



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

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

CAMILA CRISTIANE PANSA



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

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

CAMILA CRISTIANE PANSA

Orientadora: Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

P196a

Pansa, Camila Cristiane

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

127 p. : il., tabs.

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

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: CAMILA CRISTIANE PANSA

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

COORDINADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

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

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

Documento assinado digitalmente

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



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

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



Documento assinado digitalmente

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



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

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



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

Rio Claro, 21 de março de 2023

Título alterado para:

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Isaac Newton

Resumo

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

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

Abstract

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: ácidos graxos

AHCY: adenosil-homocisteinase

AKT: serina treonina proteína quinase

ALT: alanina aminotransferase

AMPK: proteína quinase catalítica ativada por AMP

ANPEP: aminopeptidase N

APOB: apolipoproteína B

APOE: apolipoproteína E

BHMT: betaína-homocisteína S-metiltransferase

CBS: cistationina β -sintase

CES: células endoteliais sinusoidais

-CH₃: metil

CHC: carcinoma hepatocelular

ChREBP: proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos

CPT-1: carnitina palmitoiltransferase-1

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

DHF: dihidrofolato

DHFR: DHR redutase

DM2: diabetes melitus 2

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

DNMT: DNA metiltransferase

ENO1: enolase 1

ERO: espécies reativas de oxigênio

FA: *fatty acid* (ácido graxo)

FABP: proteínas de ligação de AG

FASN: ácido graxo sintase

FATP: proteínas de transporte de AG

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

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

FOXO1: forkhead box protein O1

GAPDH: gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GCKR: regulador de glucoquinase

GNAT: N-acetiltransferases relacionadas a GCN5

GNMT: glicina N-metiltransferase

GPI: glicose-6-fosfatase isomerase

GSH: glutathione

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

H1: histona 1

H2S: sulfeto de hidrogênio

H4: histona 4

HAT: histonas acetilase

HAT1: histona acetiltransferase 1

HCC: hepatocarcinoma

HDAC: histona deacetilase

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

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

HHP: hepatócitos humanos primários

HSC: células estreladas hepáticas

HSD17B13: hidroxisteroide 17 β -desidrogenase

HSP: proteína de choque térmico

IRS-1: substrato do receptor de insulina 1

KLF6: fator 6 semelhante a Kruppel

LDN: lipogênese *de novo*

LPI: fosfatidilinositol

LPIN1: lipina 1

LSEC: células endoteliais sinusoidais

LXR: receptor X do fígado

MAT: *methionine adenosyltransferase* (metionina adenosiltransferase)

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

MDH2: Malato Desidrogenase 2

MEC: matriz extracelular

miRNA: microRNA

MLYCD: malonil-CoA descarboxilase

MMP-2: matriz metalopeptidase 2

MMP-9: matriz metalopeptidase 9

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

MTHFD: metileno-tetraidrofolato desidrogenases

MTHFR: metileno-tetraidrofolato redutase

MTR metionina sintase

MTRR metionina sintase redutase

NAA40: N-alfa-acetiltransferase 40

NAD: nicotinamida e adenina

NAE: N-acil etanolaminas

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

NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferase

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

NAT: N-acil taurinas

ncRNA: non-coding RNA (RNA não codificante)

NF-κB: fator nuclear Kappa B

NLRP3: domínio de pirina contém 3

NOD: *nucleotide oligomerization domain*

NPC: células não parenquimatosas

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

OCA: ácido obetecólico

p300: acetilase transferase p300

PCB: *polychlorinated biphenyl* (bifenil policlorados)

PCG1α: receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa coativador gama

PGAM1: proteínas fosfoglicerato Mutase 1

PGK1: fosfoglicerato quinase 1

PHB1: proibitina 1

PHB2: proibitina 2

PheWAS: estudos de associação em todo o fenômeno

PI: fosfatidilinositol

PIGR: *polymeric immunoglobulin receptor*

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

PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*

PSD3: *Pleckstrin Sec7 domain-containing 3*

PTP1B: *protein tyrosine phosphatase 1B*

PVDF: difluoreto de polivinilideno

RE: retículo endoplasmático

RI: resistência a insulina

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

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

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

SHMT1: serina hidroximetiltransferase

SIRT: sirtuina

SOD2: superóxido dismutase 2

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

TG: triglicerídeos

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

THF: tetraidrofolato

TM6SF2: *transmembrane decoder 6 member of superfamily 2*

TSP: via da transsulfuração

VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa

Sumário

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

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

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

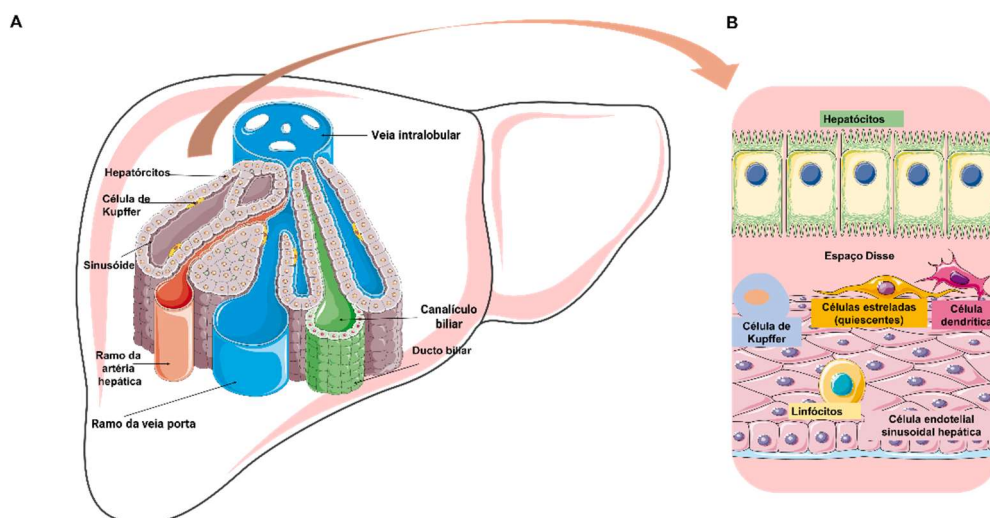
3 Resultados	71
3.1 Análise de estudos proteômicos: abordagem de bioinformática e sua validação funcional.....	71
3.1.1 Análise proteômica de co-cultura de células hepática sugere indução de pró-esteatose no modelo celular incubado com ácidos graxos e sugere atuação do miR-1914-5p em processos epigenéticos.....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

INTRODUÇÃO

1.1 Fígado: o motor do metabolismo e modulador da homeostasia

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

Figura 1. Representação histológica e estrutural do fígado.



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

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

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

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

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

1.2 Agentes etiológicos da DHGNA

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

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

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

1.2.1 Obesidade e diabetes no desenvolvimento de DHGNA

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

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

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

1.2.2 Genética e epigenética na DHGNA

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

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

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

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

induzem a degradação de HCY, e esta atividade é por meio da via da transsulfuração, anexa a via do 1C. SAM age como inibidor do MTHFR, inibindo também o ciclo do folato e ativando cistationina β -sintase (CBS), atuante da via da transsulfuração transformando HCY em cistationina. Em seguida, cistationina γ -liase produz cisteína, um precursor da glutathionina (GSH), que é o principal sistema de regulação redox nas células (MENTCH; LOCASALE, 2016; CLARE, 2019). Trata-se de uma via complexa e dependente da dieta alimentar, o que evidencia que o estilo de vida e o ambiente podem modular suas atividades.

Figura 2. Via do 1 Carbono (1C)

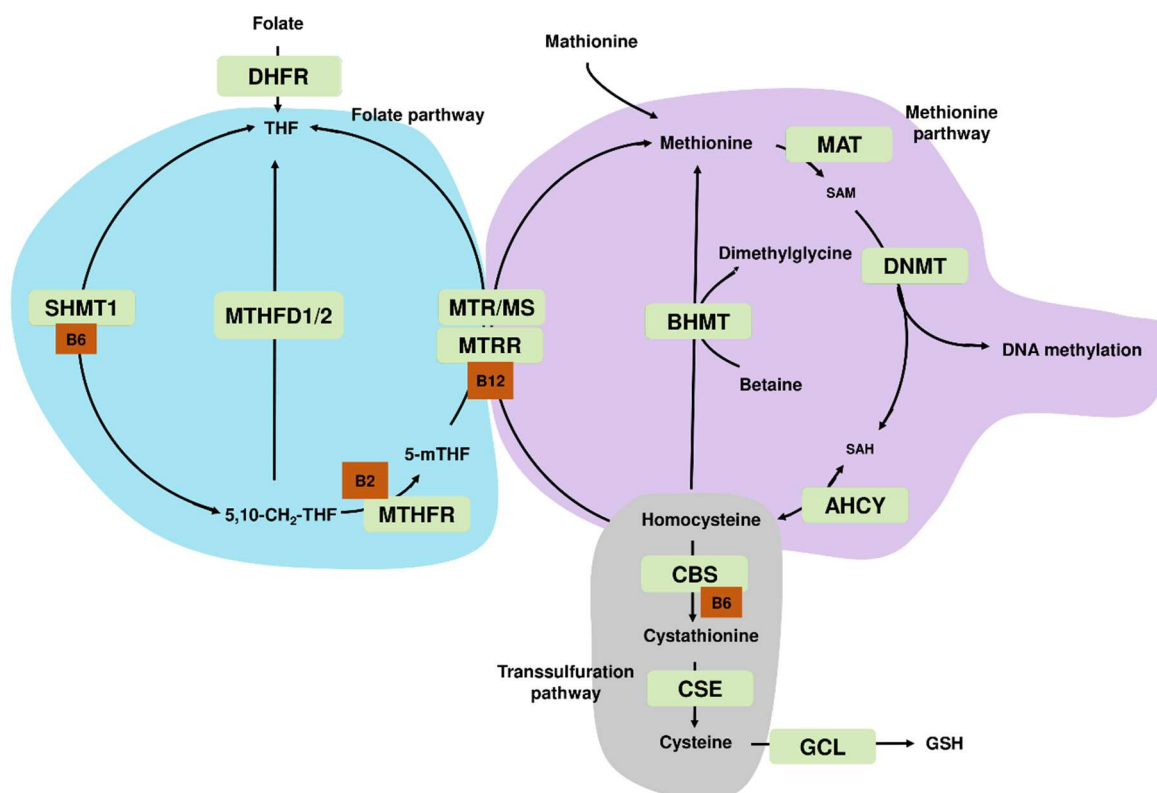


Figura elaborada pela autora, 2023, utilizando como base o artigo de CLARE et al., 2018. Ciclo do folato, metionina e um carbono (1C)

Um estudo com roedores submetidos a uma dieta rica em gordura e que desenvolveram DHGNA, apresentaram o metabolismo de um carbono interrompido, o que levou a diminuição da concentração de SAM, aumento do nível de homocisteína e à hipometilação (ausência de metilação) do DNA global no fígado (WANG, ZHANG, e ZHOU, 2014; BAKIR et al., 2019). Outros estudos onde camundongos foram alimentados com dieta livre de doadores de grupamento metil (metionina, colina, ácido fólico e betaína), desenvolveram DHGNA, e como consequência levou a diminuição da metilação global do DNA (TRYNDYAK, HAN e MUSKHELISHVILI, 2011; PAGE et al., 2016). Esses resultados evidenciam que a metilação do DNA pode modular o desenvolvimento de DHGNA, ativando

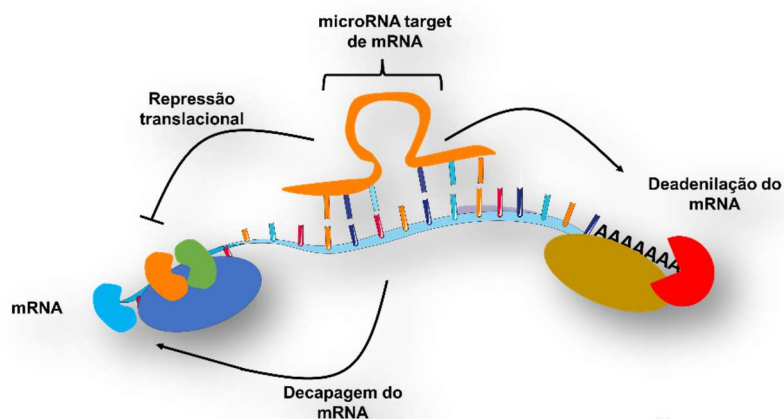
a transcrição gênica por hipometilação ou silenciando por hipermetilação (aumento da metilação) (LEE et al., 2017; LAI et al., 2019).

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

1.2.2.1 miRNA na epigenética: miRNA-1914-5p

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

Figura 4. Mecanismos de silenciamento gênico mediado por microRNA



Elaborada pela autora da tese, 2023.

