# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUISTA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

# Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico

**Thaís Porto Barbosa**

**Março - 2020**

**Thaís Porto Barbosa**

# Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico

Dissertação apresentada ao Instituto de Química do Câmpus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia (Biotecnologia Aplicada à Saúde).

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

**Março – 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Thaís Porto
B238e Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico / Thaís Porto Barbosa. – Araraquara : [s.n.], 2020
95 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Esteatose hepática. 2. Técnicas de cocultura. 3. Lipídios. 4. Fígado-Doenças. 5. Metabolismo. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Araraquara**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico"

**AUTORA: THAIS PORTO BARBOSA**
**ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. ª Dr.ª KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Drª. DÂNIA ELISA CHRISTOFOLETTI MAZZEO MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 13 de março de 2020

# DADOS CURRICULARES

## IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Thaís Porto Barbosa

**Nome em citações bibliográficas:** PORTO-BARBOSA, T.

## ENDEREÇO PROFISSIONAL

Av. Prof. Francisco Degni, 55 – Jardim Quitandinha, Araraquara – SP, 14800-900.

## FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

**2018 – 2020**
Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6).
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Brasil.
Título: Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico.
Orientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes.
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Grande área: Ciências Biológicas
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

**2012 – 2017**
Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
Título: Diversidade molecular de invertebrados da região do Norte Fluminense através de *Barcoding* utilizando a região do COI.
Orientador: Prof. Dra. Laura Isabel Weber.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

**2009 – 2011**
Ensino Médio (2º grau).
Escola Técnica do Estado de São Paulo, ETEC, Brasil.

## FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

**2016 – 2016**
Metodologias de Genética Direta e Reversa para avaliar a funcionalidade do Genoma (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil.

**2015 – 2015**
Filogenia Molecular Básica (Carga horária: 8h).
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

**Artigos completos publicados em periódicos**

WEBER, LAURA I.; **PORTO-BARBOSA, T**. ; BERALDINI, N.G. ; SILVA, V. C. . Two-year study of food availability, demographic structure, and genetic diversity of the most common sandhopper in southeastern Brazil. REGIONAL STUDIES IN MARINE SCIENCE JCR, v. 32, p. 100876, 2019.

**Trabalhos publicados em anais de eventos científicos**

**PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; Silveira, M. B.; **MORAES, K. C. M.** Functional analysis of the microRNA-1914-5p in lipid metabolism in hepatic cells: pathways to understand non-alcoholic fat liver diseases. In: 65th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

**PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; **MORAES, K.C.M**. Establishment of a cellular model of hepatic steatosis and mechanistic effects of microRNA 1914-5p in lipid metabolism. In: 65 th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

PEREIRA, L.P.M.; **PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; **MORAES, K. C. M.** Analysis of the effect of the microRNA-1914-5p in the control of lipid droplets and the reactive oxygen metabolism in liver cells subbmitted to pro-steatotic condition. In: 65 th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

SANTELLO, L. C.; **PORTO-BARBOSA, T.**; RAMOS, L. F.; **MORAES, K. C. M.** Steatotic potential effects of the phytosanitary ethiprole and fipronil in the hepatocyte cell line HepG2. In: 65th Congresso Brasileiro de Genética, 2019, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto - SP: SBG, 2019.

**PORTO-BARBOSA, T.**; BERALDINI, N.; SILVA, V. C.; WEBER, L. I. Food availability, demographic and genetic structure of the amphipod A. brasiliensis at the PARNA Jurubatiba (North of Rio de Janeiro). In: 62º Brazilian-International Congress of Genetics, SBG, 2016.

**Apresentações de trabalho e/ou palestra**

**PORTO-BARBOSA, T.**; BERALDINI, N. ; SILVA, V. C. ; ALVES, A. J. ; VARGAS, M.; NERY, L. E. ; BARROS, C. M. ; AZEVEDO, A. ; WEBER, L. I. . O anfípode semiterrestre A. brasiliensis: Um estudo ecológico, fenotípico e genético no tempo. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**PORTO-BARBOSA, T.**; BERALDINI, N. ; WEBER, L. I. . Parâmetros físico-químicos que determinam a distribuição do anfípode Q. lutzi nas lagoas costeiras do Norte Fluminense. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).

**PORTO-BARBOSA, T.**; CLEZAR, C. ; WEBER, L. I. . Diversidade Molecular de Invertebrados da Região Costeira do Norte Fluminense. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

**PORTO-BARBOSA, T.**; CLEZAR, C.; WEBER, L. I. . Levantamento da diversidade de mexilhões e crustáceos anfípodes através de barcoding utilizando a região do COI. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

65th Brazilian Congress of Genetics. Discovery and characterization of coding small ORFs: an evolutionary approach. 2019. (Congresso).

62º Brazilian-International Congress of Genetics. 2016. (Congresso).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a vida, saúde e a grande oportunidade de realizar o sonho da pós-graduação, e até aqui me guardou e me deu forças para que este projeto deixasse de ser sonho e passasse a ser realidade: muito obrigada, meu Deus.

À minha família, mãe, pai e irmã (Silvana, Valdemar e Daiana), pelo apoio incondicional. Obrigada por sonharem e embarcarem comigo nessa minha aventura acadêmica. Obrigada pelas orações que me acompanharam por onde quer que eu fosse, pelos conselhos e palavras de apoio e incentivo. Eu amo vocês!

À Professora Karen, não somente por ter aberto as portas do laboratório, mas também pela amizade e paciência (principalmente na hora de fazer cálculos de concentrações). Muito obrigada, “Teacher”!!!

Aos meus queridos amigos de laboratório e da vida, Ligia, Lara, Thays, Caio, Priscila, Marina, Victória e Letícia Molica, meu muito obrigada pela companhia e ensinamentos diários. Vocês participaram diretamente e ativamente dessa minha jornada. Obrigada a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a construção desse trabalho.

Às minhas amigas, fiéis escudeiras e pessoas mais inteligentes que já conheci, Letícia Ramos e Camila. Não sei o que seria de mim sem a ajuda de vocês. Agradecer parece pouco diante de tudo o que fizeram por mim. Vocês são incríveis!

Agradeço também ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP de Araraquara, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Instituto de Biociências e Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP de Rio Claro, por ter me “abrigado” nesses dois anos de mestrado e à Professora Marin, pela colaboração.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Professor Malaspina e ao técnico Sebastião Zanão, do Laboratório de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas (UNESP), pela parceria e pela troca de conhecimentos durante os experimentos.

À CAPES, pela bolsa de mestrado, e à FAPESP (Processo 2013/21186-5 e Processo 2018/05286-3) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

## RESUMO

As doenças hepáticas estão entre as principais causas de morte no mundo todo, afetando aproximadamente 20% da população. A esteatose hepática é uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos e, embora seja uma condição reversível, pode progredir para quadro de esteatohepatite e carcinoma hepatocelular. A falta de tratamentos específicos para a esteatose é um problema atual, e a caracterização de novas moléculas poderá ajudar no desenvolvimento de terapias. Diversos estudos apontam um papel decisivo de microRNAs (miRNAs) no desenvolvimento de patologias hepáticas. Os miRNA são pequenas moléculas que estão envolvidas na regulação de genes importantes no metabolismo lipídico. Mais especificamente, o miR-1914-5p está intimamente relacionado com a biossíntese de ácidos graxos em células hepáticas estreladas, e buscar entender sua atuação funcional no quadro pró-esteatótico celular é o objetivo central dessa proposta. Para isto, um modelo celular pró-esteatótico foi estabelecido no presente trabalho, utilizando-se linhagens celulares hepáticas, tais como LX-2 e HepG2. Ensaios bioquímicos para mensuração de lipídeos intracelulares e níveis de β-oxidação foram realizados. Em células cocultivadas, onde houve um aumento dos níveis endógenos do miR-1914-5p, observou-se um aumento no conteúdo lipídico intracelular, sugerindo um efeito acentuado deste miRNA na produção e acúmulo de lipídeos. Sob outra perspectiva, células cocultivadas onde o miR-1914-5p foi inibido, houve diminuição nos níveis de lipídeos totais e glicose intracelulares, inferindo que este miRNA estaria diminuindo espécies lipídicas que são alteradas no quadro pró-esteatótico. Análises bioquímicas e de expressão gênica foram realizadas em células LX-2. Em células onde há aumento endógeno do miR-1914-5p, houve aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol, além da modulação dos níveis de expressão de diversos genes correlatos à síntese, armazenamento e hidrólise de lipídeos, sugerindo que as células contendo esta condição estariam tentando encontrar uma homeostase lipídica ao liberar AGs para oxidação. Por outro lado, células onde o miR-1914-5p foi inibido, houve diminuição nos níveis de colesterol intracelulares, além deste miRNA ter mostrado interagir com sítios putativos de genes correlatos à síntese de colesterol. A partir dos resultados, a inibição do miR-1914-5p pareceu ter um efeito mais intenso na síntese de lipídeos, uma vez que genes relacionados à via oxidativa não foram modulados. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o efeito do miR-1914-5p parece variar em linhagens cultivadas isoladamente, tendo a confirmação de que a potencial ação deste miRNA é aparentemente fortalecida quando este é inserido em linhagens cocultivadas.



