al.* Adipokines enhance oleic acid-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by inducing CD36 expression. **Archives Of Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 121, n. 3, p.81-87, mai. 2015.

SCHMIDT, A.; FORNE, I.; IMHOF, A. Bioinformatic analysis of proteomics data. **Bmc Systems Biology**, v. 8, n. 2, 2014.

SCHMIDT, M. F. Drug target miRNAs: chances and challenges. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.578-585, nov. 2014.

SCHWABE, R. F.; MAHER, J. J. Lipids in Liver Disease: Looking Beyond Steatosis. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 142, n. 1, p.8-11, jan. 2012.

SCHWARZENBACH, H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.1159-1169, jul. 2015.

SEBASTIANO, M. R.; KONSTANTINIDOU, G. Targeting Long Chain Acyl-CoA Synthetases for Cancer Therapy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 15, p.3624-3640, jul. 2019.

SEIXAS, R. B. P. de M. **Avaliação da esteatose hepática em crianças e adolescentes obesos e com sobrepeso e sua associação com a resistência à insulina**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Medicina) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SELVAKUMAR, P. K. C.; KABBANY, M. N.; ALKHOURI, N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Not a Small Matter. **Pediatric Drugs**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.315-329, mai. 2018.

SENOO, H. *et al.* Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1247-1272, nov. 2010.

SHAFIEYOUN, A.; MORAVEJI, S.; BASHASHATI, M.; REZAEI, N. Discs Large Homolog 5 (DLG5) Gene Polymorphism and Crohn's Disease: A Meta-Analysis of the Published Studies. **Acta Medica Iranica**, v. 54, n. 5, p. 289-295, mai. 2016.

SHIMIZU, T. *et al.* Tumor DNA-dependent protein kinase catalytic subunit expression is associated with hepatitis B surface antigen status and tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, out. 2018.

SIEUWERTS, A. *et al.* Clinical significance of the nuclear receptor co-regulator DC-SCRIPT in breast cancer: an independent retrospective validation study. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 12, n. 6, dez. 2010.

SILVA, B. *et al.* MicroRNA Profiling of the Effect of the Heptapeptide Angiotensin-(1-7) in A549 Lung Tumor Cells Reveals a Role for miRNA149-3p in Cellular Migration Processes. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.1-2, set. 2016.

SILVEIRA, M. B. da. **Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo de lipídeos de células hepáticas tumorais**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2019.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SIMONSON, B.; DAS, S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet?. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.467-474, abr. 2015.

SINGH, R. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, [s.l.], v. 458, n. 7242, p.1131-1135, abr. 2009.

SOBOLEWSKI, C. *et al.* MicroRNAs in Fatty Liver Disease. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 35, n. 01, p.012-025, jan. 2015.

SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases And Sciences**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.1282-1293, fev. 2016.

SOZEN, E.; OZER, N. K. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. **Redox Biology**, [s.l.], v. 12, p.456-461, ago. 2017.

SPAHIS, S. *et al.* Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.519-541, abr. 2017.

STÅL, P. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease - diagnostic challenge with prognostic significance. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 39, p.11077-11087, out. 2015.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications**. 1ª edição. [s.l.]: Wiley Online Library, 2004.

SU, X.; KONG, Y.; PENG, D. Fibroblast growth factor 21 in lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Clinica Chimica Acta**, [s.l.], v. 498, p.30-37, nov. 2019.

SUN, G. *et al.* PRKDC regulates chemosensitivity and is a potential prognostic and predictive marker of response to adjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.3536-3542, mai. 2017.

SUNNY, N. *et al.* Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Cell Metabolism**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.804-810, dez. 2011.

SZABO, E. *et al.* Underlying molecular alterations in human dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency revealed by structural analyses of disease-causing enzyme variants. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], jul. 2019.

SZABO, G.; BALA, Si. MicroRNAs in liver disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 10, n. 9, p.542-552, mai. 2013.

TAKAKI, Y. *et al.* Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. **Cancer Science**, [s.l.], v. 105, n. 10, p.1254-1260, set. 2014.

TANAKA, N. *et al.* Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 179, n. 1, p.142-157, nov. 2017.

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.

THOMAS, P. D. The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.15-24, nov. 2016.

THOMPSON, M. D. *et al.* Enhanced Steatosis and Fibrosis in Liver of Adult Offspring Exposed to Maternal High-Fat Diet. **Gene Expression**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.47-59, ago. 2016.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; RODEN, M. NAFLD and diabetes mellitus. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.32-42, out. 2016.

UTZ-MELERE, M. *et al.* Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: Lifestyle Change - a Systematic Review and Meta-Analysis. **Annals Of Hepatology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.345-354, mai. 2018.

VAN ROOIJ, E.; KAUPPINEN, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. **Embo Molecular Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.851-864, jun. 2014.

WALLACE, M.; MANN, D.; FRIEDMAN, S. Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 35, n. 02, p.107-118, mai. 2015.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, [s.l.], v. 147, n. 2, p.943-951, fev. 2006.

WANG, H.; AIROLA, M. V.; REUE, K. How lipid droplets “TAG” along: Glycerolipid synthetic enzymes and lipid storage. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [s.l.], v. 1862, n. 10, p.1131-1145, out. 2017.

WANG, Q. *et al.* Overexpression of serine/threonine-protein kinase-1 in pancreatic cancer tissue: Serine/threonine-protein kinase-1 knockdown increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.475-481, mar. 2015.

WANG, Y. *et al.* Overexpression of forkhead box J2 can decrease the migration of breast cancer cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 113, n. 8, p.2729-2737, jun. 2012.

WANG, Y.; CHEN, T.; TONG, W. MiRNAs and their application in drug-induced liver injury. **Biomarkers In Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.161-172, fev. 2014.

WHO, World Health Organization. **Brazil Health Profile**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: junho, 2018.

WOBSER, H. *et al.* Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. **Cell Research**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.996-1005, jun. 2009.

WU, W. K. K.; ZHANG, L.; CHAN, M. T. V. Autophagy, NAFLD and NAFLD-Related HCC. In: J. Yu. (ed.). **Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer**. Singapore: Springer Nature, 2018. p. 127-138.

XU, J. *et al.* Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. **Hepatology**, [s.l.], v. 59, n. 5, p.1761-1771, abr. 2014.

YAMADA, H. *et al.* Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. **Clinica Chimica Acta**, [s.l.], v. 424, p.99-103, set. 2013.

YAMADA, K.; TAKETANI, T. Management and diagnosis of mitochondrial fatty acid oxidation disorders: focus on very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.73-85, nov. 2018.

YANG, Q. *et al.* Effects of FOXJ2 on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through Notch signaling pathway in non-small lung cancer. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.79-83, nov. 2016.

YANG, Y. *et al.* Upregulation of Tiam1 contributes to cervical cancer disease progression and indicates poor survival outcome. **Human Pathology**, [s.l.], v. 75, p.179-188, maio 2018.

YOUNOSSI, Z. *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.11-20, set. 2017.

YOUNOSSI, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.73-84, fev. 2016.

ZHANG, M. *et al.* Sirtinol promotes PEPCK1 degradation and inhibits gluconeogenesis by inhibiting deacetylase SIRT2. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, fev. 2017.

ZHANG, Z. *et al.* The prognostic role and reduced expression of FOXJ2 in human hepatocellular carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.254-262, mai. 2016.

ZHAO, J. *et al.* Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. **Hepatology**, [s.l.], v. 59, n. 4, p.1331-1342, mar. 2014.

ZHENG, R. *et al.* Three differential expression profiles of miRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 507, n. 1-4, p.377-382, dez. 2018.