Os miRNA moléculas podem atuar como moduladores epigenéticos, visando enzimas-chave responsáveis por reações epigenéticas, como DNA metiltransferases (DNMTs), histonas desacetilases (HDACs) e histonas metiltransferases (SATO et al., 2016; KWA; JACKSON; 2018, LI et al., 2018). Além disso, a expressão de miRNAs também é regulada pela maquinaria epigenética, como a metilação do DNA, modificação do RNA e modificação das histonas. Esses fatores tornam a relação entre miRNAs e a epigenética recíproca, uma vez que a epigenética regula sua expressão e os miRNAs podem regular os processos epigenéticos (YAO, CHEN, ZHOU, 2019). Neste contexto, o miRNA-1914-5p, quando filtrado no banco de dados *Target Scan Human* ([TargetscanHuman 8.0: predicted miRNA targets of miR-1914-5p](https://www.targetscan.org/vert_80/miRNA_targets.php)), foi identificado possuir diversos sítios de ligação com os mRNA de genes atuantes na via do 1 carbono e nos processos de acetilação, tais como: *MTHFR*, *MTHFDL1*, *SET*, *ACHYL*, *BHMT1* e *SHMT1* (via do 1 carbono), Sirtuína 3 (*SIRT3*) e *HDAC2*. O miRNA-1914-5p, também já foi observado no ambiente hepático modulando processos de fibrose em células estreladas hepáticas (DE OLIVEIRA et al., 2018). Portanto, apostar em um aprofundamento detalhado desses mecanismos nas patologias hepáticas torna-se promissor no sentido de se caracterizar elementos chaves que possam subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No capítulo 1 desta Tese são apresentados aspectos detalhados do assunto: genética e os processos epigenéticos na DHGNA no artigo publicado intitulado: *Non-alcoholic fatty liver disease establishment and progression: genetic and epigenetics as relevant modulator of the pathology* (*Scandinavian Journal*, DOI: <https://doi.org/10.1080/00365521.2022.2148835>)

1.2.3 Agentes xenobiontes no desenvolvimento de DHGNA

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

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

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

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

1.3 DHGNA: considerações terapêuticas

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

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

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

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

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

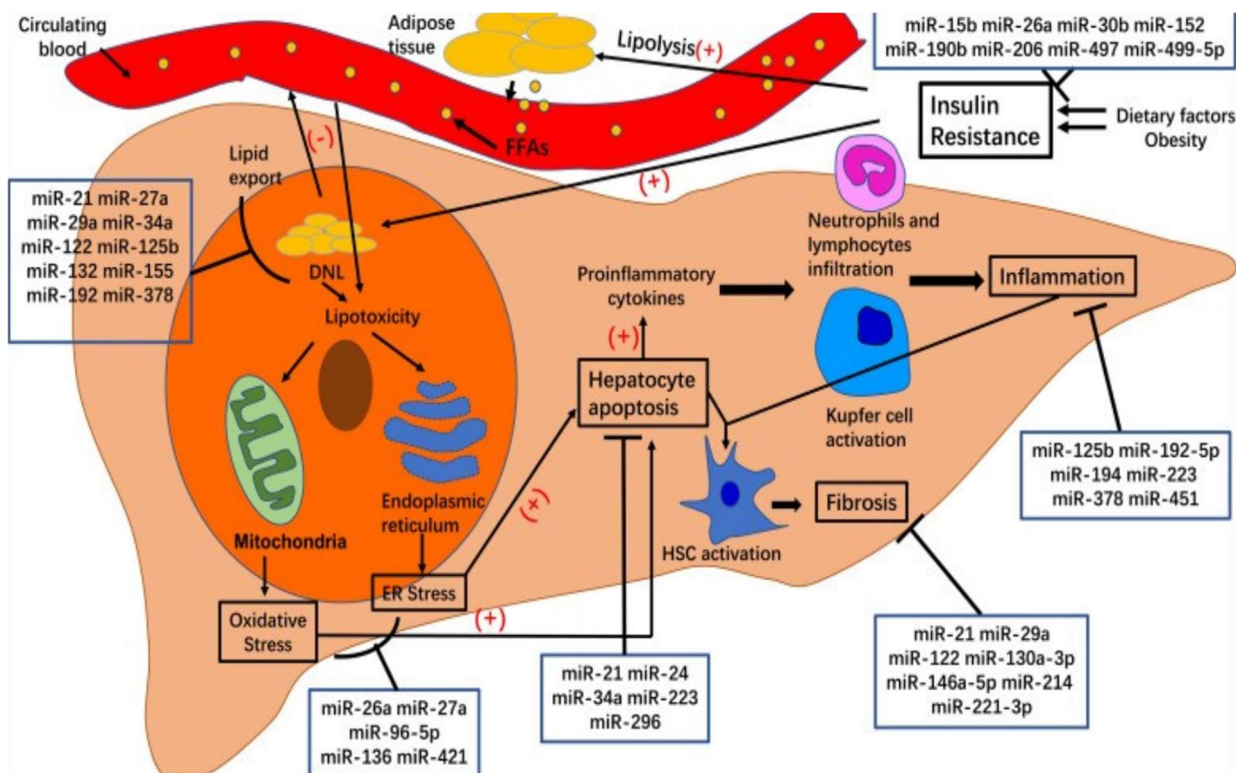


Imagem por FANG; LOU; WANG, 2021.

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a funcionalidade do miRNA-1914-5p no metabolismo pró-esteatótico em co-cultura de células hepáticas para o detalhamento mecanístico de vias moleculares visando auxiliar no direcionamento do desenvolvimento de futuras aplicações terapêuticas

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar uma revisão bibliográfica com contextos genéticos e epigenéticos no desenvolvimento e progressão da DHGNA.
- Validar análises proteômicas de co-cultivo de células hepáticas transfectadas com miRNA mimético e/ou inibidor do miRNA-1914-5p.
- Validar rotas metabólicas apontadas nos estudos proteômicos como processos epigenéticos correlatos a metilação de DNA e acetilação de histonas quando na presença de moléculas miméticas e/ou inibidoras do miRNA-1914-5p.
- Investigar e validar o papel do miRNA na modulação direta de elementos das vias do 1-carbono

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- SUN, J. et al. Long noncoding RNA FGFR3-AS1 promotes osteosarcoma growth through regulating its natural antisense transcript FGFR3. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 5, p. 427–436, maio 2016.
- TAKAHASHI, Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 19, p. 2300, 2012.
- TARASENKO, T. N.; MCGUIRE, P. J. The liver is a metabolic and immunologic organ: A reconsideration of metabolic decompensation due to infection in inborn errors of metabolism (IEM). **Molecular Genetics And Metabolism**, [s.l.], v. 121, n. 4, p.283-288, ago. 2017.
- TEUFEL, A. et al. Comparison of Gene Expression Patterns Between Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Liver Tissues From Patients. **Gastroenterology**, v. 151, n. 3, p. 513- 525.e0, set. 2016.
- THIAGARAJAN, P.; AITHAL, G. P. Drug Development for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Landscape and Challenges. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 9, n. 4, p. 515–521, jul. 2019.
- TILG, H.; EFFENBERGER, M. From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 7, p. 387–388, jul. 2020.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836–1846, nov. 2010.
- TRIVEDI, P.; WANG, S.; FRIEDMAN, S. L. The Power of Plasticity—Metabolic Regulation of Hepatic Stellate Cells. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 2, p. 242–257, fev. 2021.
- TRYNDYAK, V. P. *et al.* Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, p. 411-418, 2011.
- ULREY, C. L. et al. The impact of metabolism on DNA methylation. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. suppl_1, p. R139–R147, 15 abr. 2005.
- UMAPATHI, R. et al. Advances in optical-sensing strategies for the on-site detection of pesticides in agricultural foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 69–89, jan. 2022.
- VACHHER, M. et al. Deciphering the role of aberrant DNA methylation in NAFLD and NASH. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11119, out. 2022.
- VALINEZHAD ORANG, A.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. **International Journal of Genomics**, v. 2014, p. 1–15, 2014.
- VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931–1934, 21 dez. 2007.
- VILARINHO, S. et al. Emerging Role of Genomic Analysis in Clinical Evaluation of Lean Individuals With NAFLD. **Hepatology**, v. 74, n. 4, p. 2241–2250, out. 2021.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) tem cada vez mais se despontado como um sério problema de saúde mundial, principalmente pelo aumento do índice de obesidade. Entretanto, fatores genéticos e epigenéticos tem sido cada vez mais associados como fortes moduladores no desenvolvimento da DHGNA. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, diversas variantes gênicas foram descritas como atuante em vias metabólicas do fígado, as quais apresentam associação no desenvolvimento desta doença. Essas variantes associadas aos processos epigenéticos, os quais são modulados pelos fatores ambientais, principalmente alimentação e estilo de vida, podem aumentar a pré-disposição de cada indivíduo.

Atualmente, não há medicamentos aprovados para o tratamento da DHGNA, apenas a mudança no comportamento e estilo de vida. Portanto o aprofundamento dos estudos das variantes genéticas e da influência / impacto da epigenética no desenvolvimento da DHGNA podem contribuir para maior elucidação dos mecanismos que levam ao desenvolvimento desta doença. Neste sentido, pode-se caracterizar elementos chaves para subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Além disso, a estimativa é que nos anos seguintes ocorra o aumento da prevalência desta doença no mundo, elevando as preocupações da rede de saúde pública, pois a DHGNA, quando não tratada pode progredir para quadros graves, como cirrose e hepatocarcinoma. Diante desse contexto, no artigo a seguir do capítulo I, aborda informações e estudos sobre variantes genéticas, processos epigenéticos e miRNAs, para apontar potenciais biomarcadores como alvos terapêuticos para o controle ou tratamento da DHGNA.

REVIEW



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

Camila Cristiane Pansa , Letícia Ramos Molica  and Karen C. M. Moraes 

Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Cellular Signalling and Gene Expression Laboratory, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Rio Claro, Brazil

ABSTRACT

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) results from metabolic dysfunctions that affect more than one-third of the world population. Over the last decades, scientific investigations have clarified many details on the pathology establishment and development; however, effective therapeutics approaches are still elusive. In addition, studies demonstrated that NAFLD establishment and progression are related to several etiologies. Recently, genetics and epigenetics backgrounds have emerged as relevant elements to the pathology onset, and, hence, deserve deep investigation to clarify molecular details on NAFLD signaling, which may be correlated with population behavior. Thus, to minimize the global problem, public health and public policies should take advantage of studies on NAFLD over the next following decades.

Methods: In this context, we have performed a selective literature review focusing on biochemistry of lipid metabolism, genetics, epigenetics, and the ethnicity as strong elements that drive NAFLD establishment.

Results: Considering the etiological agents that acts on NAFLD development and progression, the genetics and the epigenetics emerged as relevant factors. Genetics acts as a powerful element in the establishment and progression of the NAFLD. Over the last decades, details concerning genes and their polymorphisms, as well as epigenetics, have been considered relevant elements in the systems biology of diseases, and their effects on NAFLD should be considered in-depth, as well as the ethnicity, clarifying whether people are susceptible to liver diseases. Moreover, the endemicity and social problems of hepatic dysfunction are far to be solved, which require a combined effort of various sectors of society.

Conclusion: Hence, the elements presented and discussed in this short review demonstrated their relevance to the physiological control of NAFLD, opening perspectives for research to develop new strategy to treat fatty liver diseases.

ARTICLE HISTORY

Received 12 August 2022
Revised 13 October 2022
Accepted 13 November 2022

KEYWORDS

Liver disease; genetics and epigenetics of the steatosis; metabolism and molecular connections; ethnicity and diseases; public health

Introduction

NAFLD affects many people in the world and has been responsible for increased mortality and comorbidity rates. Over the last decades, many efforts have been made to improve treatments; however, the fine-tuning that controls the molecular connectors in liver diseases must be elucidated. More recently, ethnicity has been considered as a relevant factor in NAFLD establishment and progression, because of the diverse genetic backgrounds and behaviors that are observed in different communities. Thus, in this short review we highlight relevant aspects of biochemistry, genetics, epigenetics, and ethnicity to provide basic understand of those relevant mechanisms on NAFLD establishment and progression.

Basic overview of non-alcoholic fatty liver progression and its modulators

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) affects more than a third of the entire global population [1,2] and is responsible

for several comorbidities or even death [3]. In its initial stages, the pathology causes no symptoms in many people [4]. However, NAFLD may progress to a more serious clinical condition, such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis/cirrhosis, or even hepatocarcinoma (HCC) in some patients [5,6]. Over the last year, a considerable number of studies have attempted to clarify mechanistic details that support the development and progression of liver pathologies [7,8], aiming at innovative approaches for the treatment or control of the disease progression. Unfortunately, until now, effective treatments are still scarce and fundamentally based on diets and lifestyle changes [9].

Physiologically, NAFLDs are established when lipids accumulate in percentages equal to or above 5% of the liver weight [10,11], because of excessive amounts of free fatty acids and cholesterol available in tissues. Persistent accumulation of lipids in the liver can lead to organ dysfunction, which may damage it and cause cell death because of an exacerbated increase in oxidative stress. This situation contributes to homeostasis disruption in the liver, favoring

CONTACT Karen C. M. Moraes  kcm.moraes@unesp.br  Instituto de Biociências, Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

metabolic dysregulation and disease progression [12]. A marker of NAFLD progression is the onset of the inflammatory process, which characterizes NASH [12,13]. At this stage, hepatic stellate cells are activated and produces increase amount of extracellular matrix and collagen, which contributes to the development of liver fibrosis, cirrhosis, and, eventually, HCC [14,15].