**Palavras-chave:** Esteatose hepática; lipídeos; miR-1914-5p; LX-2; HepG2.

## ABSTRACT

Liver disease is among the main causes of death worldwide, affecting approximately 20% of the population. Liver steatosis is a condition characterized by the accumulation of fat in hepatocytes and, although it is a reversible condition, it can progress to steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. The lack of specific treatments for steatosis is a current problem, and the characterization of new molecules may help in the development of therapies. Several studies point to a decisive role of microRNAs (miRNAs) in the development of liver pathologies. MiRNA are small molecules that are involved in the regulation of important genes in lipid metabolism. More specifically, miR-1914-5p is closely related to the biosynthesis of fatty acids in hepatic stellate cells, and seeking to understand their functional role in the cellular pro-steatotic setting is the central objective of this proposal. For this, a pro-steatotic cell model was established in the present work, using liver cell lines, such as LX-2 and HepG2. Biochemical tests to measure intracellular lipids and β-oxidation levels were performed. In cocultivated cells where there was an increase in endogenous levels of miR-1914-5p, an increase in intracellular lipid content was observed, suggesting a marked effect of this miRNA on lipid production and accumulation. From another perspective, cocultivated cells where miR-1914-5p was inhibited, there was a decrease in the levels of total lipids and intracellular glucose, inferring that this miRNA would be decreasing lipid species that are altered in the pro-steatotic setting. In addition, biochemical and gene expression analyzes were performed on LX-2 cells. In LX-2 cells where there was an endogenous increase in miR-1914-5p, there was an increase in the levels of triglycerides and cholesterol, in addition to the modulation of the expression levels of several genes related to the synthesis, storage and hydrolysis of lipids, suggesting that the cells containing this condition would be trying to find a lipid homeostasis by releasing AGs for oxidation. On the other hand, LX-2 cells where miR-1914-5p was inhibited, there was a decrease in intracellular cholesterol levels, in addition to this miRNA being shown to interact with putative sites of genes related to cholesterol synthesis. From the results, the inhibition of miR-1914-5p in LX-2 cells seemed to have a more intense effect on lipid synthesis, since genes related to the oxidative pathway were not modulated. The results obtained in this project have shown that the effect of miR-1914-5p seems to vary in cell line grown alone, confirming that the potential action of this miRNA is apparently strengthened when it is inserted into cocultured cell line.



**Keywords:** Liver steatosis; lipids; miR-1914-5p; LX-2; HepG2.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC - Acetil-CoA carboxilase
ACLY – Adenosina trifosfato citrato liase
ACSL – Acil-CoA sintetase de cadeia longa
AGO2 – Argonauta 2
AGPAT – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase
AGs – Ácidos graxos
ATGL – Lipase de triglicerídeos do tecido adiposo
ATP – Adenosina trifosfato
CD36 – Ácido graxo translocase
cDNA – DNA complementar
CES – Células endoteliais sinusoidais
CHE – Célula hepática estrelada
ChREBP – Proteína de ligação ao elemento responsivo à carboidrato
CIC – Transportador mitocondrial de citrato
CPTs – Carnitinas palmitoiltransferases
CS – Citrato sintase
DAG – Diacilglicerol
DGAT – Diacilglicerol aciltransferase
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMSO – Dimetilsufóxido
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELOVL – Elongase de ácidos graxos de cadeia muito longa
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FABP – Proteínas ligadoras de ácido graxo
FASN – Ácido graxo sintase
FATP – Proteínas transportadoras de ácido graxo
FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
GPAT – Glicerol-3-fosfato aciltransferase
HMGCR – HMG-CoA redutase
HMGCS1 – HMG-CoA sintase 1
HSL - Lipase sensível ao hormônio

LDN – Lipogênese *de novo*

LPA – Ácido lisofosfatídico

MAGL - Lipase de monoacilglicerol

miRNA – microRNA

MLYCD - Malonil-CoA descarboxilase

mRNA – RNA mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio

PA – Ácido fosfatídico

PAP/LPIN – Lipina

PBS – Tampão fosfato salino

PNPLA3 - Fosfolipase patatina-como proteína contendo o domínio 3

PPARs – Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos

qPCR – Reação de polimerase em cadeia quantitativa

RE – Retículo endoplasmático

SBF – Soro bovino fetal

SCD – Estearoil-CoA dessaturase

SREBP – Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol

TGs – Triglicerídeos

TRC – Transporte reverso de colesterol

UPR – Resposta à proteína desnovelada

VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO ..... 14**
**1.1 Fígado: um biorreator metabólico ..... 14**
**1.2 Doenças hepáticas e a esteatose ..... 15**
**1.3 Metabolismo de lipídeos na esteatose hepática ..... 18**
**1.4 MiRNA como ferramenta biotecnológica ..... 22**
**2 OBJETIVOS ..... 26**
**2.1 Objetivos gerais ..... 26**
**2.2 Objetivos específicos ..... 26**
**3 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 27**
**3.1 Culturas de células e ensaios de viabilidade celular (MTT) ..... 27**
**3.2 Transfecções celulares ..... 28**
**3.3 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares ..... 29**
*3.3.1 Mensuração de Triglicerídeos ..... 29*
*3.3.2 Mensuração de Colesterol ..... 30*
*3.3.3 Mensuração de Glicose ..... 30*
**3.4 Análises do metabolismo lipídico ..... 30**
*3.4.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos via Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS) ..... 30*
*3.4.2 Análises de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ..... 31*
**3.5 Marcação de AGs por fluorescência: mensuração da β-oxidação ..... 32**
**3.6 Extração de RNA total, de miRNA e transcrição reversa ..... 33**
*3.6.1 Extração de RNA total ..... 33*
*3.6.2 Transcrição reversa do RNA total ..... 33*
*3.6.3 Extração de miRNA ..... 34*
*3.6.4 Transcrição de miRNA ..... 35*
**3.7 Análises de expressão gênica por qPCR ..... 35**
*3.7.1 qPCR: mRNA ..... 35*
*3.7.2 qPCR: análise da expressão diferencial e validação do miR-1914-5p ..... 37*
**3.8 Análises estatísticas ..... 37**
**CAPÍTULO I: COCULTURA ..... 38**
**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 38**
**4.1 Ensaio de viabilidade celular em linhagens celulares hepáticas ..... 38**
**4.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares ..... 40**
*4.2.1 Níveis intracelulares de triglicerídeos nas células cocultivadas ..... 40*
*4.2.2 Níveis intracelulares de colesterol nas cocultivadas ..... 43*

**4.3 Ensaio de viabilidade celular em células transfectadas com o miR-1914-5p ..... 45**
**4.4 Análises de metabolismo de lipídeos ..... 46**
*4.4.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS) ..... 46*
*4.4.2 Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ..... 48*
**4.5 Marcação de AGs e análise da β-oxidação por fluorescência ..... 50**
**4.6 Mensuração de glicose intracelular ..... 52**
**5 CONCLUSÕES ..... 54**
**CAPÍTULO II: LX-2 ..... 55**
**6 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 55**
**6.1 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2 ..... 55**
**6.2 Análises bioquímicas de lipídeos intracelulares ..... 56**
*6.2.1 Níveis intracelulares de triglicerídeos em células LX-2 ..... 56*
*6.2.2 Níveis intracelulares de colesterol em células LX-2 ..... 58*
**6.3 Mensuração dos níveis de miRNA em células LX-2 transfectadas ..... 60**
**6.4 Ensaio de viabilidade celular em células LX-2 transfectadas com o miR-1914-5p ..... 61**
**6.5 Análises de metabolismo de lipídeos ..... 62**
*6.5.1 Quantificação e identificação de ácidos graxos através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS) ..... 62*
*6.5.2 Quantificação de lipídeos totais através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ..... 64*
**6.6 Análises da expressão de genes correlatos ao metabolismo de lipídeos 65**
*6.6.1 Fatores de transcrição na regulação de genes hepáticos ..... 65*
*6.6.2 Genes correlatos à síntese de novo de AGs ..... 67*
*6.6.3 Genes correlatos ao armazenamento de AGs ..... 70*
*6.6.4 Genes correlatos à ativação e dessaturação de AGs ..... 72*
*6.6.5 Genes a via de β-oxidação de AGs ..... 74*
*6.6.6 Genes correlatos ao metabolismo de colesterol ..... 76*
**6.7 Mensuração de AGs e análise da β-oxidação por fluorescência ..... 79**
**7 CONCLUSÕES ..... 82**
**REFERÊNCIAS ..... 85**