Nowadays, it is well-known that liver diseases have several etiologies, among them are metabolic dysfunctions [16], unhealthy eating habits [17], insufficient physical activity [18], the genetic background of individuals [2], and even viruses and parasites infections [19] can be pointed as NAFLD agents. However, obesity has been considered an alarming element in the establishment of the NAFLD around the world. This pathological condition may cause insulin resistance and either the development of type 2 diabetes mellitus (DM2) or metabolic syndromes, which collaborate with disruption of the body's homeostasis and establishment of liver diseases [20,21]. Moreover, heredity can strongly influence the predisposition of an individual to develop liver diseases [2,18,22]. Studies focused on family aggregation and similarities between twins in disease susceptibility have corroborated the strong heritability effects on NAFLD establishment [23], which is influenced by gene penetrance, expressivity, and even, gene polymorphisms [24]. Furthermore, recent advances in technologies such as large-scale gene sequencing, total exome investigation, proteomics, and bioinformatics analysis, among other modern tools, have collaborated to the identification and characterization of many genes correlated with liver dysfunctions [2,25]. Particularly, genome-wide association studies (GWAS) have become the gold standard methodology to determine genotype-phenotype correlations in individuals, and contributed to the identification of millions of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome [2]. GWAS also corroborated previous information concerning particularly gene functions in populations and its combined analyses with the phenome-wide association studies (PheWAS), an unbiased systematic investigation between genetic variants and phenotypes in large groups of individuals, reinforce the pleiotropic effects of several genes [2,26]. Thus, based in those scientific information, functional activity of genes correlated with the hepatic lipid metabolism and single nucleotide polymorphisms, were addressed. Among the evaluated genes, the protein 3 containing patatin-like phospholipase domain (*PNPLA3*), transmembrane decoder 6 member of superfamily 2 (*TM6SF2*), hydroxysteroid 17 β -dehydrogenase (*HSD17B13*), and peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR*) alpha, among others, have been explored in-depth [24,27]. Moreover, multicenter case-control studies demonstrated the functions of genetic variants of membrane-bound *O*-acyltransferase domain-containing 7 (*MBOAT7*) [28], superoxide dismutase 2 (*SOD2*) and Kruppel-like factor 6 (*KLF6*) in aspects of liver disease as insulin resistance, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis, respectively [29]. Other studies also correlated genetic polymorphism with the evolution of NAFLDs to more severe clinical conditions as HCC [30,31].

Besides genetic elements, the epigenetic mechanisms are important in the establishment of liver dysfunctions [32]. Epigenetics affects gene expression without interfering in primary DNA sequence by changing chromatin structure, DNA methylation, and expression of non-coding RNAs that can modulate gene expression of relevant elements in NAFLD control [33–35]. Furthermore, epigenetic processes are modulated by environmental changes such as diet, disease, pollution, or lifestyle that allow organisms to adapt and survive under negative stimuli. This process creates markers on DNA and, in some cases, can be passed to the next generations, which should be considered for the treatment of hepatic diseases.

Thus, considering the above information, the present study aims to discuss NAFLD relevant factors in an integrated and systematic way, to point out potential biomarkers as therapeutic targets for its control or treatment.

Lipid metabolism as a relevant mechanism for NAFLD establishment

The liver is a functional gland in body that plays relevant role in controlling energy metabolism, fine-tuning lipid synthesis and degradation [36]. In NAFLD, the energetic metabolism is disrupted [1,24], leading to an expressive accumulation of triglycerides (TG), a characteristic finding in the establishment of the pathology [37]. Thus, a considerable number of studies described detailed aspects concerning the mechanisms that support liver dysfunctions and lipid accumulation [38–40]; however, many questions are still open for the development of a safe and efficient therapeutic approach to treat NAFLD and correlated hepatic dysfunctions.

Lipid molecules act on cellular integrity by their functional activity in the maintenance of biological membranes and cellular signaling [41–43]. However, under some physiological situations, such as weight gain, diabetes, or metabolic syndromes, for example, the adipose tissue expands, causing its dysfunction and even death of the adipocytes [44] that results in impaired lipid storage, favoring free fatty acids (FFA) release into the circulation. These molecules can be captured by the hepatocytes through the fatty acid transport proteins (FATPs) or by the fatty acids translocases as CD36 protein. Accumulation of FFA in the hepatocytes favors an excessive TG synthesis, which contributes to the establishment of steatosis [45–47]. Under high-calorie fat (HDF) diets, the body changes its metabolism to minimize TG accumulation, favoring fatty acid oxidation within the mitochondria [48,49]. To support such metabolic pathways, AMP-activated catalytic protein kinase (AMPK) is activated, followed by induction of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC)-1-alpha, which activates peroxisome receptor (PPAR) and proliferator proteins [50]. Next, PPAR activates enzymes involved in fatty acid (FA) metabolism, including carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) and acyl-CoA dehydrogenases, which facilitates FFA translocation into the mitochondria, allowing β -oxidation and energy production [51]. However, when FFA overloads a cell, acetyl-CoA is generated in excess and cause lipotoxicity. Such toxicity

increases the malonyl-CoA production, which inhibits CPT1 and decreases β -oxidation rates, accumulating even more TG and secreting very-low-density lipoprotein (VLDL) [45–47]. This lipid accumulation inside hepatocytes increases the production of reactive oxygen species (ROS) [51], which are deleterious to the tissue and disrupt the homeostasis of the liver, leading to insulin resistance and metabolic syndromes, as well as NAFLD establishment and progression [52–54].

Mechanistically, oxidative stress and lipid peroxidation activate nuclear factor Kappa B (NF- κ B) subunit 1 and the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8), causing apoptosis and necrosis in hepatocytes [55]. Furthermore, a reduced level of catalase enzymes has also been observed, which compromises detoxification and favors mitochondrial damage in hepatocytes [56]. These processes can result in liver cell damage and the release of molecules known as mitochondria-derived damage-associated molecular patterns (DAMPs) [57]. DAMP molecules activate the nucleotide oligomerization domain (NOD) and the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), which, in turn, activate the inflammasome pathway [51,57]. Those molecules also interact with hepatic stellate cells and Kupffer cells, which stimulate innate and fibrogenic immune responses, favoring the NAFLD-to-NASH progression [43,57] (Figure 1) and a toxic environment [58] that favors the biochemical processes correlated with the manifestation of liver metabolic syndrome.

The genetic influence on NAFLD

Over the last decade, genetics and the environment effects on gene expression have been highlighted in NAFLD establishment and progression [2,59]. Moreover, epidemiological studies revealed that NAFLD progression to more deleterious conditions correlate with the heritability of relevant genes in liver homeostasis [2,24]. Comparative studies between groups of monozygotic and dizygotic twins, correlated aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities with fat liver content, which demonstrate strong influence of heritability on NAFLD among the monozygotic siblings [23,60,61]. Heritability indexes and NAFLD establishment have also been investigated in groups of families with or without the pathology by magnetic resonance imaging (MR-PDFF) analyses [61–63]. In addition to these studies, subsequent *in vitro* and *in vivo* analyses have evaluated and validated the functionality of genes and their polymorphisms in NAFLD hepatic metabolism [2,27].

Genetic polymorphism is present in all over genome and plays effects in hepatic metabolism and diseases. Among the investigated genes, changes in the sequence of the insulin receptor substrate 1 (*IRS-1*) gene at 972Arg reduces serine-threonine protein kinase (AKT) activation [64]. This protein is central to cellular homeostasis because plays major effects in inducing insulin resistance signaling pathways, widely observed in obese patients with NAFLD [65,66]. Other studies

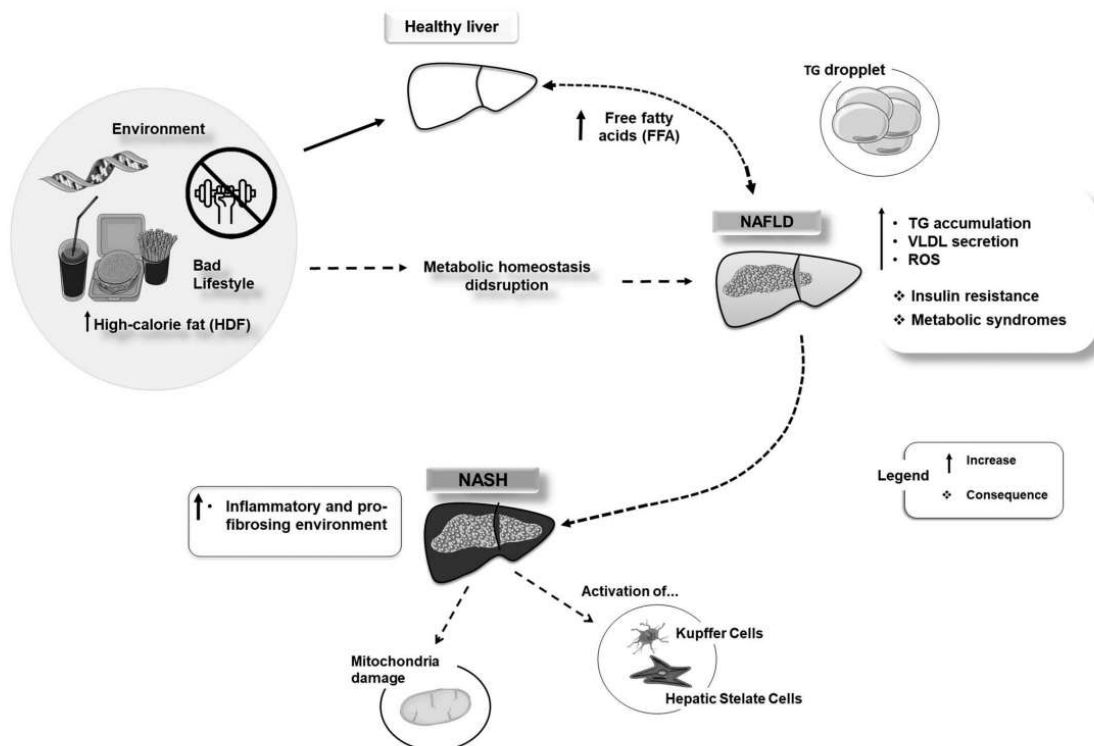


Figure 1. Schematic representation of NAFLD establishment and progression. The illustration presents relevant etiological agents.

demonstrated the correlation of the *GCKR* C>T polymorphism (rs780094) with triglyceride levels increased and facilitated the hepatic fibrosis establishment [67]. This polymorphic variant may favor organ fibrogenesis establishment by affecting the expression of nearby genes and, specifically, triggering a low-grade chronic inflammation due to the high level of expression of C-reactive protein (CRP) [68].

Another investigated genetic polymorphism is found in the membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 (*MBOAT7*) gene that synthesizes lysophospholipid acyltransferase 7, a member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) superfamily, characterized as a multispanning transmembrane protein that transfers acyl groups in a cell, which metabolizes lysophosphatidylinositol (LPI) into phosphatidylinositol (PI) [69,70] in the Lands cycle. In this metabolic route, the arachidonoyl-CoA (20:4) is added to the LPI, resulting sn-1-stearoyl-sn-2-arachidonoyl PI species [69,70]. *MBOAT7* plays relevant roles in the body and among the functions it collaborates with the liver homeostasis. In humans, mutations in *MBOAT7* or genetics polymorphism was implicated in several diseases [71]. Particularly, in individuals carrying the most common *MBOAT7* genetic variant (rs641738 C>T), present reduced level of the its protein, which remodel the liver content inside the hepatocytes, facilitating LPI accumulation, NAFLD establishment and even the NAFLD-NASH progression [70]. In addition, other studies also demonstrated that the *MBOAT7* gene deletion induces the synthesis of SREBP1c increasing the *de novo* lipogenesis [71] and the functional inactivation of the protein, which increases LPI. Those biochemical changes in liver favor liver necroinflammation and organ fibrosis; however, mechanistic details are still not clear understood [72]. Aiming at a better clear understanding about *MBOAT7* function investigations using cell culture, animal models and even human samples have been largely developed using modern scientific tools [71,73], which in a near future would be useful in clinical trials.

Further studies addressing functional activities of different genes, described genetic variants of elements that regulate lipid metabolism in the liver, which may contribute to the steatosis establishment. Several genes were pointed and among them, the hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 13 (*HSD17B13*) was found to be associated with NAFLD progression. This gene drives the synthesis of one of the most abundant hepatic proteins, associated with lipid droplet synthesis [74] and several NAFLD-associated polymorphic variants were described [75]. Considering the variant rs6834314, this is associated with increased serum alanine transaminase (ALT) levels and metabolic syndromes establishment [76]. Two others *HSD17B13* variants (rs72613567 and rs62305723) were also associated with NAFLD progression [77]. Furthermore, *HSD17B13* overexpression in mice caused increased lipogenesis and FA contents in their livers. Combined, these findings, reinforce the relevance of the *HSD17B13* in the liver homeostasis and this relevant functional activity.

In addition, other relevant gene correlated with the establishment of NAFLDs, *PNPLA3*, also known as adiponectin (*ADPN*), should be considered. This gene transcribes a

multifunctional protein in lipid metabolism and presents polymorphic variations [2,24]. The variant rs738409 C>G, p.I148M results in amino acid replacement from isoleucine to methionine within the protein sequence. Such nucleotide variation causes TG accumulation due to an enzymatic lipolytic activity reduction, which increases the risk of liver diseases and mortality in NAFLD patients [78,79]. More recent findings demonstrated that the I148M variant presents elevated IL6/STAT3 activity which contributes to the risk of NAFLD [80]. The I148M alteration in the *PNPLA3* sequence is also associated with changes in the activity of hepatic stellate cells (HSCs) that once activated by the deleterious environment, contributes to the organ fibrosing and NAFLD-to-NASH progression [1,24]. Particularly, *PNPLA3* gene and protein expression increases in activated HSCs and during the progression of liver fibrosis from patients with NASH [81]. In those cells, studies demonstrated that the *PNPLA3* expression is regulated by the availability of retinol esters and correlated molecules; high retinol contents activate the enzyme which promotes the extracellular release of this class of lipid, remodeling the lipid droplets in the stellate cells [82,83]. Moreover, studies demonstrate that the increased expression of *PNPLA3* protects the HSC from the production and release of proteins that stimulates fibrogenesis as metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase as protective effect against organ fibrosis and liver disease progression [83]. In the I148M variant there is an impairment of the retinol release from primary HSCs, which lose their functionality to control pro-fibrosing elements expression, both *in vitro* and *in vivo* [82,83]. Combined those findings demonstrated the relevance of the *PNPLA3* to the homeostasis of liver function.

Another important gene in NAFLD manifestation is *TM6SF2*, which encodes a lipid transporter protein highly expressed in the liver and small intestine [84,85]. The *TM6SF2* protein has transmembrane domains located in the endoplasmic reticulum and the ER-Golgi intermediate compartment of human liver cells. The balanced activity of *TM6SF2* maintains normal levels of VLDL secretion and changes in the protein activity contributes to the development or progression of NAFLD [85]. Several studies demonstrated that the *TM6SF2*s protein inhibition increased cellular TG concentration and lipid droplet contents, while *TM6SF2* overexpression reduced steatosis [86]. In addition, considering the *TM6SF2* polymorphism, the variant rs58542926 (E167K) is able to increase fat content in the hepatocytes, as it decreases apolipoprotein B (APOB) secretion, due to increased degradation rates of APOB. These data are consistent with the observation that decreased FA transfer as nascent VLDL contributes to intrahepatic fat accumulation in *TM6SF2* E167K carriers [87].

Moreover, considering the apolipoproteins and their functional activities in liver, the APOE is a protein that plays relevant function in lipid metabolism and its transport in the body [88]. APOE is a core component of plasma lipoprotein and associates with different lipid sizes from chylomicrons to high-density lipoproteins (HDL) helping the clearance of those fat molecules in plasma and its function is relevant to liver homeostasis [88]. There are three common APOE alleles

(APOE2, APOE3, APOE4) originated from slight differences in DNA sequences, considering their polymorphism. The relevance of this protein was demonstrated in different studies. In Niu et al. [89], plasma proteome profiling of 48 randomized patients (with and without cirrhosis or NAFLD) presented significant modulation in proteins, and a global correlation map of clinical and proteomic data strongly associated genes as dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), aminopeptidase N (ANPEP), transforming growth factor-beta-induced protein ig-H3 (TGFB1), polymeric immunoglobulin receptor (PIGR), and APOE. Moreover, studies with knockout mice APOE^(-/-) demonstrated a delayed lipoprotein clearance favoring dysfunction in the organ [90]. Also, other GWA studies in different population correlated the APOE (s429358) with fatty diseases even from different etiologies as excessive alcohol intake [91]. Combined, the investigations reinforce the relevance of APOE in fatty liver diseases.

Thus, based on the above contextualization about genetic effectors on NAFLD, research have been conducted to explore potential positive effectors that modulates fatty liver diseases and NAFLD. In Mancina et al. [92], for example, a large-scale and robust study with large number of patients, demonstrated important functional activity to the locus

produces a functional protein that decreases the susceptibility of fatty liver disease or even its progression to more deleterious stage. This protein, also known as EFA6R belongs to a family of protein characterized as guanine nucleotide exchange activity, which plays relevant function in endosomal trafficking and cytoskeleton. The relevant function in controlling hepatic lipid metabolism demonstrated by the authors, even in *in vitro* or in *in vivo* assays, might be consider as a potential tool for future therapeutic option to treat fatty liver, and reinforces the relevance of new technologies in finding strategies for better quality of life.

Considering all the the discussions, Table 1 summarizes the above contextualized genetic elements that modulates NAFLD.

At physiological level and based on the current scientific knowledge on NAFLD, genetics is a strong element that influence liver diseases establishment. After the genome sequence at the earliest 2000', and the advances of technology and molecular sciences so far have been contributed with the clarification of molecular mechanisms that explain the onset of NAFLD. However, new agents on the pathology establishment and progression must be consider as the environmental effects. Over the last two decades, epigenetics has been pointed as a master switch element for gene

Table 1. Relevant genes polymorphism and their functional activity in liver diseases.

Gene	Metabolic function	Variants	Variant's role in NAFLD	Phenotype	Experiment	Reference
APOE	Lipid transport	rs429358	Increases ATL levels	NAFLD	Plasma proteome profiling of patients with and without cirrhosis or NAFLD	[89]
GCKR	Regulating de novo lipogenesis	rs780094	Loss the function and disturbed in the regulation of de novo lipogenesis	NAFLD, fibrosis	Meta-analysis with patients data	[67]
GPAM	Catalyzes the initial step of TG synthesis	rs2792751	Increases ATL levels	NAFLD	Exome-wide level in participants from the UK Biobank	[91]
HSD17B13	Lipid remodeling; lipid synthesis	rs6834314	Increases ALT and metabolic syndrome	NAFLD	Genoma-wide with patients data	[75]
IRS-1	Cellular homeostasis	972Arg	Insulin resistance	NAFLD	Obese patients with NAFLD	[65,66]
MBOAT7	Conversion of LPI to PI in the liver; Lipid remodeling	rs641738	Increases the accumulation of LPI inside the cells; LPIs become exogenous and activate inflammatory processes in CHS; Activates SREBP-1 and increases DNL level	NAFLD, NASH, fibrosis	Mice experiment, analysis of human biopsy of patients with the rs641738C > T gene with liver inflammation and fibrosis in NAFLD patients; Hepatocyte-specific MBOAT7 knockout mice to investigate the function of <i>in vivo</i> mboat7 and MBOAT7 depleted in cultured human liver cells using CRISPR-Cas9 or siRNA systems	[70,71]
PNPLA3	Lipase enzyme, on lipid droplets, remodel phospholipids, triglycerides, and releases retinyl esters	rs738409	Reduces lipolytic activity and increases the level of TG; Palmitate esterase activity is reduced and leads to an increase in lipids within HSC cells, which activates fibrogenic conditions in the cells.	NAFLD, fibrosis, NASH	Analysis with individuals in a hospital in Italy diagnosed with NAFLD; HSCs from primary human cells and in a human cohort of individuals with nonalcoholic fatty liver disease	[79,81,82]
PSD3	Regulates endosomal traffic and cytoskeleton remodeling	rs71519934	Reduction of genes involved in cholesterol synthesis and TG synthesis	Protects the liver from NAFLD	Analysis with individuals with a measurement of hepatic triglyceride	[92]
TM6SF2	Lipid transport and balance of VLDL levels	rs58542926	Increases fat content in hepatocytes as it decreases apolipoprotein B (APOB) secretion due to increased APOB degradation rates	NAFLD, NASH	3D spheroids from primary human hepatocytes from five different donors	[87]

chromatin can modulate gene expression at the transcriptional level in response to unbalanced diet, predisposing the individual to NAFLD [94,95]. However, epigenetic mechanisms and their correlations with NAFLD establishment and progression still needs further investigation.

Epigenetics in NAFLD

Over the last two decades, epigenetics and epigenomics have emerged as gene expression and cellular homeostasis controllers, assuming a relevant position in biomedical research [96]. Experimental and clinical studies suggested that epigenetics can potentially affect the development and progression of metabolic disorders, such as NAFLD [22,35,96]. In addition, the epigenetics is characterized by heritable and/or reversible changes in gene expression [93] in response to environmental conditions as unhealthy lifestyle. However, such changes in gene expression correlates to modifications in chromatin ultrastructure and transcription without interferences in the DNA sequence [22,33,93,96]. Canonically, epigenetic mechanisms are divided into three categories: (1) changes in the packaging pattern of chromosomes by post-translational histone modifications (methylation and acetylation), (2) DNA methylation, and (3) modulatory effects of non-coding RNAs [95,96].

Since epigenetics is reversible in most situations, understanding its patterns and mechanisms in diseases will contributes to the development of new therapeutic approaches and diagnosis for NAFLD treatment avoiding its progression to more deleterious condition [93]. However, studies are still

limited and their contributions to NAFLD metabolism regulation are scarce [2].

Histones and their modulators in NAFLD

Histones are proteins widely expressed in the genome because their relevance to the chromatin structure and gene expression [97]. Histones can be post-translationally modified at their amino acid residues in response to physiological and pathological conditions, or by environmental stimuli. Considering histone modifications, the following alterations are frequently found: (1) lysine acetylation/deacetylation; (2) phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine; (3) methylation of lysine and arginine; (4) other mechanisms including deamination, ADP ribosylation, ubiquitination, sumoylation, proline isomerization and addition of N-acetylglucosamine [22,97]. All these changes in histones contributes to the chromatin remodeling and gene expression changes.

Considering the histone acetylation, this is a mechanistic process catalyzed by histone acetyltransferases (HAT) and facilitates gene transcription, while histones deacetylation is catalyzed by histone deacetylase (HDAC) and induce gene silencing [97] (Figure 2). Histone acetylation depends on the conversion of glucose-derived citrate to acetyl-CoA. Thus, nutrient metabolism is linked to the control of this epigenetic mechanism [33,98]. HATs are classified according to their subcellular location. Type A HATs are mainly localized in the nucleus as GCN5-related N-acetyltransferases – (GNATs), p300/CBP, and TAFII250, whereas type B HATs act predominantly in the cytoplasm as HAT4 (N-alpha-acetyltransferase 60 NAA60) [99,100]. In turn, HDACs remove acetyl groups from

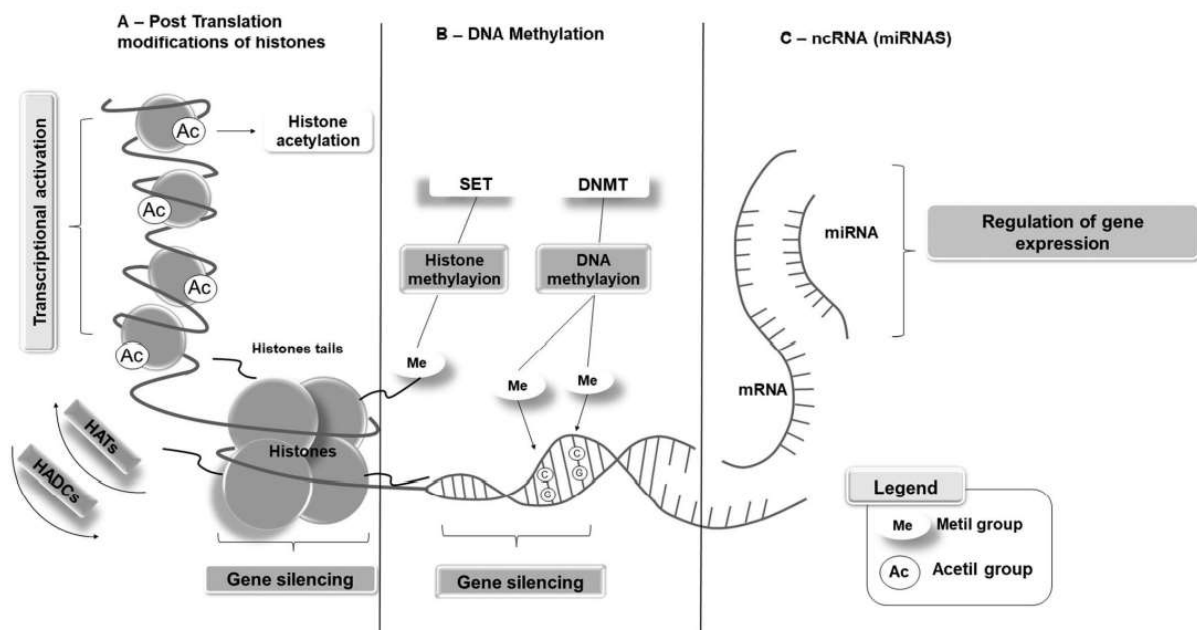


Figure 2. Epigenetics and NAFLD. Schematic illustration of epigenetic mechanisms that contribute to NAFLD establishment are represented. Canonically, epigenetic mechanisms are divided into three categories: (A) post-translational modifications of histones and chromosome packing, (B) changes in the DNA methylation pattern, (C) action of ncRNAs microRNAs. In the Figure, relevant elements are pointed. Histone acetyltransferase (HATs), histone deacetylase (HDAC), methyltransferases (DNMTs), SET nuclear proto-oncogene (SET), microRNAs (miRNAs) are represented.

ϵ -N-acetyl-lysine residues of histones, and they are subdivided into four classes according to their structure, enzyme function, and subcellular location [101]. HDACs deacetylate histone or non-histone proteins, mediating responses to metabolic stress, insulin secretion control and adipogenesis [102]. Seven type III HDACs have been identified in humans (SIRT 1 to 7), with different subcellular locations, some in the nucleus and others in the cytoplasm (SIRT1, 2) and mitochondrial (SIRT 3, 4, 5) [103]. Thus, the proper orchestration between HAT and HDAC enzyme levels influences histone acetylation status and expression of genes that lead to pathology.

Among HATs, the transcriptional coactivator p300 is activated by glucose levels and induces hyperacetylation of *ChREBP*, stimulating its transcriptional activity and contributing to NAFLD development, by the activation of lipogenic and glycolytic genes [33,104]. Together, these findings suggest that the inhibition of hepatic p300 may be beneficial for the treatment of fatty liver and type 2 diabetes [92]. Moreover, Charideumo et al. [105] investigating murine hepatocytes demonstrated a direct correlation among the functional activity of N-alpha-acetyltransferase 40 (NAA40) and lipid metabolism. When reduced the activity of NAA40, lipid synthesis is stimulated by an indirect effect of the protein on insulin metabolism.

Considering the HDACs, several studies demonstrate relevant activities of HDACs on NAFLD. Among the studies and investigated molecules, sirtuin (SIRT) activities were explored [106,107]. In mammals, studies have focused on SIRT1 and demonstrate that it regulates gluconeogenesis by activating forkhead O1 (FOXO1). Moreover, SIRT1 decreases glycolysis via PCG1 α and contributes to fatty acid oxidation by activating PPAR α and inhibiting DNL by the degradation of SREBP1c [108]. Another molecular target of SIRT1 is macroH2A1, a version of histone H2A, present in two isoforms, macroH2A1.1 and macroH2A1.2, implicated in lipid metabolism in hepatocytes. Both isoforms were down-expressed in HCC, while macroH2A1.2 was strictly over-expressed in steatosis [109]. Increased expression of the SIRT1 binding metabolite macroH2A1.1 protects hepatocytes from lipid accumulation [93]. Moreover, Sun et al. [110] demonstrated that SIRT1 improves the insulin response under insulin resistance (IR) by inhibiting the functionality of the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B). In addition, relevant functions of *SIRT1* in metabolic changes induced by a high-fat diet has been previously reported [34].