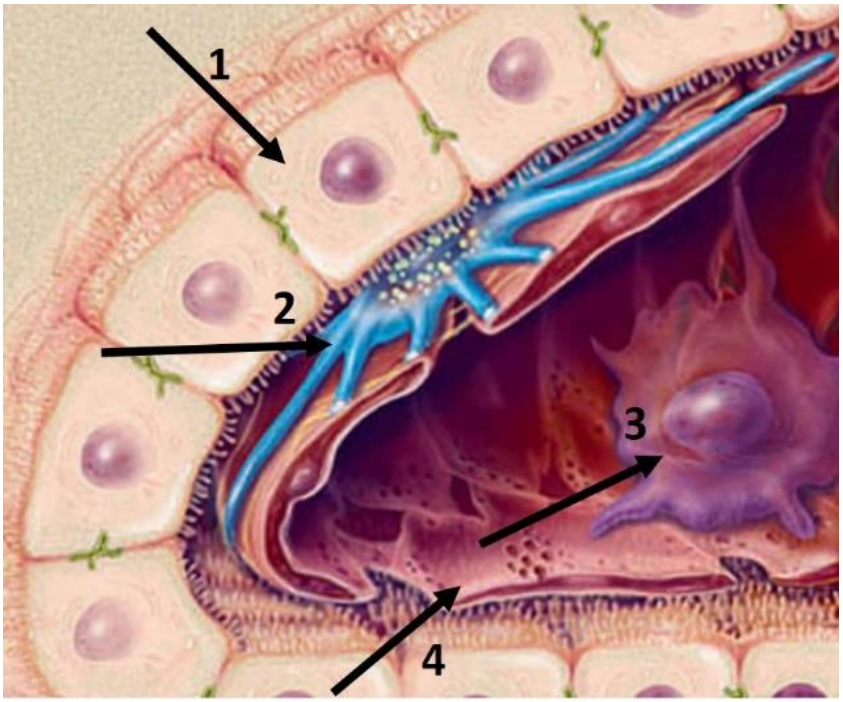
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Fígado: um biorreator metabólico

O fígado é a maior glândula presente no corpo humano e possui diversas funções metabólicas, sendo o primeiro local de processamento de muitos nutrientes (OZOUGWA; EYO, 2014; PONZIANI *et al.*, 2015). É também local de armazenamento de reservas energéticas, como lipídeos e glicogênio que são oriundos da dieta e disponibilizados quando necessário. Ele também pode metabolizar substâncias tóxicas e as converter em substâncias que possam ser excretadas (CHIANG, 2014). Justamente por desempenhar papéis fundamentais e contribuir significativamente para a homeostase corporal, desequilíbrios fisiológicos podem acarretar uma série de distúrbios na função hepática. Além do mais, por possuir constantes relações e mecanismos de comunicação com outros órgãos endócrinos, a perturbação do equilíbrio hepático pode desencadear alterações metabólicas e resultar no mau funcionamento do órgão (BURRA, 2013).

O lobo hepático é composto por alguns tipos celulares, constituído basicamente por hepatócitos, células de *Kupffer*, células hepáticas estreladas (CHE) e células endoteliais sinusoidais (CES) (OZOUGWU, 2017) (Figura 1).

**Figura 1.** Tipos de células hepáticas. (1) hepatócitos; (2) CHE; (3) células de *Kupffer*; (4) CES.




Fonte: Adaptado de Friedman, 2008.

Em mamíferos, os hepatócitos compõem aproximadamente 70-85% do volume total do fígado (KMIEC, 2001) e a capacidade de síntese e de metabolismo do fígado se dá, em maioria, por eles (ALLEN, 2002). Justamente por esta capacidade, os hepatócitos são ricos em organelas, como retículo endoplasmático e complexo de golgi, que participam ativamente no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas (OZOUGWU, 2017).

As células de *Kupffer* são macrófagos residentes no fígado, que, após a ativação, podem secretar citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando assim uma resposta inflamatória (KMIEC, 2001).

As CHE são células especializadas em armazenamento, abrigando na forma de gotícula lipídica dispostas no citoplasma, os retinóides (vitamina A) (KNOOK; SEFFELAAR; DE LEEUW, 1982), e sob condições de homeostase, as CHE apresentam uma forma quiescente. Entretanto, sob condições de estresse, estas podem se tornar ativadas, passando de um estado quiescente para o estado ativado, perdendo seu armazenamento de retinóides e adquirindo uma morfologia semelhante à miofibroblastos, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória (FRIEDMAN, 2008).

As CES são células altamente especializadas que contribuem significativamente para a formação da parede dos sinusoides do fígado, representando a interface entre o fluxo sanguíneo e células hepáticas. Essas células contêm uma arquitetura descontínua em suas membranas que formam fenestras, e por sua vez, criam canais que possibilitam a troca de substâncias entre vasos sanguíneos e hepatócitos (NI *et al.*, 2017; POISSON *et al.*, 2017).

### 1.2 Doenças hepáticas e a esteatose

Distúrbios no fígado constituem um conjunto de doenças que incluem as hepatites, doenças hepáticas alcoólicas e não alcoólicas, cirrose, carcinoma hepatocelular e hemocromatose, sendo estas as maiores causadoras de mortes no mundo (WANG *et al.*, 2014). A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada um complexo conjunto de doenças não causadas pelo álcool, que varia de esteatose simples, geralmente assintomática, à esteatohepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014). Entretanto, a patogênese e os mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença, ainda são pouco compreendidos (FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Em geral, a prevalência global de DHGNA dobrou nos últimos 20 anos (LABRECQUE *et al.*, 2014; PERUMPAIL *et al.*, 2017) e afeta aproximadamente 20% da população mundial (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014). O aumento de DHGNA está intimamente associado à obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2, sendo estes, na maioria das vezes, consequências de hábitos alimentares inapropriados e estilo de vida sedentário, características cada vez mais comuns no mundo desenvolvido atual (ANGULO, 2002; SAYINER *et al.*, 2016).

A esteatose hepática, foco do presente trabalho, é uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura (>5% do peso do fígado), principalmente de triglicerídeos, nos hepatócitos (HARDY *et al.*, 2016; KARANJIA e*t al.*, 2016; BENEDICT; ZHANG, 2017), sem que haja evidência de lesão hepática (NASSIR *et al.*, 2015; KANWAR; KOWDLEY, 2016). Pode ser diferenciada em esteatose macrovesicular, quando um único e volumoso vacúolo lipídico está presente, ou em esteatose microvesicular, quando há pequenas vesículas lipídicas no citoplasma de hepatócitos (AHMED *et al.*, 2017), sendo esta uma condição rara (YEH; BRUNT, 2014). Além de fatores relacionados à alimentação, a esteatose hepática também pode resultar de fatores secundários, como infecção pelo vírus HCV, perda de peso abrupta e ingestão de drogas (amiodarona, esteroides e terapias anti-retroviral) (KARANJIA *et al.*, 2016).

Apesar de ser uma doença reversível e que não está associada com mortalidade, a esteatose pode evoluir a quadros sintomatológicos piores (esteatohepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular) (AHMED *et al.*, 2017). Em 1998, Day e James postularam a teoria dos dois eventos (*two-hit theory*), com o intuito de explicar a progressão da patogênese. De acordo com esta teoria, o acúmulo de gordura no fígado, decorrente por dieta hiperlipídica, sedentarismo ou obesidade (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016), é considerado o primeiro evento, o que poderia levar à lesão dos hepatócitos, enquanto que, em decorrência disto, fatores secundários como citocinas, disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático caracterizam o segundo evento, ativando processos inflamatórios e progredindo à esteatohepatite (LEVENE; GOLDIN, 2012; PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). Todavia, a compreensão sobre os mecanismos subjacentes à progressão da doença aumentou nos últimos anos, revelando que a complexidade da DHGNA envolve múltiplos fatores que agem coletivamente, contribuindo com o desenvolvimento da doença (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Consequentemente, houve a reformulação da teoria dos dois eventos que passou a

ser denominada teoria dos múltiplos eventos (*multiple-hit theory*), onde, além da possível predisposição genética, a resistência à insulina juntamente com a hiperinsulinemia, ingestão de álcool ou drogas, agem como “estressores” e resultam em aumento da lipogênese *de novo* (RISTIG; DRECHSLER; POWDERLY, 2005). O acúmulo de gordura torna o fígado suscetível à eventos como estresse oxidativo, apoptose e ativação das células hepáticas estreladas (TILG; MOSCHEN, 2010), que atrelados à liberação de citocinas pelas células de *Kupffer*, ocasiona em lesão nos hepatócitos e caracteriza na transição para esteatohepatite e fibrose (YILMAZ, 2012; HARDY *et al.*, 2016).