Another *SIRT* family member, SIRT3 has also been identified as relevant element in maintaining mitochondrial integrity and metabolism during oxidative stress [111]. In mouse models fed on a high-fat diet, Hirschey et al. [112] observed negative regulation of SIRT3 and exacerbated obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and steatohepatitis. Those findings were corroborated by the SIRT3 knockout study in mice in which accelerated obesity, development of IR and NASH in response to HFD diet were demonstrated. Accordingly, a study with patients carrying the rs11246020 (V208I) variant in the *SIRT3* gene showed higher susceptibility to develop the metabolic syndrome [112]. Therefore, both *SIRT1* and

SIRT3 are significant in homeostatic balance, redox potential, epigenetic alteration, and lipid metabolism in hepatocytes, reinforcing the results of the studies that demonstrated the role of deacetylases in NAFLD [34,112].

Combined, the above studies and the extensive review detailed somewhere have demonstrated relevant functions for histones modifications in liver lipid metabolism, even studies that connected the activities of those proteins to the circadian clock [113] suggesting that those molecules can be further investigated to be used as a therapeutic target for NAFLD.

Dna methylation and beyond in NAFLD

DNA methylation is a biological mechanism that covalent adds methyl groups (-CH₃) to DNA at position C5 of cytosines producing C5 (5mC). Specially, DNA sequences rich in C and guanines (G), known as CpG islands, which are frequently found in the promoter region of genes, are the main target of the methylation processes [34]. Those reactions are catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) [93], which obtain the -CH₃ from the donor S-adenosyl-L methionine (SAM) synthesized in the one-carbon metabolism pathway (1C) [114]. Hypermethylation of CpG islands is associated with gene expression inactivation or silencing, while their hypomethylation stimulates transcriptional activity [93] (Figure 2). Such mechanisms are extremely relevant for gene expression control and are modulated by both environmental stimuli and body's physiology. To corroborate this information, folate, methionine, betaine, and choline obtained through a diet are substrates for the synthesis of -CH₃ groups in the 1C metabolic pathway. Studies in mice demonstrated that diets deficient in those elements reduced DNA methylation and, thus, NAFLD progression [115,116]. Other studies also demonstrated that animal models fed with a diet lacking vitamin B12 and folate developed microvesicular steatosis, due to high TG levels and impaired mitochondrial FA β -oxidation [117].

In NAFLD, the genetic profiling of advanced liver disease patients revealed that genes correlated to the 1C metabolism reduced expression levels such of glycine N-methyltransferase (*GNMT*), betaine-homocysteine S methyltransferase (*BHMT*), cystathionine synthetase (*CBS*) and methionine adenosyltransferase (*MAT1A*) [118,119]. Moreover, other studies described that adenosylhomocysteinase (*AHCY*), *MAT1A* and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (*MTHFD2*) genes were hypermethylated, reducing SAM and changing global DNA methylation patterns and physiological problems [120]. To support those observations, methylome studies and transcriptome analysis correlated global hepatic DNA methylation with the progression of NAFLDs to more complex pathological conditions [93]. However, further studies are required to better understand the fine-tuning of DNA methylation and NAFLDs. In this context, the mechanistic characterization of elements that direct control epigenetic processes in NAFLD may be beneficial to developing innovative strategies in the treatment for hepatic steatosis treatment or

even be used as a molecular marker in disease diagnostics [93,121].

Mirnas as an important class of ncRNA in NAFLD

Non-coding RNAs (ncRNAs) are transcripts that are not translated into proteins [34]. Currently, several studies pointed out that those molecules have relevant functions in controlling of gene expression and homeostasis in biological processes [34,122]. The ncRNAs are categorized according to their functionality as transfer RNAs (tRNAs), ribosomal RNAs (rRNAs), microRNAs (miRNAs), small nuclear RNAs (snRNAs), small nucleolar RNAs (snoRNAs), extracellular RNAs (exRNAs), long ncRNAs (lncRNAs), Y RNAs, Vault RNA among others [122,123]. Those molecules collaborate with cellular balance and among them miRNAs have been used as biomarkers in various diseases including liver dysfunctions and NAFLDs [27,124–126], which is relevant for the development of innovative procedures for diagnosis.

MicroRNAs (miRNAs) are a class non-coding RNA molecule presenting ~ 22 nt. Those molecules contribute to gene expression regulation at the post-transcriptional level, whose mechanisms are reviewed elsewhere. Produced by canonical or non-canonical pathways, those small molecules are largely distributed in the genome, and mostly interact with the 3' UTR of target mRNAs, suppressing mRNA transcription or blocking translation [122,125] (Figure 2). Moreover, the interaction of miRNAs with the mRNA regions also happens at the 5' UTR, mRNA coding sequences, and the gene promoter regions [127]. In canonical pathways, miRNAs are transcribed by the RNA polymerase II/III in the cell nucleus as primary-miRNAs (pri-miRNAs) that may be found as long transcripts clusters. Such molecules are processed into precursor RNAs (pre-miRNAs) by the microprocessor complex, which consists of RNA binding protein DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) and the ribonuclease III enzyme (Drosha) [125]. Those molecules are transported to the cytoplasm and processed into mature miRNAs [24]. On the other hand, some non-canonical miRNAs are produced in a DGCR8/Drosha-independent or Dicer-independent pathway, which are also involved in many human diseases [125,127], adding more layers to the complexity of the epigenetics in gene expression regulation.

A single miRNA can regulate the expression of different mRNA targets, depending on the physiological or pathological state of the cells. Some miRNAs have more than 200 potential target sequences [122,123] therefore, they can regulate a large fraction of protein-coding genes [128,129] and a wide spectrum of biological processes such as inflammation, proliferation, apoptosis, necrosis, among others, which are frequently found in NAFLD, NASH, and HCC [130]. MiRNAs were described as important molecule in NAFLD, and, among them, the miR-34a and miR-122 demonstrated relevant mechanisms. Hepatic miR-34a expression is known to be induced under metabolic stress and is reported to be strongly correlated with dysregulation of lipid metabolism associated with NAFLD [120,131]. Xu et al. [131], reported that, mechanistically, miR-34a in hepatocyte promotes

NAFLD, inducing lipid absorption and synthesis and inhibiting fatty acid oxidation. MiR-34a also promotes the transition of NAFLD to NASH by inducing inflammation, reactive oxygen species (ROS) production, and apoptosis [128]. The main target of miR-34a is Sirtuin 1 (SIRT1), which regulates energy homeostasis through the activation of transcription factors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)- α and the liver X receptor (LXR) [120]. Therefore miR-34a expression leads to decreased expression of SIRT1 affecting diabetes-related proteins in the insulin signaling and glucose metabolism pathway [132]. A study with miR-34a inhibition alleviated steatosis and suppressed lipid accumulation in the mouse model of NAFLD, specifically targeting hepatic PPAR α and SIRT1 [133]. In addition, miR-122 has been largely studied in hepatic diseases, considering its relevant function in lipid metabolism [134,135]. This molecule is one of the most abundant miRNAs in the human liver, accounting for about 70% of all miRNAs expressed in the organ and implicated in liver development and physiology [135–137]. miR-122 is mostly found in the exosome-rich fraction of alcoholic and non-alcoholic liver injury, whereas it predominates in the protein-rich fraction of acetaminophen-induced liver toxicity [93]. Its overexpression increases alanine aminotransferase levels in the liver [138], while its inhibition in HFD mice reduces liver damage and hepatic steatosis [14]. In serum from NAFLD patients, miR-122 levels are higher than in healthy subjects, while in NASH patients its levels are even more expressive, strengthening the proposal to use it as a marker of NAFLD and its progression [125,135].

Furthermore, the literature extensively discussed the physiological role of miRNAs in lipid metabolism and the onset of liver diseases aiming at their potential clinical use as non-invasive diagnostic biomarkers of NAFLD and its stratification [139–141]. Moreover, other studies have been investigating the use of miRNAs as molecular tools for therapeutic strategy in the treatment of NAFLD [125,142,143]. Preliminary studies using miRNA-based therapeutics included the use of miRNA mimetics, anti-miRNA oligonucleotides, and exosomes loaded with miRNA [132]; however, no clinical trials have been performed [142], considering the challenges of drug delivery of these small molecules [27]. On the other hand, despite all the challenges related to the miRNA-therapeutics, studies aiming at using those small molecules in a safe in NAFLD treatment have been considered [27,144].

Ethnicity and NAFLD

Several elements are correlated with NAFLD heterogeneity, among them, the ethnicity of a population has to be considered. All over the world, different group of people have diversity in their genetic heritage and sociocultural behavior such as diet, physical exercise, alcohol consumption, and quality of life, for example. These factors may favor the onset of NAFLD [145]. However, a scientific approach correlating pathology evolution of liver diseases with environmental effects in different ethnicities is still little explored [146,147].

Evaluating people from around the world, those from Eastern, Central and Sub-Saharan Africa (SSA) presented high

incidences of deaths caused by cirrhosis and chronic liver diseases because of NAFLD progression [148]. For many years, the etiology of such hepatic diseases was unknown, until NAFLD was suggested as a potential factor [149]. Finally, studies demonstrated that in addition to poor dietary habits and a sedentary lifestyle a substantial number of HIV-infected individuals using antiretroviral therapy have a high predisposition to liver diseases [150]. Also, in the Middle East and North Africa, increased mortality rates were observed considering the high number of people affected by liver diseases. At the same time, in Asian continent, the number of individuals affected by the fatty liver is increasing [148], which may be correlated with genetic and environmental factors, with a complex inheritance pattern [146].

Other studies also described the effects of the ethnicity on NAFLD. GWAS correlations identified genes that influence plasma ALT levels in Indians. In this study, the *PNPLA3* rs738409 variant showed a high correlation with NAFLD establishment in those populations [75]. The same *PNPLA3* gene polymorphism also showed a strong association with NAFLD among Japanese [151] and Chinese people [152].

In the United States, the number of NASH-affected individuals may increase by 55% till 2030, which may be a result of genetic background and poor lifestyle habits. In addition, there are high number of Latinos living in that country, including Mexicans and their descendants, which have a prevalence of 50% of NAFLD in their community [153], and a higher incidence (54,9%) of the *PNPLA3* variant rs738409 [154,155]. This genetic background, have been contributed to an increase in the frequency of this polymorphic allele liver diseases.

Other genes have also been correlated with the predisposition of NAFLDs in different populations. Especially, in the Europeans several genes were described as correlated with NAFLD as *TM6SF2* [26,84], *HSD17B13* [26,75], *GCKR*, Zinc Finger domain GATA content 2A (*GATAD2A*), neurocan (*NCAN*), protein phosphatase 1 regulatory subunit 1 3B (*PPP1R3B*), tribbles pseudokinase 2 (*TRIB2*), carboxypeptidase N (*CPN1*) and ER lipid raft associate 1 (*ERLIN1*) [27]. However, in these population low rates of prevalence and death from cirrhosis and chronic diseases resulting from NAFLD are observed. These findings may reflect the quality of life of Europeans associated with the public policies adopted to monitor the evolution and prevalence of these diseases in the communities, as well as the support for scientific innovations for their control. Among the scientific communities in the European continent are the EASL (European Association for the Study of the Liver), EASD (European Association for the Study of Diabetes), EASO (European Association for the Study of Obesity), responsible for elaborating guides and recommendations for controlling NAFLD in that population [156].

Another factor that should be considered to influence the number of cases of NAFLD in the world is the coronavirus (COVID-19) infections. The pandemic caused by SARS-COV-2 started in 2019 and affected millions of people, and the systemic nature of the infection may soon contribute to an

increased incidence of NAFLD- and -NASH-affected people. Studies described that COVID-19 caused liver problems, especially in hospitalized patients [157]. Considering all factors correlated with the establishment of liver problems caused by the virus, inflammatory responses in T cells, hypoxia, hepatotoxic effects caused by drug therapies and general tissues infection must be considered as elements responsible for liver damage [158]. Viral particles have also been found in patients' hepatocytes and are correlated with mitochondrial edema, endoplasmic reticulum dilation, cell membrane dysfunction, and other cellular damages [159]. Thus, in the next following years, we will see how the COVID-19 infection, will induce NAFLDs in an ethnicity-dependent manner.

In summary, genetics combined with socio-environmental and socio-cultural conditions, modulates the incidence and prevalence of NAFLD among individuals in different regions of the world.

Conclusions and future overviews

In recent decades, the development of science and technology has enabled a more in-depth understanding of NAFLDs. However, many details still need to be elucidated to definitively clarify biochemical and molecular-related mechanisms that support NAFLD development and progression. Unfortunately, modern societies still struggle with the burden of liver diseases, with NAFLD being a critical concern. Therefore, new therapeutic and diagnostic advances are urgent and, to do so, clinical research and basic science

Considering the etiological agents acting on NAFLD development and progression such as inadequate eating behavior, viral infections, drugs abuse, environmental pollutants, among others, the genetics and the epigenetics emerged as relevant factors. Genetics acts as a powerful element in the establishment of the NAFLD pathology, and epigenetics acts as a modulating agent, which facilitates or mitigates the establishment and/or progression of the disease. Over the last decades, details concerning genes and their polymorphisms, as well as epigenetics, have been considered relevant elements in the systems biology of diseases, and their effects on NAFLDs should be considered in-depth, as well as the ethnicity, clarifying whether people are susceptible to liver diseases. Moreover, the endemicity and social problems of hepatic disfunction are far to be solved, which require a combined effort of various sectors of society. Those elements are presented and discussed in this short review to demonstrate their relevance, opening perspectives for research that address fatty liver diseases.

Acknowledgments

We acknowledge Silva, C. M. for manuscript critical reading.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This study was supported by research grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP – 2018/05286-3; 2022-06302-8], CAPES and PIBIC-CNPq scholarships.

ORCID

Camila Cristiane Pansa  <http://orcid.org/0000-0001-9644-026X>

Letícia Ramos Molica  <http://orcid.org/0000-0001-7973-1428>

Karen C. M. Moraes  <http://orcid.org/0000-0002-6838-8393>

References

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the american association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–357.
- [2] Eslam M, George J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(1):40–52.
- [3] Paik JM, Golabi P, Younossi Y, et al. The growing burden of disability related to chronic liver disease in the United States: data from the global burden of disease study 2007–2017. *Hepatol Commun*. 2021;5(5):749–759.
- [4] Valenti L, Pedica F, Colombo M. Distinctive features of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2022;54(2):154–163.
- [5] Geh D, Anstee QM, Reeves HL. Nafld-associated hcc: progress and opportunities. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021;8:223–239.
- [6] Ben-Assuli O, Jacobi A, Goldman O, et al. Stratifying individuals into non-alcoholic fatty liver disease risk levels using time series machine learning models. *J Biomed Inform*. 2022;126:103916–103986. (*Exp Ther Med*. 2020;20(5):1–1.
- [8] Català-Senent JF, Hidalgo MR, Berenguer M, et al. Hepatic steatosis and steatohepatitis: a functional meta-analysis of sex-based differences in transcriptomic studies. *Biol Sex Differ*. 2021;12(1):12–29.
- [9] Tokushige K, Ikejima K, Ono M, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis 2020. *J Gastroenterol*. 2021;56(11):951–963.
- [10] Bril F, Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(4):765–781.
- [11] Cai J, Zhang XJ, Li H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Res Rev*. 2019;39(1):328–348.
- [12] Karkucinska-Wieckowska A, Simoes ICM, Kalinowski P, et al. Mitochondria, oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: a complex relationship. *Eur J Clin Investigation*. 2022;52(3):1–19.
- [13] Febbraio MA, Reibe S, Shalapour S, et al. Preclinical models for studying nash-driven hcc: How useful are they? *Cell Metab*. 2019;29(1):18–26.
- [14] Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1(1):1–22.
- [15] Zarei M, Pizarro-Delgado J, Barroso E, et al. Targeting fgf21 for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(3):199–208.
- [16] Kang SH, Cho Y, Jeong SW, et al. From nonalcoholic fatty liver disease to metabolic-associated fatty liver disease: Big wave or ripple? *Clin Mol Hepatol*. 2021;27(2):257–269.
- [17] Pirola CJ, Salatino A, Quintanilla MF, et al. The influence of host genetics on liver microbiome composition in patients with NAFLD. *eBioMedicine*. 2022;76:103813–103858. (*Metabolism*. 2016;65(8):1026–1037.
- [19] Megahed FAK, Zhou X, Sun P, et al. The interplay between non-alcoholic fatty liver disease and innate immunity in hepatitis B virus patients. *Egypt Liver J*. 2021;11(1):1–11.
- [20] Sanyal AJ. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(6):377–386.
- [21] Stefan N, Cusi K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022;10(4):284–296.
- [22] Meroni M, Longo M, Rustichelli A, et al. Nutrition and genetics in nafld: the perfect binomium. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):1–32.
- [23] Cui J, Chen CH, Lo MT, et al. Shared genetic effects between hepatic steatosis and fibrosis: a prospective twin study. *Hepatology*. 2016;64(5):1547–1558.
- [24] Choudhary NS, Duseja A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(2):2–17.
- [25] Oliveira AG, Fiorotto R. Novel approaches to liver disease diagnosis and modeling. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(19):14–19.
- [26] Anstee QM, Darlay R, Cockell S, et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically characterised cohort. *J Hepatol*. 2020;73(3):505–515.
- [27] Balcar L, Semmler G, Oberkofler H, et al. PNPLA3 is the dominant SNP linked to liver disease severity at time of first referral to a tertiary center. *Dig Liver Dis*. 2022;54(1):84–90.
- [28] Teo K, Abeysekera KWM, Adams L, et al. Rs641738c > t near mboat7 is associated with liver fat, alt and fibrosis in nafld: a meta-analysis. *J Hepatol*. 2021;74(1):20–30.
- [29] Vespasiani-Gentilucci U, Dell'Unto C, De Vincentis A, et al. Combining genetic variants to improve risk prediction for nafld and its progression to cirrhosis: a proof of concept study. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2018;2018:7564835–7564839.
- [30] Gellert-Kristensen H, Richardson TG, Davey Smith G, et al. population. *Hepatology*. 2020;72(3):845–856.
- [31] Degasperis E, Galmozzi E, Pelusi S, et al. Hepatic fat—genetic risk score predicts hepatocellular carcinoma in patients with cirrhotic hcv treated with daas. *Hepatology*. 2020;72(6):1912–1923.
- [32] Ramos LF, Silva CM, Pansa CC, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: molecular and cellular interplays of the lipid metabolism in a steatotic liver. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;15(1):25–40.
- [33] Lee J, Friso S, Choi SW. Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition. *Nutrients*. 2014;6(8):3303–3325.
- [34] Zhao F. Dysregulated epigenetic modifications in the pathogenesis of NAFLD-HCC. Singapore (asia). *Adv Exp Med Biol*. 2018;1061:79–93.
- [35] Pirola CJ, Sookoian S. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: advances in genetic and epigenetic implications. *Curr Opin Lipidol*. 2022;33(2):95–102.
- [36] Seebacher F, Zeigerer A, Kory N, et al. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;108:72–81.
- [37] Guo M, Xiang L, Yao J, et al. Comprehensive transcriptome profiling of nafld- and nash-induced skeletal muscle dysfunction. *Front Endocrinol*. 2022;13(851520):851514–851520.
- [38] Mashek DG. Hepatic lipid droplets: a balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD. *Mol Metab*. 2021;50:101115–101118.
- [39] Geng Y, Faber KN, de Meijer VE, et al. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? *Hepatol Int*. 2021;15(1):21–35.
- [40] Grossini E, Garhwal DP, Calamita G, et al. Exposure to plasma from non-alcoholic fatty liver disease patients affects hepatocyte viability, generates mitochondrial dysfunction, and modulates

- pathways involved in fat accumulation and inflammation. *Front Med.* 2021;8(693997):693912–693997.
- [41] Beld J, Lee DJ, Burkart MD. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst.* 2015;11(1):38–59.
- [42] Juárez-Hernández E, Chávez-Tapia NC, Uribe M, et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr J.* 2015;15(1):1–10.
- [43] Filali-Mouneef Y, Hunter C, Roccio F, et al. The ménage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease. *Autophagy.* 2022; 18(1):50–72.
- [44] Menikdiwela KR, Tôres Guimarães JP, Ramalingam L, et al. Mechanisms linking endoplasmic reticulum (ER) stress and microRNAs to adipose tissue dysfunction in obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2021;56(5):455–481.
- [45] Currie E, Schulze A, Zechner R, et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* 2013;18(2):153–161.
- [46] Semova I, Biddinger SB. Triglycerides in nonalcoholic fatty liver disease: guilty until proven innocent. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42(3):183–190.
- [47] Mashek DG. Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Adv Nutr.* 2013;4(6):697–710.
- [48] Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, et al. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(2):447–459.
- [49] Lee Y, Kim S-M, Jung E-H, et al. Lithium chloride promotes lipid accumulation through increased reactive oxygen species generation. *Biochim Biophys Acta.* 2020;1865(2):1–12.
- [50] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(12):125–135.
- [52] Coronati M, Baratta F, Pastori D, et al. Added fructose in non-alcoholic fatty liver disease and in metabolic syndrome: a narrative review. *Nutrients.* 2022;14(6):1110–1127.
- [53] Ameer F, Scandiuzzi L, Hasnain S, et al. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* 2014;63(7):895–902.
- [54] Chen H. Nutrient mTORC1 signaling contributes to hepatic lipid metabolism in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* 2020;4(1):15–22.
- [55] Tell G, Vascotto C, Tiribelli C. Alterations in the redox state and liver damage: Hints from the EASL basic school of hepatology. *J Hepatol.* 2013;58(2):365–374.
- [56] Baker PR, Friedman JE. Mitochondrial role in the neonatal predisposition to developing nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2018;128(9):3692–3703.
- [57] Kumar S, Duan Q, Wu R, et al. Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021; 176:113813–113869.
- [58] Schuster S, Cabrera D, Arrese M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018; 15(6):349–364.
- [59] Fairfield CJ, Drake TM, Pius R, et al. Genome-wide association study of nafld using electronic health records. *Hepatol Commun.* 2022;6(2):297–308.
- [60] Makkonen J, Pietiläinen KH, Rissanen A, et al. Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *J Hepatol.* 2009;50(5):1035–1042.
- [61] Loomba R, Schork N, Chen C-H, et al. Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study. *Gastroenterology.* 2015;149(7):1784–1793.
- [62] Brouwers MCGJ, Cantor RM, Kono N, et al. Heritability and genetic loci of fatty liver in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2006;47(12):2799–2807.
- [63] Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, et al. Heritability of non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2009;136(5): 1585–1592.
- [64] Dongiovanni P, Valenti L, Rametta R, et al. Genetic variants regulating insulin receptor signalling are associated with the severity of liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2010;59(2):267–273.
- [65] Mackenzie R, Elliott B. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:55–64.
- [66] Peng CH, Ker YB, Li HH, et al. *Abelmoschus esculentus* subfractions ameliorate hepatic lipogenesis and lipid uptake via regulating dipeptidyl peptidase-4 – with improving insulin resistance. *PLoS One.* 2022;17(3):e0265444–14.
- [67] Yuan F, Gu Z, Bi Y, et al. The association between rs1260326 with the risk of NAFLD and the mediation effect of triglyceride on NAFLD in the elderly Chinese Han population. *Aging.* 2022; 14(6):2736–2747.
- [68] Yang Z, Wen J, Tao X, et al. Genetic variation in the GCKR gene is associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese people. *Mol Biol Rep.* 2011;38(2):1145–1150.
- [69] Caddeo A, Jamialahmadi O, Solinas G, et al. MBOAT7 is anchored to endomembranes by six transmembrane domains. *J Struct Biol.* 2019;206(3):349–360.
- [70] Thangapandi VR, Knittelfelder O, Brosch M, et al. Loss of hepatic Mboat7 leads to liver fibrosis. *Gut.* 2021;70(5):940–950.
- [71] Tanaka Y, Shimanaka T, Caddeo A, et al. LPIAT1/MBOAT7 depletion increases triglyceride synthesis fueled by high phosphatidylinositol turnover. *Gut.* 2021;70(1):180–193.
- [72] Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, et al. The mboat7-tmc4 Mboat7 (LPIAT1) causes activation of SREBP-1c and fatty liver. *J Lipid Res.* 2021;62:100031.
- [74] Su W, Wang Y, Jia X, et al. Comparative proteomic study reveals 17β-HSD13 as a pathogenic protein in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(31):11437–11442.
- [75] Chambers JC, Zhang W, Sehmi J, et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat Genet.* 2011;43(11):1131–1138.
- [76] Kunutsor SK, Apekey TA, Walley J. Liver aminotransferases and risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2013;178(2):159–171.
- [77] Ting YW, Kong ASY, Zain SM, et al. Loss-of-function HSD17B13 variants, non-alcoholic steatohepatitis and adverse liver outcomes: results from a multi-ethnic Asian cohort. *Clin Mol Hepatol.* 2021;27(3):486–498.
- [78] Unalp-Arida A, Ruhl CE. Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 i148m and liver fat and fibrosis scores predict liver disease mortality in the U. *Hepatology.* 2020;71(3):820–834.
- [79] Grimaudo S, Pipitone R, Pennisi G, et al. Association between pnpla3 rs738409 c>g variant and liver-related outcomes in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020;18(4):935–944.e3.
- [80] Park J, Zhao Y, Zhang F, et al. IL6/STAT3 axis dictates the PNPLA3-mediated susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2022;S0168-8278(22):03053–03057.
- [81] Bruschi FV, Tardelli M, Herac M, et al. Metabolic regulation of hepatic PNPLA3 expression and severity of liver fibrosis in patients with NASH. *Liver Int.* 2020;40(5):1098–1110.
- [82] Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, et al. PNPLA3 has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet.* 2014;23(15):4077–4085.
- [83] Pingitore P, Dongiovanni P, Motta BM, et al. PNPLA3 overexpression results in reduction of proteins predisposing to fibrosis. *Hum Mol Genet.* 2016;25(23):5212–5222.