Por ser uma doença assintomática, na maioria das vezes, os pacientes esteatóticos demoram a descobrir a doença, sendo revelada em exames de rotina (TOLMAN; DALPIAZ, 2007). A demora em descobrir/ diagnosticar a doença, a baixa conscientização dos pacientes que possuem risco de progressão e a falta de diagnósticos precisos e confiáveis, explicam o porquê de a doença só ser identificada em estágios mais avançados (RATZIU *et al.*, 2012), podendo até mesmo potencializar as doenças hepáticas terminais. Resultados de estudos demonstraram que, além da morte relacionada propriamente ao fígado, os pacientes apresentam riscos aumentados de desenvolverem doenças cardiovasculares, o que leva a uma frequência aumentada de mortalidade (AHMED *et al.*, 2017).

Ainda que a compreensão sobre a patofisiologia da DHGNA tenha crescido significativamente nos últimos anos, a falta de tratamentos farmacológicos específicos para esteatose também é uma problemática (AHMED *et al.*, 2017). A heterogeneidade de DHGNA é um fator-chave que dificulta o desenvolvimento de terapias apropriadas (HAAS; FRANCQUE; STAELS, 2016) e a falta de detalhamentos moleculares sobre o desenvolvimento dessa patologia limita as inovações farmacológicas. Os poucos tratamentos satisfatórios disponíveis são indicados para estágios mais avançados de DHGNA, como esteatohepatite e fibrose (AHMED *et al.*, 2017). Como DHGNA está intrinsecamente ligada à obesidade, resistência à insulina e dislipidemia, os tratamentos disponíveis são direcionados para o estresse oxidativo (antioxidantes), anti-inflamatórios, sensibilizadores de insulina e fármacos que induzam a perda de peso (AHMED *et al.*, 2017). No que tange à esteatose hepática, uma opção alternativa para o tratamento pode ser a modificação do estilo de vida. Dieta e exercícios físicos podem auxiliar na perda de peso gradual e consequentemente, na diminuição do acúmulo de gordura hepática (BENEDICT; ZHANG, 2017). Todavia, determinar a taxa

de perda de peso é um fator importante, considerando-se que evidências sugerem que o rápido emagrecimento pode até mesmo agravar as doenças do quadro DHGNA (TSAI *et al.*, 2017).

### 1.3 Metabolismo de lipídeos na esteatose hepática

O fígado apresenta papel fundamental no metabolismo lipídico, atuando no armazenamento, na síntese e na oxidação dos ácidos graxos (AGs) (CHIANG, 2014). Lipídeos são os principais constituintes das membranas celulares, participam de sinalizações intracelulares e desempenham funções importantes como precursores de ligantes de receptores nucleares (CALDER, 2015). Mais especificamente, ácidos graxos e triglicerídeos são as formas de energia mais comuns que podem ser armazenadas e utilizadas quando os níveis de glicose no sangue estão baixos (CALDER, 2015). O volume de gotículas lipídicas armazenadas em hepatócitos é rigorosamente regulado por fatores de transcrição e moléculas celulares, que podem ativar ou inibir no fígado a captação de ácidos graxos, síntese, esterificação, oxidação mitocondrial e exportação dos triglicerídeos (HARDY *et al.*, 2016). Alterações nesses processos como aumento da absorção de ácidos graxos e consequente diminuição na taxa de oxidação/ exportação, pode desencadear o desenvolvimento de esteatose hepática. A redução na síntese de VLDL (*very low denstity lipoprotein*), lipoproteína responsável pela captação de triglicerídeos circulantes, também pode contribuir para o aumento da absorção desses lipídeos pelo fígado (NASSIR *et al.*, 2015).

Os lipídeos que contribuem para a esteatose hepática são oriundos da lipogênese *de novo* e do tecido adiposo (através da lipólise) (NASSIR *et al.*, 2015). Evidências sugerem que a resistência à insulina é o principal fator no que tange ao aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando proporcionalmente a circulação de ácidos graxos livres no sangue (AHMED *et al.*, 2017). Além do mais, a má alimentação também contribui para a acumulação de lipídeos hepáticos, segundo Donnelly *et al.*, (2005), que demonstraram que aproximadamente 15% dos lipídeos hepáticos no fígado de pacientes com DHGNA são oriundos de lipídeos dietéticos. Logo, a ingestão de lipídeos através da dieta pode desempenhar um papel crucial na acumulação de gordura hepática (SOZIO; LIANGPUNSAKUL; CRABB, 2010).

A acumulação massiva de lipídeos nos hepatócitos pode resultar na disfunção mitocondrial. As ultraestruturas mitocondriais podem sofrer lesões, perda de DNA mitocondrial (mtDNA) e uma diminuição nas atividades dos complexos da cadeia

respiratória (WEI *et al.*, 2008), o que, por sua vez, pode impactar diretamente na transferência de elétrons de intermediários respiratórios anteriores para o oxigênio molecular, aumentado consideravelmente a produção de ERO (HENSLEY *et al.*, 2000; BENEDICT; ZHANG, 2017). Ainda, há regulação positiva de citocinas pró-apoptóticas e pró-inflamatórias (AHMED *et al.*, 2017), levando o hepatócito a apoptose, necroinflamação e fibrose (TOLMAN; DALPIAZ, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) é um importante local para processamento de proteínas recém-sintetizadas, auxiliando na modificação pós-traducional e enovelamento adequados (BODEN *et al.*, 2011; SCHWARZ; BLOWER, 2016). Quando a capacidade de processamento do RE é excedida, a resposta a proteína desnovelada (UPR - *Unfolded Protein Response*) é ativada (BENEDICT; ZHANG, 2017). Estudos mostraram que o excesso de gordura também pode sobrecarregar o RE, promovendo uma sobrecarga de proteínas desnoveladas e estimulando a ativação da UPR (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006; PINEAU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2014).

Parte dos AGs hepáticos são originados da síntese *de novo*, que tem início com a molécula acetil-CoA e tem como produto um ácido graxo de 16 carbonos, o ácido palmítico, que ainda pode ser insaturado e/ou alongado (DIJKSTRA; HAMILTON; HAMM, 2008; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A síntese *de novo* ocorre no fígado e implica uma complexa série de reações, sendo estritamente regulada por fatores de transcrição (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Os níveis elevados de insulina, por exemplo, induzem a expressão de genes lipogênicos através da ação da Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol-1c (SREBP-1c), que se caracteriza como um fator de transcrição que colabora com a expressão de genes que favorecem a síntese *de novo* de AGs, aumentando seus níveis intracelulares (DENTIN; GIRARD; POSTIC, 2005; AMEER *et al.*, 2014).

Basicamente, a insulina, hormônio que desempenha papel fundamental na regulação do metabolismo lipídico, estimula a via glicolítica para produzir o composto orgânico acetil-CoA, que pode ser derivado do metabolismo de carboidratos ou de aminoácidos (NELSON; COX, 2014). Por ser uma molécula mitocondrial, o acetil-CoA precisa ser transportado da matriz mitocondrial para o citosol, de modo a dar início à síntese de ácidos graxos. Assim, o acetil-CoA é condensado ao oxaloacetato, formando uma molécula de citrato. O citrato, por sua vez, é transportado da matriz mitocondrial pelo translocador de citrato (CIC). Já no citosol, o citrato é novamente

convertido em acetil-CoA e oxaloacetato a partir da enzima citrato liase (ACLY), dando início a síntese de AGs (WATSON; LOWESTEIN, 1970; CHIANG, 2014). No citosol, o acetil-CoA é convertido em malonil-CoA a partir de uma carboxilação catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACC). Enquanto a ACC1 é uma enzima citosólica e desempenha função crucial na síntese de AGs, a enzima ACC2 é residente na membrana mitocondrial e tem papel na inibição da degradação de AGs, produzindo altas concentrações de malonil-CoA que podem inibir alostericamente a proteína carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), impedindo, consequentemente, a entrada de AGs na matriz mitocondrial para a β-oxidação (GOEDEKE *et al.*, 2018).

Posteriormente, a enzima ácido graxo sintase (FASN), que consiste num complexo proteico que possui múltiplos domínios, vai possibilitar a construção dos ácidos graxos, estendendo sequencialmente a cadeia carbônica do malonil numa sequência de reações de condensação, redução, desidratação e redução, respectivamente (NELSON; COX, 2014), até finalmente formar o ácido palmítico (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). O ácido palmítico pode sofrer modificações das elongases (ELOVL) e dessaturases (SCD), que por sua vez, poderão adicionar mais carbonos e duplas ligações para formar ácidos graxos de cadeias maiores, mono e poli-insaturados (CHIANG, 2014).