- [84] Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2014;46(4):352–356.
- [85] Luo F, Oldoni F, Das A. *tm6sf2*: a novel genetic player in nonalcoholic fatty liver and cardiovascular disease. *Hepatol Commun.* 2022;6(3):448–460.
- [86] Surakka I, Horikoshi M, Mägi R, et al. The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels. *Nat Genet.* 2015;47(6):589–597.
- [87] Prill S, Caddeo A, Baselli G, et al. The TM6SF2 E167K genetic variant induces lipid biosynthesis and reduces apolipoprotein B secretion in human hepatic 3D spheroids. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–10.
- [88] Frieden C, Wang H, Ho CMW. A mechanism for lipid binding to apoE and the role of intrinsically disordered regions coupled to domain-domain interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(24):6292–6297.
- [89] Niu L, Geyer PE, Albrechtsen NJW, et al. Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Syst Biol.* 2019;15(3):e8793.
- [90] Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, et al. The *ApoE*^{−/−} mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med.* 2016;14(1):146.
- [91] Jamialahmadi O, Mancina RM, Ciociola E, et al. Exome-wide association study on alanine aminotransferase identifies sequence variants in the GPAM and APOE associated with fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2021;160(5):1634–1646.e7.
- [92] Mancina RM, Sasidharan K, Lindblom A, et al. PSD3 downregulation confers protection against fatty liver disease. *Nat Metab.* 2022;4(1):60–75.
- [93] Sodum N, Kumar G, Bojja SL, et al. Epigenetics in nafld/nash: targets and therapy. *Pharmacol Res.* 2021;167:1–16.
- [94] Hajri T, Zaiou M, Fungwe TV, et al. Epigenetic regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Cells.* 2021;10(12):2145.
- [96] Zeybel M, Hardy T, Robinson SM, et al. Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clin Epigenet.* 2015;7(1):1–11.
- [97] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381–395.
- [98] Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, et al. Atp-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 2009;324(5930):1076–1080.
- [99] Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):284–295.
- [100] Poziello A, Nebbioso A, Stunnenberg HG, et al. Recent insights into histone acetyltransferase-1: biological function and involvement in pathogenesis. *Epigenetics.* 2021;16(8):838–850.
- [101] Feng D, Liu T, Sun Z, et al. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science.* 2011;331(6022):1315–1319.
- [102] Mazzocchi G, Vinciguerra M, Oben J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: the role of nuclear receptors and circadian rhythmicity. *Liver Int.* 2014;34(8):1133–1152.
- [103] Blander G, Guarente L. The sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):417–435.
- [104] Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, et al. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4316–4331.
- [105] Charidemou E, Tsiarli MA, Theophanous A, et al. Histone acetyltransferase NAA40 modulates acetyl-CoA levels and lipid synthesis. *BMC Biol.* 2022;20(1):22.
- [106] Kumar V, Kundu S, Singh A, et al. Understanding the role of histone deacetylase and their inhibitors in neurodegenerative disorders: current targets and future perspective. *Curr Neuropharmacol.* 2022;20(1):158–178.
- [107] Renzini A, D'Onghia M, Coletti D, et al. Histone deacetylases as modulators of the crosstalk between skeletal muscle and other organs. *Front Physiol.* 2022;13(706003):1–15.
- [108] Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):138–145.
- [109] Rappa F, Greco A, Podrini C, et al. Immunopositivity for histone macroh2a1 isoforms marks steatosis-associated hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(3):1–10.
- [110] Sun C, Zhang F, Ge X, et al. Sirt1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing ptp1b. *Cell Metab.* 2007;6(4):307–319.
- [111] Kim H-S, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. Sirt3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell.* 2010;17(1):41–52.
- [112] Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, et al. Sirt3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell.* 2011;44(2):177–190.
- [113] Emmett MJ, Lazar MA. Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):102–115.
- [114] Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, et al. One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019;7(1):263–287.
- [115] Pogribny IP, Shpileva SI, Muskhelishvili L, et al. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mutat Res.* 2009;669(1–2):56–62.
- [116] Juanola O, Martínez-López S, Francés R, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: metabolic, genetic, epigenetic and environmental risk factors. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(10):1–24.
- [117] Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, et al. Methyl donor deficiency disease and its potential applications. *Biotechnol Pharmacol.* 2022;200(1):115017–115033.
- [119] Ramani K, Lu SC. Methionine adenosyltransferases in liver health and diseases. *Liver Res.* 2017;1(2):103–111.
- [120] Torres J-L, Novo-Veleiro I, Manzanedo L, et al. Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(36):4104–4118.
- [121] Lai Z, Chen J, Ding C, et al. Association of hepatic global DNA methylation and serum one-carbon metabolites with histological severity in patients with Nafld. *Obesity.* 2020;28(1):197–205.
- [122] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding rnas. *Annu Rev Biochem.* 2012;81(1):145–166.
- [123] Seal RL, Chen L, Griffiths-Jones S, et al. A guide to naming human non-coding RNA genes. *Embo J.* 2020;39(6):1–18.
- [124] Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology.* 2011;54(5):1767–1776.
- [125] da Silveira MB, Pansa CC, Malaspina O, et al. The functional activity of the miR-1914-5p in lipid metabolism of the hepatocarcinoma cell line HepG2: a potential molecular tool for controlling hepatic cellular migration. *Mol Biol Rep.* 2021;48(4):3463–3474.
- [126] Dwivedi S, Purohit P, Sharma P. MicroRNAs and diseases: promising biomarkers for diagnosis and therapeutics. *Ind J Clin Biochem.* 2019;34(3):243–245.
- [127] Kaur P, Kotru S, Singh S, et al. MiRNA signatures in diabetic retinopathy and nephropathy: delineating underlying mechanisms. *J Physiol Biochem.* 2022;78(1):19–37.
- [128] Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85–15.

- [129] Salim U, Kumar A, Kulshreshtha R, et al. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2022; 13(1):1–15.
- [130] Kansakar U, Varzideh F, Mone P, et al. Functional role of microRNAs in regulating cardiomyocyte death. *Cells*. 2022;11(6): 983–913.
- [131] Xu Y, Zhu Y, Hu S, et al. Hepatocyte miR-34a is a key regulator in the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab*. 2021;51(101244):1–11.
- [132] Lee AT, Yang MY, Lee YJ, et al. Gallic acid improves diabetic steatosis by downregulating microRNA-34a-5p through targeting NFE2L2 expression in high-fat diet-fed db/db mice. *Antioxidants*. 2022;11(1):1–22.
- [133] Ding J, Li M, Wan X, et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2015;5(1):1–10.
- [134] Lewis AP, Jopling CL. Regulation and biological function of the liver-specific miR-122. *Biochem Soc Trans*. 2010;38(6):1553–1557.
- [135] Becker PP, Rau M, Schmitt J, et al. Performance of serum microRNAs -122, -192 and -21 as biomarkers in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2015;10(11): e0142661–16.
- [136] Hu Y, Peng X, Du G, et al. MicroRNA-122-5p inhibition improves inflammation and oxidative stress damage in dietary-induced non-alcoholic fatty liver disease through targeting FOXO3. *Front Physiol*. 2022;13(803445):1–12.
- [137] Jonas W, Schürmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Mol Metab*. 2021;50(101111–101114).
- [138] Dongiovanni P, Meroni M, Longo M, et al. MiRNA signature in NAFLD: a turning point for a non-invasive diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):1–24.
- [139] Jonas W, Schürmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Mol Metab*. 2021;50:1–14. fatty liver disease. *J Clin Microbiol*. 2020;9(7):1–12.
- [141] Newman LA, Useckaite Z, Johnson J, et al. Selective isolation of liver-derived extracellular vesicles redefines performance of mirna biomarkers for non-alcoholic fatty liver disease. *Biomedicines*. 2022;10(1):1–16.
- [142] Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, et al. MiRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut*. 2019;68(11): 2065–2079.
- [143] Zobeiri M, Parvizi F, Kalhori MR, et al. Targeting miRNA by natural products: a novel therapeutic approach for nonalcoholic fatty liver. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021; 2021(6641031):6641016–6641031.
- [144] Bayoumi A, Grønbaek H, George J, et al. The epigenetic drug discovery landscape for metabolic-associated fatty liver disease. *Trends Genet*. 2020;36(6):429–441.
- [145] Arrese M, Arab JP, Barrera F, et al. Insights into nonalcoholic fatty-liver disease heterogeneity. *Semin Liver Dis*. 2021;41(4): 421–434.
- [146] Zhou F, Zhou J, Wang W, et al. Unexpected rapid increase in the burden of nafld in china from 2008 to 2018: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2019;70(4):1119–1133.
- [147] Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(4):223–238.
- [148] Golabi P, Paik JM, Alqahtani S, et al. Burden of non-alcoholic fatty liver disease in Asia, the Middle East and North Africa: data from global burden of disease 2009–2019. *J Hepatol*. 2021;75(4): 795–809.
- [149] Spearman CW, Desalegn H, Ocama P, et al. The Sub-Saharan Africa position statement on the redefinition of fatty liver disease: from NAFLD to MAFLD. *J Hepatol*. 2021;74(5):1256–1258.
- [150] Mak D, Kramvis A. Epidemiology and aetiology of hepatocellular carcinoma in Sub-Saharan Africa. *Hepatoma Res*. 2021;7:1–26.
- [151] Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, et al. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in japanese. *PLoS One*. 2012;7(6):e38322–10.
- [152] Wang X, Liu Z, Wang K, et al. Additive effects of the risk alleles of PNPLA3 and TM6SF2 on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in a Chinese population. *Front Genet*. 2016;7(140):1–7.
- [153] Le MH, Yeo YH, Cheung R, et al. Ethnic influence on nonalcoholic fatty liver disease prevalence and lack of disease awareness in the United States, 2011–2016. *J Intern Med*. 2020;287(6): 711–722.
- [154] Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat*
- [156] Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):330–344.
- [157] Gabrielli M, Franza L, Esperide A, et al. Liver injury in patients hospitalized for covid-19: possible role of therapy. *Vaccines*. 2022;10(2):114–192.
- [158] Bangash MN, Patel J, Parekh D. COVID-19 and the liver: little cause for concern. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(6): 529–530.
- [159] Wang Y, Liu S, Liu H, et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol*. 2020;73(4):807–816.

Com base nos estudos abordados nesta revisão, muitos detalhes do desenvolvimento da DHGNA ainda necessitam de elucidação, assim como a busca por novos alvos terapêuticos. Entretanto, diversas variantes genéticas citadas evidenciaram forte relação ao desenvolvimento da DHGNA, assim como sua associação a grupos étnicos. Esta evidência possibilita um rastreamento e acompanhamento destes indivíduos para minimizar o aumento desta condição patogênica no futuro. Neste sentido, a genética, atrelada as condições ambientais que modulam os processos epigenéticos, podem acelerar e/ou agravar o desenvolvimento da DHGNA e, portanto, é essencial a conscientização com relação ao estilo de vida e alimentação. Em conjunto, esses dados podem fornecer abordagens preventivas e atenuadoras a partir do conhecimento dos indivíduos suscetíveis a doenças. A elaboração dessas abordagens e medidas poderiam minimizar os impactos que a DHGNA pode vir a trazer para o futuro principalmente as redes de saúde pública.

CAPÍTULO II. Inibição do miR-1914-5p atenua ambiente pro-esteatótico em modelo de co-cultura de células hepáticas pela modulação de processos epigenéticos e atuação na via do 1- carbono

Em estudos anteriores realizado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se o papel funcional do miR-1914-5p na modulação do processo pró-fibrosantes de células estreladas hepáticas, mecanismo esse correlacionado ao metabolismo lipídico. Diante desses resultados, foi proposto a investigação do mecanismo de atuação do miR-1914-5p no ambiente pró-esteatótico. Para este estudo, a molécula mimetizadora e / ou inibidora do miR-1914-5p foram utilizadas na transfecção de co-culturas de células hepáticas, as quais foram submetidas a condição de pró-esteatose. Essas culturas foram então utilizadas em análises proteômicas, da qual, a prática experimental foi desenvolvida pela aluna Msc Letícia Ramos, durante a elaboração da sua dissertação de mestrado. Enquanto a análise de bioinformática foi realizada na elaboração desta tese de doutorado. Nesta análise foi evidenciada possível correlação do miR-1914-5p com a via do 1-carbono (1-C) e a processos epigenéticos nas condições avaliadas. A análise de genes das rotas correlatas a via do 1-C, apontaram putativos sítios de interação ao miR-1914-5p, o que reforçou a necessidade do estudo detalhado dessa rota metabólica. A análise da expressão de genes e de proteínas dessa rota metabólica demonstrou uma correlação direta do miR-1914-5p a vários de seus elementos que direta ou indiretamente atuam em mecanismos de metilação do DNA e acetilação de histonas. Nesse contexto, o conjunto de resultado demonstrou que a inibição do miR-1914-5p, atua no controle do quadro pró-esteatótico. A seguir, o capítulo II apresenta detalhes do desenvolvimento e resultados deste trabalho.

Inibição do miR-1914-5p atenua ambiente pro-esteatótico em modelo de co-cultura de células hepáticas pela modulação de processos epigenéticos e atuação na via do 1- carbono

Pansa, C.C¹; Ramos, L.¹; Porto, T.¹; Palma, M.²; Souza, B.², Moraes, K¹.

¹ Laboratório Sinalização Celular e Expressão Gênica, LSCEG, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

² Laboratório de Centro de Estudos de Insetos Sociais, CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Corresponding author:

*Karen C.M. Moraes

Laboratório Sinalização Celular e Expressão Gênica, DBGA, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Zip Code 13506-900, Rio Claro, SP - Brazil

E-mail: kcm.moraes@unesp.br / Tel.: +55-19-3526-4144/ Fax: +55-19-3526-4136

Resumo

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das causas mais comuns de patologias crônicas do fígado. A forma progressiva de DHGNA é a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) podendo progredir para cirrose e até hepatocarcinoma. Com o rápido aumento e prevalência desta doença no mundo somado a ausência de medicamento específico para seu tratamento, pesquisas são necessárias para se detalhar particularidades mecanísticas dessa patogenia visando o controle de sua progressão e/ou cura. O surgimento do campo da epigenética oferece uma explicação convincente para a base do estilo de vida, ambiente e outros fatores de risco que influenciam no desenvolvimento DHGNA. A compreensão de mecanismos epigenéticos, e a atividade de microRNAs (miRNAs), podem conduzir a descoberta de causas primárias da DHGNA e uma estratégia para sua prevenção e/ou desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Portanto este trabalho objetivou investigar as particularidades mecanístico-funcionais de atuação do miR-1914-5p no processo pró-esteatótico hepático em modelo de co-cultura (LX-2 e HepG2) e sua relação com os processos epigenéticos. Para este trabalho, análises de resultados proteômicos, análises bioquímicas, expressão gênica e *western blot*, foram utilizadas. As análises evidenciaram que a presença do miR-1914-5p no processo de pró-esteatose levaram a maior perturbação do equilíbrio celular por aumento das proteínas HSP e a presença da proteína HSP5, sinalizadora de estresse do retículo endoplasmático, além de possível progressão da doença com o aumento da expressão gênica de MAT2A e MAT2B. Contrariamente, a inibição do miR-1914-5p, apresentou atenuar os processos de pró-esteatose por possível aumento das expressões de genes fundamentais da via do 1C como AHCY, MTHFRD2 e MTR, além de apresentar possível consumo exacerbado de GSH, pertencente a via da transsulfuração, anexa a via do 1C, para a recuperação do equilíbrio e homeostasia celular. Em conclusão, a inibição do miR-1914-5p, apresentou atenuar a condição de pró-esteatose no modelo de co-cultura por possível atuação na via do 1C e facilitação do consumo exacerbado de GSH. Entretanto mais investigações são necessárias para melhor compreender de fato a atuação deste miRNA na via do 1C e na via da transsulfuração.