Após esse processo, os ácidos graxos sintetizados podem ser armazenados na forma de TGs. Na via de síntese de TGs, a enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT) adiciona acil-CoA ao glicerol-3-fosfato (intermediário do metabolismo de carboidratos), formando o ácido lisofosfatídico (LPA). Posteriormente, a 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) condensa mais uma molécula de acil-CoA para produzir o ácido fosfatídico (PA), que é desfosforilado pela lipina 1 (ou PAP), formando 1,2-diacilglicerol (DAG) (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Por fim, a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) converte diacilglicerol em TGs, que podem ser armazenados como gotículas lipídicas, exportados pela corrente sanguínea através das lipoproteínas, atuar como combustível energético e componentes estruturais nas membranas celulares (CHIANG, 2014).

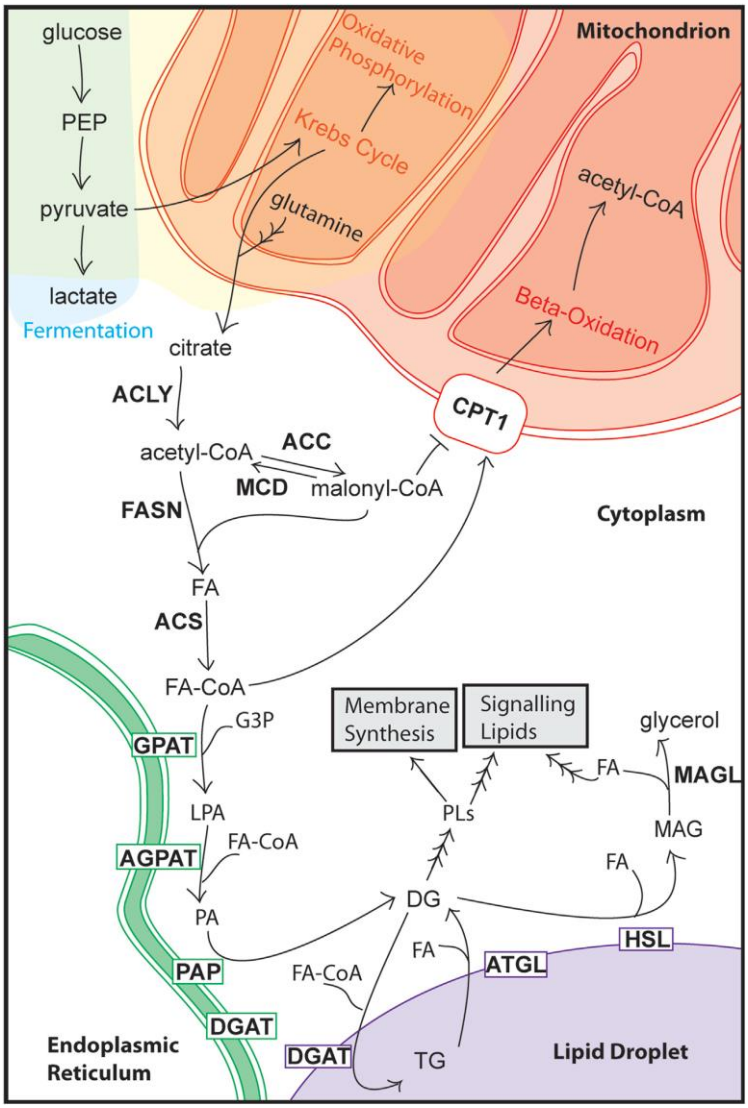
Os AGs livres podem ser derivados da síntese *de novo*, lipólise do tecido adiposo ou mesmo da dieta (LOU-BONAFONTE; ARNAL; OSADA, 2011) e entram nos hepatócitos através das proteínas de membrana, como as Proteínas de Transporte de Ácidos Graxos (FATPs), Translocases de Ácidos Graxos (CD36) (NASSIR *et al.*, 2015) e as Proteínas de Ligação de Ácidos Graxos (FABP) (SOZIO;

LIANGPUNSAKUL; CRABB, 2010). Estudos já mostraram, inclusive, que a superexpressão de um determinado tipo de FATP, a FATP5, aumenta a absorção de ácidos graxos (DOEGE *et al.*, 2006), e que a expressão de CD36 está diretamente relacionada com o acúmulo de lipídeos hepáticos (NASSIR *et al.*, 2015).

Quando os níveis de glucagon estão altos, a enzima ACC1 é inibida reduzindo a síntese de ácidos graxos. Concomitantemente, os AGs são ativados pela acil-CoA sintetase que os liga à acetil-CoA, formando acil-CoA graxo, que é transportado para o interior das mitocôndrias através da carnitina-palmitoil transferase I (CPTI) e II (CPT II), onde as reações de β-oxidação ocorrem (NELSON; COX, 2014), gerando novamente moléculas de acetil-CoA e ATP (CHIANG, 2014). A Figura 2 esquematiza a via de síntese *de novo*, armazenamento e oxidação dos AGs.

É evidente que o metabolismo lipídico é extremamente coordenado e complexo, o que torna claro que a desregulação desse metabolismo pode comprometer a função hepática e levar ao desenvolvimento de esteatose hepática. Portanto, compreender os mecanismos do metabolismo lipídico certamente contribuirá com a elucidação de detalhes da DHGNA e com a caracterização de novas moléculas potencialmente terapêuticas.

**Figura 2.** Vias de síntese *de novo* e oxidação de ácidos graxos.




Fonte: Currie *et al.*, 2013.

## 1.4 MiRNA como ferramenta biotecnológica

Desde que foi caracterizado por Lee e colegas, em 1993, diversos estudos apontam a atuação funcional de microRNAs (miRNAs) no equilíbrio celular e em patologias, incluindo DHGNA, o que o torna um elemento potencial como alvo terapêutico (GERHARD; DISTEFANO, 2015). Estudos humanos encontraram miRNAs específicos regulados positivamente em doenças hepáticas, como o miR-122. Por estar envolvido na expressão de diversos genes relacionados no colesterol hepático e metabolismo lipídico (SZABO; BALA, 2013), este miRNA mostrou ser regulado positivamente em pacientes com DHGNA, quando comparado à níveis séricos de pacientes saudáveis (HAYES; CHAYAMA, 2016).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples (com aproximadamente 18-25 nucleotídeos) que podem regular a expressão gênica pós-transcricional através do bloqueio da tradução ou clivagem de alvos específicos (JIN *et al.*, 2012) pela sua interação com regiões 3' não traduzidas (UTR) de mRNAs alvos, afetando os níveis proteicos da célula (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018).

MiRNAs são transcritos pela polimerase Pol II ou III a partir de vias canônicas ou não-canônicas (LI; RANA, 2014). Os miRNAs canônicos são transcritos como miRNA primário (pri-miRNA), que possuem muitos nucleotídeos de comprimento (centenas a milhares) (SZABO; BALA, 2013; HAYES; CHAYAMA, 2016). Essa molécula primária é, em seguida, processada pelo complexo proteico RNAse III composto pelas enzimas Drosha e Di George syndrome critical region 8 (DGCR8) (LI; RANA, 2014; WANG; CHEN; SEN, 2016), em pré-miRNA, um produto com aproximadamente 70 nucleotídeos, cuja estrutura se pareia formando estruturas tipo grampo (*hairpin*) (HAN *et al.*, 2006). Esse pré-miRNA é, então, transportado pela exportina-5 até o citoplasma, quando uma de suas fitas é clivada pela Dicer juntamente com TRBP, tornando-se um miRNA maduro de fita dupla (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018). Posteriormente, uma das fitas do miRNA maduro (normalmente a fita menos estável) é degradada por helicases, enquanto a outra fita é incorporada ao Complexo Indutor de Silenciamento (RISC), composto pelas proteínas Argonauta 2 (Ago2) e GW182, tornando-se apto para reconhecer seu mRNA alvo através da complementaridade de Watson-Crick (extremidade 5' do miRNA com a extremidade 3' de seu mRNA-alvo) (HAYES; CHAYAMA, 2016; KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018). O grau de complementaridade da região é quem vai determinar o destino do RNA mensageiro-alvo: ativação, clivagem ou repressão traducional (KRETH; HÜBNER; HINSKE, 2018) (Figura 3).

MiRNAs transcritos a partir da via não-canônica diferem da biogênese da via anterior por não terem a digestão mediada pelo complexo Drosha-DGCR8. Desta forma, os pre-miRNAs são gerados através da maquinaria de *splicing* (LI; RANA, 2014).

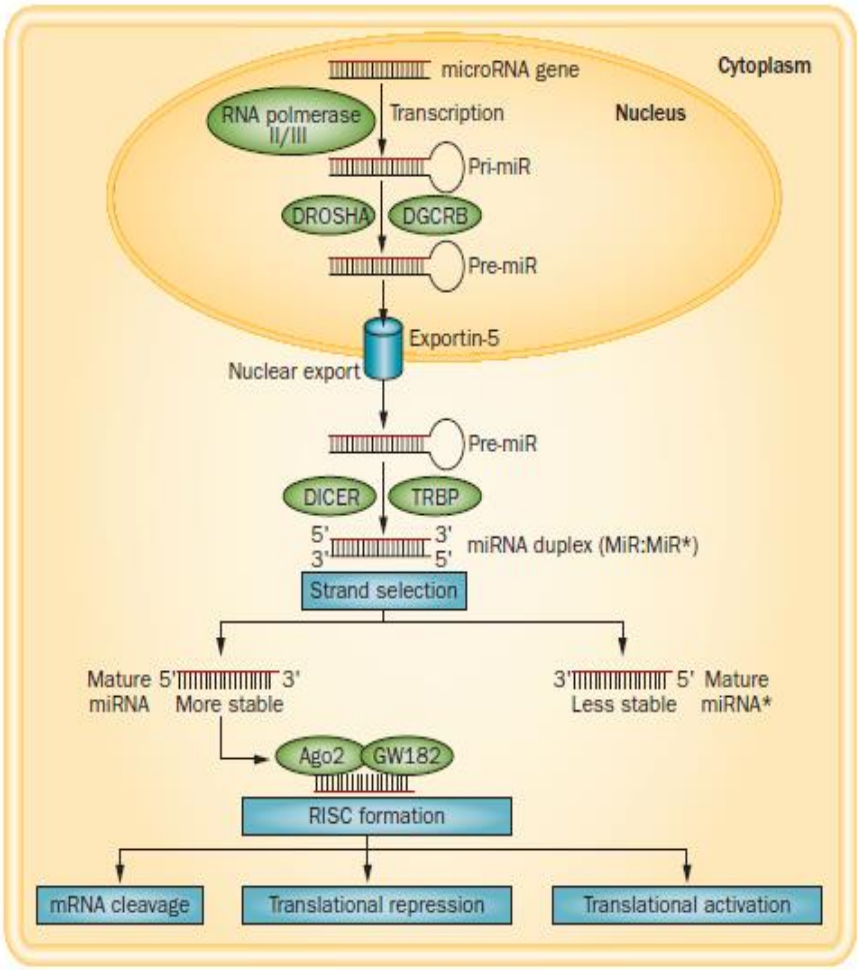
Estudos já demonstraram diversos miRNAs regulando genes envolvidos no metabolismo lipídico, confirmando sua importância na homeostase hepática (SZABO; BALA, 2013). Esses miRNAs podem ter como alvo enzimas cruciais do metabolismo lipídico, como a FASN, enzima responsável pela síntese de ácidos graxos (BHATIA; VERMA; DATTA, 2014), as carnitina palmitoil transferases (CPT) I e II, envolvidas no

processo de transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria (ILIOPOULOS *et al.*, 2010), e a SIRT1 hepática, enzima envolvida no aumento da beta-oxidação (LEE *et al.*, 2010) entre outras.

O microRNA-1914-5p possui 22 nucleotídeos, onde se localiza no cromossomo 20 (20q13.33) humano. O miR-1914 foi identificado por Li *et al.* (2015), em estudo analisando a expressão de diversos miRNAs relacionados com o câncer gástrico. Outros estudos também relacionaram a expressão do miR-1914 em outros cânceres, como o câncer colorretal (HU *et al.*, 2016) e linfoma de células T (LIN *et al.*, 2017). No que tange ao metabolismo lipídico, De Oliveira da Silva e colaboradores (2018) postularam, recentemente, a participação do miR-1914-5p na modulação do metabolismo lipídico em linhagens humanas de células estreladas hepáticas. Seus resultados mostraram que este miRNA está intimamente relacionado com a biossíntese de ácidos graxos, além de alterar o ambiente celular e contribuir para o controle da fibrogênese hepática.

Abordagens destinadas a traçar as redes de interações e atuação do miRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e, consequente a sua correlação com o processo de esteatose hepática, irão melhorar nossa compreensão sobre o seu efeito mecanístico nas doenças hepáticas**.**

**Figura 3.** Via canônica da biogênese do miRNA.




Fonte: Szabo; Bala, 2013.

## 7 CONCLUSÕES

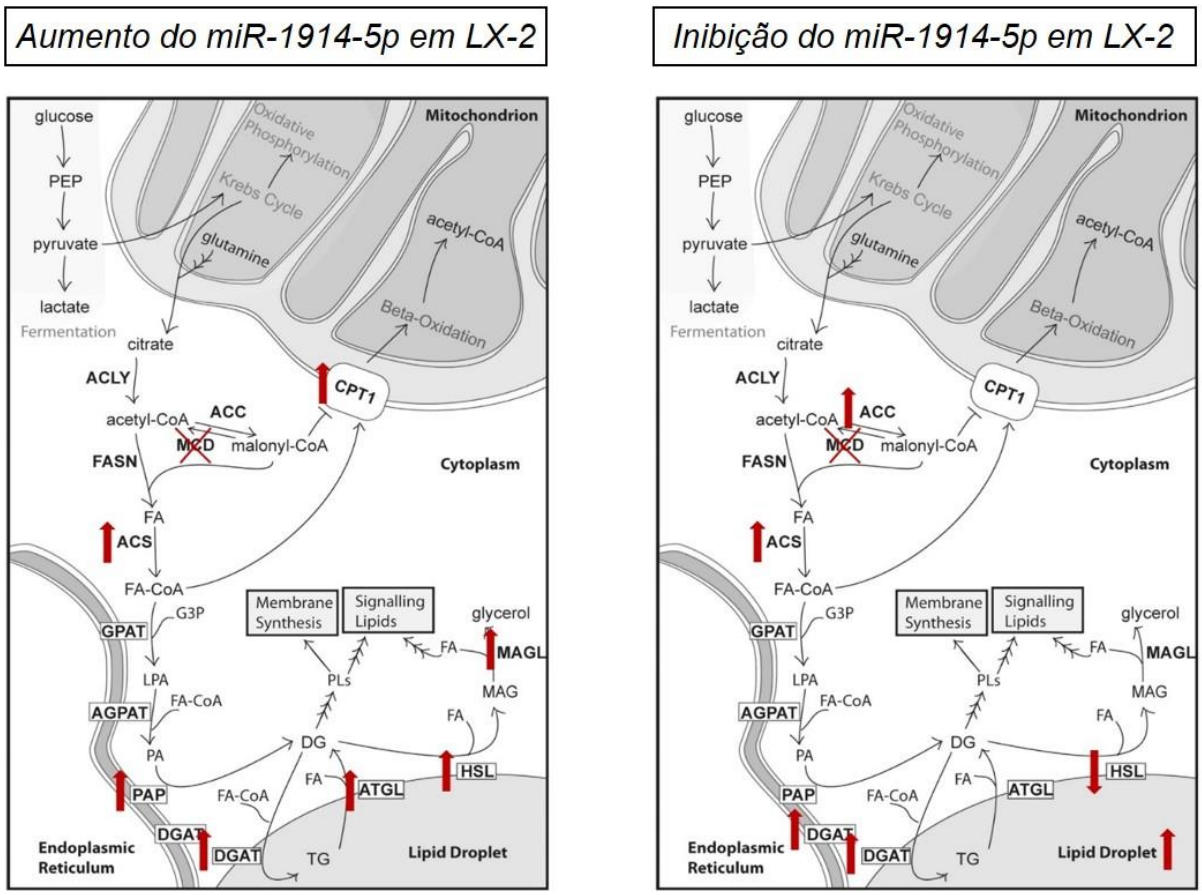
O cultivo de células transfectadas com o mímico do miR-1914-5p e incubadas com AGs mostrou um aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol intracelulares, além da modulação de genes correlatos à síntese e oxidação de lipídeos, quando comparadas à condição controle. O aumento da expressão do gene *SREBP1c*, por sua vez induz a ativação de genes lipogênicos. A diminuição dos níveis de *MLYCD*, juntamente com o aumento dos níveis de *ACC2* poderiam indicar uma grande disposição de malonil-CoA no meio. O aumento dos níveis de *ACSL4*, *lipina 1* e *DGAT2* podem sugerir um aumento na síntese de TGs e posterior armazenamento em gotículas lipídicas. Entretanto, uma maior expressão de genes relacionados à hidrólise de TGs, como *ATGL*, *HSL* e *MAGL*, poderia indicar que a célula não estaria apenas armazenando TGs, mas tentando buscar uma homeostase lipídica liberando esses AGs para oxidação. Com os altos níveis de malonil-CoA no meio intracelular, o aumento da expressão da *CPT1a* poderia indicar um efeito compensatório da célula, onde a *CPT1a* tentaria combater a inibição ocasionada pelo aumento de *ACC2*. Apesar do miR-1914-5p modular os níveis de expressão de diversos genes correlatos ao metabolismo de lipídeos, cabe ressaltar que essas análises são a nível de mRNA, o que não necessariamente implica numa maior expressão das proteínas.

Em células transfectadas com moléculas inibidoras do miR-1914-5p e incubadas com AGs, observa-se um aumento nos níveis de expressão dos genes *SREBP1c* e *ACC1*, sendo este último um gene alvo do miR-1914-5p. A baixa expressão de *MLYCD*, juntamente com o aumento de *ACC1* faz com que haja malonil-CoA para seguir na síntese de AGs. Níveis aumentados de *ACC2* produz malonil-CoA o suficiente para inibir a via da β-oxidação. O aumento de *ACSL4*, *ACSL5*, *lipina 1* e *DGAT2* sugere uma maior síntese de TGs. A baixa expressão de lipases para hidrólise de TGs poderia indicar um maior armazenamento de TGs em gotículas lipídicas, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de TGs intracelulares. A expressão dos níveis de mRNA de *SCD1* foi aumentada quando o miR-1914-5p foi inibido, pois sabe-se que o miR-1914-5p possui interação com o mRNA deste gene. É provável que, se há uma maior expressão de *SCD1*, sugere-se uma maior produção de AGs insaturados, como o ácido oleico, corroborando com o apresentado no ensaio de GC/MS (Figura 23). Apesar de supostamente aumentar a lipogênese *de novo*, a inibição do miR-1914-5p diminuiu consideravelmente os níveis de colesterol intracelulares, quando comparado à condição controle, além de mostrar ter sítios

putativos de interação com genes relacionados à via de síntese de colesterol. A partir dos resultados obtidos, a inibição deste miRNA pareceu ter um efeito mais intenso na LDN, uma vez que genes relacionados à via oxidativa não foram modulados. Os esquemas simulando os efeitos do aumento ou inibição do miR-1914-5p em células LX-2 são apresentados na Figura 34.

Podemos concluir que o efeito do miR-1914-5p parece variar em linhagens cultivadas isoladamente, tendo a confirmação de que a potencial ação deste miRNA é aparentemente fortalecida quando este é inserido em linhagens cocultivadas.

**Figura 34.** Esquema sintético do aumento ou inibição do miR-1914-5p em células LX-2.




Fonte: Adaptado de Currie *et al.*, 2013.

## REFERÊNCIAS


AHMED, E. A. et al. Review on liver steatosis and its impact on liver transplantation. **J Liv Res Dis Ther**, v. 3, n. 4, p. 00064, 2017.

ALLEN, E. S. The liver: anatomy, physiology, disease and treatment. **BIO4161, Human Anatomy & Physiology, Northeastern University**, 2002.

AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895-902, 2014.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221-1231, 2002.

BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World journal of hepatology**, v. 9, n. 16, p. 715, 2017.

BHATIA, H.; VERMA, G.; DATTA, M. miR-107 orchestrates ER stress induction and lipid accumulation by post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 4, p. 334-343, 2014.

BODEN, G. et al. Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. **Obesity**, v. 19, n. 7, p. 1366-1373, 2011.

BOURBEAU, M. P.; BARTBERGER, M. D. Recent Advances in the Development of Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) Inhibitors for the Treatment of Metabolic Disease: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 2, p. 525-536, 2015.

BROWN, Z. J. et al. Carnitine palmitoyltransferase gene upregulation by linoleic acid induces CD4+ T cell apoptosis promoting HCC development. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2018.

BROWNING, J.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.

BU, S. Y.; MASHEK, D. G. Hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 5 mediates fatty acid channeling between anabolic and catabolic pathways. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 11, p. 3270-3280, 2010.

BURRA, P. Liver abnormalities and endocrine diseases. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 4, p. 553-563, 2013.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M. ; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.

CALDER, P. C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 39, p. 18S-32S, 2015.

CARROLL, R. G. et al. An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 15, p. 5509-5521, 2018.

CASES, S. et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13018-13023, 1998.

CERQUEIRA, N. uno MFSA M. et al. Cholesterol biosynthesis: a mechanistic overview. **Biochemistry**, v. 55, n. 39, p. 5483-5506, 2016.

CHIANG, J. Liver physiology: metabolism and detoxification. **Pathobiology of human disease**, p. 1770-1782, 2014.

COHEN, P. et al. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. **Science**, v. 297, n. 5579, p. 240-243, 2002.

CSAKI, L. S.; REUE, K. Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 257-272, 2010.
CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell metabolism**, v. 18, n. 2, p. 153-161, 2013.

DA SILVEIRA, M, B. **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 do Estado de São Paulo, 2019.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”?. 1998.

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**, v. 98, p. 137-155, 2018.

DENECHAUD, P. D. et al. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 68-73, 2008.

DENTIN, R.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 81-86, 2005.

DIJKSTRA, A. J.; HAMILTON, R. J.; HAMM, Wolf (Ed.). **Trans fatty acids**. John Wiley & Sons, 2008.

DING, J. et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARα expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Scientific reports**, v. 5, p. 13729, 2015.
DOEGE, H. et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1245-1258, 2006.

DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

DUBUQUOY, C. et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 1, p. 145-153, 2011.

DUTTAROY, A. K. **Cellular proteins and their fatty acids in health and disease**. Wiley-VCH, 2003.

EL TAGHDOUINI, A. et al. In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 8, n. 1, p. 14, 2015.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 7, p. 1746, 2014.

FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der ester. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 28, n. 3, p. 3252-3258, 1895.

FRANCQUE, S. et al. PPARα gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of hepatology**, v. 63, n. 1, p. 164-173, 2015.

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

FU, Y. et al. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14140-14146, 2004.

GERHARD, G. S.; DISTEFANO, J. K. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 2, p. 226, 2015.

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

GUNDERMANN, K. J. et al. Essential phospholipids in fatty liver: a scientific update. **Clinical and experimental gastroenterology**, v. 9, p. 105, 2016.

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**, v. 5, n. 24, p. e13532, 2017.

HAAS, J. T.; FRANCQUE, S.; STAELS, B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **Annual review of physiology**, v. 78, p. 181-205, 2016.

HAN, J. et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **cell**, v. 125, n. 5, p. 887-901, 2006.

HARDWICK, J. P. et al. Eicosanoids in metabolic syndrome. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, 2013. p. 157-266.

HARDY, T. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 451-496, 2016.

HAYES, C.; CHAYAMA, K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 280, 2016.

HE, S. et al. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6706-6715, 2010.

HENSLEY, K. et al. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H2O2 generation in liver mitochondria. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 5, p. 983-989, 2000.

HETHERINGTON, A. M. et al. Differential lipotoxic effects of palmitate and oleate in activated human hepatic stellate cells and epithelial hepatoma cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 1648-1662, 2016.

HIGUCHI, N. et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology Research**, v. 38, n. 11, p. 1122-1129, 2008.

HONG, Y. et al. In vitro inhibition of hepatic stellate cell activation by the autophagy-related lipid droplet protein ATG2A. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9232, 2018.

HU, J. et al. The Plasma microRNA miR-1914* and-1915 Suppresses Chemoresistant in Colorectal Cancer Patients by Down-regulating NFIX. **Current Molecular Medicine**, v. 16, n. 1, p. 70-82, 2016.

ILIOPOULOS, D. et al. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1α and affects lipid metabolism. **Journal of lipid research**, v. 51, n. 6, p. 1513-1523, 2010.

IPSEN, D. H.; LYKKESFELDT, J.ens; TVEDEN-NYBORG, Pernille. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, n. 18, p. 3313-3327, 2018.

JIN, X. et al. Transition from hepatic steatosis to steatohepatitis: unique microRNA patterns and potential downstream functions and pathways. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, n. 2, p. 331-340, 2012.

JOIS, T. et al. Dietary macronutrient composition directs ChREBP isoform expression and glucose metabolism in mice. **PloS one**, v. 11, n. 12, 2016.

KANWAR, P.; KOWDLEY, K. V. The Metabolic Syndrome and Its Influence on Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinics in liver disease**, v. 20, n. 2, p. 225-243, 2016.

KARANJIA, R. N. et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 45, p. 9880, 2016.

KIM, J. B. Dynamic cross talk between metabolic organs in obesity and metabolic diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 3, p. e214-e214, 2016.

KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease: with 18 tables. **Springer Science & Business Media**, 2001.

KNOOK, D. L.; SEFFELAAR, A. M.; DE LEEUW, A. M. Fat-storing cells of the rat liver: their isolation and purification. **Experimental cell research**, v. 139, n. 2, p. 468-471, 1982.

KOO, S. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 3, p. 210, 2013.

KOTRONEN, A. et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 203-208, 2009.

KRETH, S.; HÜBNER, M.; HINSKE, L. C. MicroRNAs as clinical biomarkers and therapeutic tools in perioperative medicine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 2, p. 670-681, 2018.

LABRECQUE, D. R. et al. World Gastroenterology Organisation global guidelines: Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 48, n. 6, p. 467-473, 2014.

LEE, J. et al. A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12604-12611, 2010.

LEE, J. et al. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 7, p. 3190-3199, 2014.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEVENE, A. P.; GOLDIN, R. D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141-152, 2012.

LI, F. Q. et al. Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 739-47, 2015.

LI, Z.; RANA, T. M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 8, p. 622-638, 2014.

LIN, Y. et al. MicroRNA profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. **Cancer Biomarkers**, v. 18, n. 4, p. 339-347, 2017.

LISS, K.; FINCK, B. N. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimie**, v. 136, p. 65-74, 2017.

LOU-BONAFONTE, J. M.; ARNAL, C.; OSADA, J. New genes involved in hepatic steatosis. **Current opinion in lipidology**, v. 22, n. 3, p. 159-164, 2011.

LUO, D. X. et al. A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1243-1257, 2010.

MADISON, B. B. Srebp2: a master regulator of sterol and fatty acid synthesis. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 3, p. 333-335, 2016.

MANDARD, S.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 4, p. 393-416, 2004.

MARTIUS, G. et al. Hepatic fat accumulation and regulation of FAT/CD36: an effect of hepatic irradiation. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 8, p. 5379, 2014.

MASHEK, D. G. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. **Advances in nutrition**, v. 4, n. 6, p. 697-710, 2013.

MASHEK, D. G.; LI, L. ei O.; COLEMAN, R. osalind A. Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 9, p. 2004-2010, 2006.

MIN, H. K. et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Cell metabolism**, v. 15, n. 5, p. 665-674, 2012.

MORÁN-SALVADOR, E. et al. Role for PPARγ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte-and macrophage-specific conditional knockouts. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 8, p. 2538-2550, 2011.

MORAVCOVA, A. et al. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. **Physiological research**, v. 64, p. S627, 2015.

MOSLEHI, A.; HAMIDI-ZAD, Z. Role of SREBPs in liver diseases: a mini-review. **Journal of clinical and translational hepatology**, v. 6, n. 3, p. 332, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURO, E.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E.; EGGERT, U. S. Lipids in cell biology: how can we understand them better?. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 12, p. 1819-1823, 2014.

NAKABAYASHI, H. et al. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. **Cancer research**, v. 42, n. 9, p. 3858-3863, 1982.

NASSIR, F. et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. **Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167, 2015.

NASSIR, F.; IBDAH, J. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 8713-8742, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninguer**. 4a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. v. 2

NI, Y. ao et al. Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 43, p. 7666, 2017.

OZOUGWA, J. C.; EYO, J. E. Hepatoprotective effects of Allium cepa (onion) extracts against paracetamol-induced liver damage in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 26, 2014.

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

PATSOURIS, D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1508-1516, 2006.

PERTTILÄ, J. et al. PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 9, p. E1063-E1069, 2012.

PERUMPAIL, B. J. et al. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 47, p. 8263, 2017.
PÉTERFY, M. et al. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. **Nature genetics**, v. 27, n. 1, p. 121-124, 2001.

PETTINELLI, P. et al. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR-α ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of disease**, v. 1792, n. 11, p. 1080-1086, 2009.

PETTINELLI, P.; VIDELA, L. A. Up-regulation of PPAR-γ mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1424-1430, 2011.

PEVERILL, W.; POWELL, L.; SKOIEN, R. Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 8591-8638, 2014.

PINEAU, L. et al. Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids. **Traffic**, v. 10, n. 6, p. 673-690, 2009.

PIRAZZI, C. et al. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 6, p. 1276-1282, 2012.

PONZIANI, F. R. et al. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 8, p. 1055-1067, 2015.

POPEIJUS, H. E. et al. Fatty acid chain length and saturation influences PPARα transcriptional activation and repression in HepG2 cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 12, p. 2342-2349, 2014.

PURI, P. et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 1081-1090, 2007.

QIN, S.; YIN, J.; HUANG, K. Free fatty acids increase intracellular lipid accumulation and oxidative stress by modulating PPARα and SREBP-1c in L-02 cells. **Lipids**, v. 51, n. 7, p. 797-805, 2016.

RAMBOLD, A. S.; COHEN, S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. **Developmental cell**, v. 32, n. 6, p. 678-692, 2015.

RATZIU, V. et al. A survey of patterns of practice and perception of NAFLD in a large sample of practicing gastroenterologists in France. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 2, p. 376-383, 2012.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. **Pharmacological reviews**, v. 54, n. 3, p. 431-467, 2002.
RICCHI, M. et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

RISTIG, M.; DRECHSLER, H.; POWDERLY, W. G. Hepatic steatosis and HIV infection. **AIDS Patient Care & STDs**, v. 19, n. 6, p. 356-365, 2005.

ROMEO, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nature genetics**, v. 40, n. 12, p. 1461, 2008.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, v. 4, n. 1, p. 177-197, 2011.

SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **bmj**, v. 349, p. g4596, 2014.

SAYINER, M. et al. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. **Clinics in liver disease**, v. 20, n. 2, p. 205-214, 2016.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M.D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 79-94, 2016.

SEVASTIANOVA, K. et al. Effect of short-term carbohydrate overfeeding and long-term weight loss on liver fat in overweight humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 4, p. 727-734, 2012.

SHI, L.; TU, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. **Current opinion in cell biology**, v. 33, p. 125-131, 2015.

SINGH, A. B. et al. Liver-specific knockdown of long-chain acyl-CoA synthetase 4 reveals its key role in VLDL-TG metabolism and phospholipid synthesis in mice fed a high-fat diet. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 5, p. E880-E894, 2019.

SMART, E. J. et al. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29427-29435, 1996.

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**, v. 61, n. 5, p. 1282-1293, 2016.

SOZIO, M. S.; LIANGPUNSAKUL, S.; CRABB, D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. In: **Seminars in liver disease**. © Thieme Medical Publishers, 2010. p. 378-390.

STAEHR, P. et al. Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 260-267, 2003.

STUART, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. **John Wiley and Sons, Ltd., West Sussex, England. DOI**, v. 10, p. 0470011149, 2004.

SUN, S. et al. Caveolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1336-1342, 2010.

SZABO, G.; BALA, S. MicroRNAs in liver disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 9, p. 542, 2013.

THOMPSON, B. R.; LOBO, S.; BERNLOHR, D. A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 318, n. 1-2, p. 24-33, 2010.

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

TOLMAN, K. G.; DALPIAZ, A. S. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 6, p. 1153, 2007.

TSAI, J. H. et al. Aggressive non-alcoholic steatohepatitis following rapid weight loss and/or malnutrition. **Modern Pathology**, v. 30, n. 6, p. 834, 2017.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VALLIM, T.; SALTER, A. M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 82, n. 4-6, p. 211-218, 2010.

VOCK, C.; DÖRING, F.; NITZ, I. Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 5-6, p. 515-524, 2008.

WAKIL, S. J.; ABU-ELHEIGA, L. A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S138-S143, 2009.

WALCZAK, R.; TONTONOZ, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARγ in the control of lipid metabolism. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 2, p. 177-186, 2002.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M. J. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943-951, 2006.

WANG, F. S. et al. The global burden of liver disease: the major impact of China. **Hepatology**, v. 60, n. 6, p. 2099-2108, 2014.
WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 1, p. 25-30, 2016.

WANG, M. et al. Inhibition of LXR/SREBP-1c-Mediated Hepatic Steatosis by Jiang-Zhi Granule. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

WATSON, J. A.; LOWENSTEIN, J. M. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 22, p. 5993-6002, 1970.

WEI, Y. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 2, p. 193, 2008.

WELTE, M. A. Expanding roles for lipid droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470-R481, 2015.

WINDEMULLER, F. et al. Lipogenesis in Huh7 cells is promoted by increasing the fructose: Glucose molar ratio. **World journal of hepatology**, v. 8, n. 20, p. 838, 2016.

WU, S.; NÄÄR, A. M. A lipid-free and insulin-supplemented medium supports De Novo fatty acid synthesis gene activation in melanoma cells. **PloS one**, v. 14, n. 4, 2019.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 142-151, 2005.

YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathological features of fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 754-764, 2014.

YILMAZ, Y. is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 36, n. 9, p. 815-823, 2012.

YU, X. X. et al. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. **Hepatology**, v. 42, n. 2, p. 362-371, 2005.

ZHANG, X. Q. et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 7, p. 1768, 2014.