Palavras-chave: DHGNA, epigenética, miRNA, via do 1C.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common causes of chronic liver disease. The progressive form of NAFLD is non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and may progress to cirrhosis and even hepatocellular carcinoma. With the rapid increase and prevalence of this disease in the world and the absence of specific medication for its treatment, research is necessary to detail the mechanistic particularities of this pathogenesis in order to control its progression and/or cure. The understanding of epigenetic mechanisms, and the activity of microRNAs (miRNAs), can lead to the discovery of primary causes of NAFLD and a strategy for its prevention and/or development of new therapeutic interventions. Therefore, this work aimed to investigate the mechanistic-functional particularities of miR-1914-5p action in the hepatic pro-steatotic process in a co-culture model (LX-2 and HepG2) and the relationship with the epigenetic processes. For this work analysis of proteomic results, biochemical analysis, gene expression and western blot were used. The analyzes showed that the presence of miR-1914-5p in the process of pro-steatosis presents a greater disruption of cellular balance by increasing HSP proteins. In addition to the presence of the HSP5 protein, signaling endoplasmic reticulum stress and possible disease progression with increased gene expression of MAT2A and MAT2B. On the other hand, the inhibition of miR-1914-5p, showed to attenuate the processes of pro-steatosis by possibly increasing the expression of fundamental genes of the 1C pathway such as AHCY, MTHFRD2 and MTR. In addition to the increase in the exacerbated consumption of GSH, belonging to the transsulfuration pathway, it attaches to the 1C pathway, for the possible recovery of cellular balance and homeostasis. In conclusion, the inhibition of miR-1914-5p, showed to attenuate the condition of pro-steatosis in the co-culture model by possible action in the 1C pathway and facilitation of the exacerbated consumption of GSH. However, further investigations are needed to better understand the actual role of this miRNA in the 1C pathway and in the transsulfuration pathway.

Keywords: NAFLD, epigenetics, miRNA, 1C pathway.

1 Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), ou simplesmente esteatose, é uma condição anômalo do fígado comum nas sociedades modernas (YOUNOSSI, 2020; NASSIR, 2022). A patologia se caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos no interior dos hepatócitos e é diagnosticada quando a gordura se acumula a níveis $\geq$ a 5% do peso do fígado (WONG, 2015). A cada ano, os índices epidemiológicos da doença gordurosa do fígado não alcoólica têm aumentado e atualmente a prevalência é de aproximadamente 25% da população global (BONACINI, 2021) com estimativa de 30% até 2030 (ESTES, 2020). Entretanto, um dos maiores desafios da DHGNA é a possibilidade de piora no grau de comprometimento hepático com o estadiamento da doença a níveis mais deletérios, quando não controlada. A esteatose pode progredir para esteato-hepatite não alcoólica (NASH), uma forma mais grave da doença onde o órgão apresenta inflamação e dano celular; fibrose e em alguns casos pode progredir a carcinoma hepatocelular (CHC) (WONG, 2015; NASSIR, 2022).

Apresentando diferentes etiologias, a DHGNA atinge diferentes populações. Entretanto, estudos apresentam uma correlação entre nível de desenvolvimento sócio-econômico e uma causa maior de comprometimento hepático (FROHME, 2020), sugerindo forte interação gene-ambiente, reforçando a relevância de mecanismos epigenéticos no desenvolvimento dessas patologias (TALENS et al., 2021). Mecanismos epigenéticos são modificações hereditárias, mas reversíveis, que modulam a expressão gênica em resposta a estímulos ambientais, sem alterar a sequência do DNA (MERONI, 2019). Nos últimos anos, evidências crescentes têm relatado alterações na dinâmica dos processos epigenéticos devido a estresse e mudanças nutricionais, associados principalmente à metilação do DNA (SHANKAR; KUMAR; SRIVASTAVA, 2013; LEE, 2021).

Mecanicamente, a metilação está atrelada ao ciclo de ciclo do carbono (1C), uma via metabólica importante que regula a metilação do DNA e o equilíbrio redox da célula (MARTINOV, 2010). Esta via é intimamente atrelada a alimentação, principalmente por componentes como folato, betaina, colina e vitamina B (LECORGUILLÉ et al., 2022). É através desta via que ocorre a sintetização do principal doador de metil, SAM (S-adenosilmetionina), também conhecida como AdoMet. A ausência de SAM pode levar a redução da metilação e aumento da transcrição gênica, uma vez que a metilação leva a inibição da transcrição. Embora todos os órgãos dos mamíferos tenham a capacidade de sintetizar SAM, o fígado é um dos locais mais ativos onde ocorre o ciclo completo da metionina (WANG, 2022). A desregulação desta via tem se associado ao desenvolvimento de doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (WU, 2019), tanto pelo aumento exacerbado quando pela redução da SAM. Anexa a via do 1C, se encontra à via da transsulfuração (TSP) (WERGE,

2021) e sua ativação se dá pelo aumento de homocisteína, que é derivada da redução de SAM. A via da transsulfuração é responsável pela síntese de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e glutatona (GSH), este último é o principal componente do potencial redox da célula. Estudos tem relatado que alterações nas enzimas atuantes nesta via leva a esteatose hepática, inflamação e fibrose em modelos animais (VAIRETTI et al., 2022). Ainda não foi estabelecida uma ligação causal entre o TSP e DHGNA no entanto, disfunções na TSP e vias relacionadas, em termos de expressão enzimática e níveis plasmáticos dos metabólitos, foram relatadas na DHGNA e na cirrose hepática em modelos animais e humanos (WERGE, 2021).

Embora tenha se descoberto que existem muitas vias fisiopatológicas que levam a esses distúrbios metabólicos, as opções atuais de tratamento são muito limitadas e inclui principalmente mudanças dos hábitos alimentares, estilo de vida, e, em alguns casos, tratamento cirúrgico (SUNNY; BRIL; CUSI, 2017; YU; CHEN; REN, 2022).

Nos últimos anos, estudos recorrentes sugerem a utilização dos miRNAs como novos biomarcadores no diagnóstico de patologias, por estarem presentes nos fluidos, o por fácil detecção dos mesmos de maneira não-invasiva (PAOLINI et al., 2022; CONDRAT et al., 2022). Ainda, outros estudos sugerem a utilização dessas pequenas moléculas como possíveis candidatas ao desenvolvimento de terapias inovadoras (RUSU, 2022), uma vez que os miRNAs podem atuar no controle da expressão gênica pós-transcricional, inibindo o processo traducional (DE ROOIJ, 2022), quer seja pelo pareamento perfeito de bases mRNA:miRNA ou pela inibição direta da acoplagem do ribossomo. Essa característica permite que os miRNAs atuem como reguladores de diversos genes alvos (SIMONSON e DAS, 2015). Sendo assim, a caracterização de novos elementos e seus mecanismos de ação no tecido hepático e no controle do metabolismo de lipídeos, podem subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No ambiente hepático, o miR-1914-5p já se mostrou importante na modulação de enzimas chaves no metabolismo lipídico como malonil-CoA descarboxilase (MLYCD), acetil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4) e lipina (LPIN1), contribuindo para a reversão do fenótipo ativado para o fenótipo quiescente (normal) da linhagem LX-2 (DE OLIVEIRA et al., 2018). Baseado nessas observações, o presente estudo buscou compreender as particularidades mecanístico-funcionais de atuação do miR-1914-5p no processo pró-esteatótico hepático e sua relação com os processos epigenéticos. Uma vez que a compreensão das particularidades de moléculas de miRNAs dentro do contexto da biologia dos sistemas do fígado podem contribuir para futuras aplicações diagnósticas e/ou terapêuticas.

2 Materiais e métodos

2.1 Cultura celular e modelo experimental

Células estreladas hepáticas (CHE), LX-2 (XU, 2005), e células de carcinoma hepatocelular, HepG2 (ATCC® HB-8065™) foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagles's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibiótico Anti-anti (*Thermo Fisher Scientific*). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂ até atingirem 70-80% de confluência e utilizadas em co-cultivos na proporção de 7:3 (hepatócitos: CHE), totalizando 1,5 x 10⁶ de células. Para a indução do processo pró-esteatótico a concentração de 400 µM de uma mistura de ácidos graxos (2 oleico: 1 palmítico) foi utilizada e o protocolo foi previamente padronizado em nosso laboratório (Ramos, L.F, 2020; Barbosa, T.P, 2020 – Dissertações de Mestrado;).

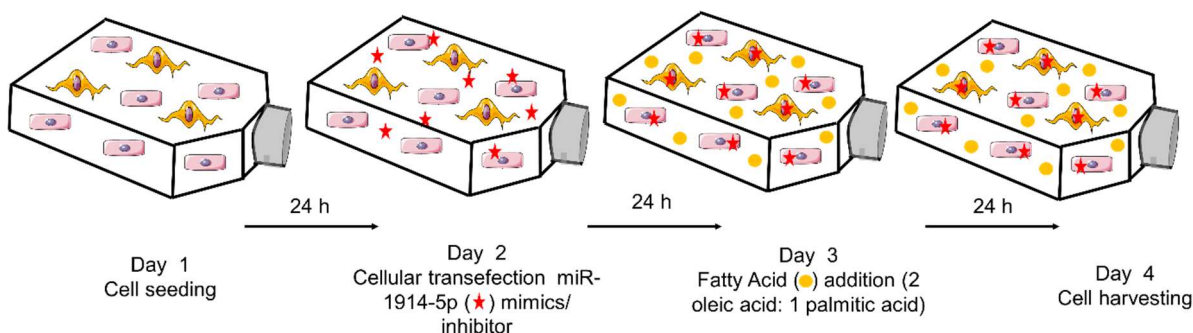
Para as análises, os grupos experimentais foram utilizados: **a)** Controle: células cultivadas em meio DMEN contendo 10% de SBF; **b)** Pró-esteatose: células cultivadas em meio DMEN contendo 10% de SBF e incubadas com 400 µM da mistura de AG (2 unidades de ácido oleico: 1 unidade de ácido palmítico, por 24h; **c)** DMSO: solvente dos AG (células cultivadas em DMEN contendo 10% de SBF e a mesma proporção v/v do solvente correspondente ao volume de AGs utilizados e incubadas por 24 h); **d)** RNAimax: células cultivadas em DMEN contendo 10% de SBF, incubadas com lipofectamina RNA imax (*Transfection Reagent - Thermo Fisher Scientific*), pelo mesmo intervalo utilizado nas transfecções; **e)** grupo transfectado com a molécula mímica ou mimético (células cultivadas em DMEN contendo 10% de SBF, transfectadas com 40 nM do miR-1914-5p mimético diluído com lipofectamina; **f)** grupo transfectado com a molécula miRNA inibidora (células cultivadas em DMEN contendo 10% de SBF, transfectadas com 40 nM do inibidor). Para se avaliar o efeito das moléculas no controle ou reverão de quadros esteatóticos, os grupos d, e, f que foram transfectados ou tratados com lipofectamina foram incubados com 400 µM da mistura de AGs por um intervalo de 1h. A Figura 1 traz uma representação esquemática do ensaio realizado e de todas as suas etapas.

Após os respectivos intervalos da experimentação, as células foram coletadas seguindo metodologia usual por tripsinização, lavadas com tampão fosfato (PBS, 1 X PBS = 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM) e congeladas em freezer -80 C até sua utilização nos diferentes ensaios.

Cabe observar que para clareza das interpretações dos resultados e análises, os controles experimentais, Lipofectamina e DMSO tiveram seus resultados avaliados, e na maioria dos ensaios não causaram alterações nos níveis do produto metabólico investigado, em relação ao controle. Em casos pontuais, onde alterações foram observadas, esses resultados foram cuidadosamente relativizados em tabelas apropriadas, e seus valores

descontados ou imbuídos nas análises para não se alterar mascarar o efeito das moléculas mímicas e/ ou miméticas do miR-1914-5p.

Figura 1. Ilustração representativa das condições de cultivo celular para a realização das análises (cultivo, transfecção e indução de condições pró-esteatóticas).



2.2 Análise proteômica

A parte experimental proteômica foi realizada pela MSc. Letícia Ramos em 2018, sob orientação da professora Dra. Karen C. M. Moraes, que somente realizou algumas poucas análises de bioinformática. A metodologia utilizada para o preparo de amostras e a espectroscopia de massas, encontram-se descrita na referida dissertação da aluna.

2.2.1 Obtenção e digestão das amostras proteicas

Para a obtenção das amostras, $1,5 \times 10^6$ células em co-cultura (HepG2 e LX-2) foram crescidas em garrafas de 75 cm^2 nas diferentes condições de cultivo, conforme descrito anteriormente (item 2.1). O conjunto de células foi coletado por tripsinização e ressuspensão em tampão de lise (Triton X-100 0,5%, Tris HCl pH 7,2 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 2,5 mM, DTT 0,5%, PMSF 1 mM e 1 mM de inibidor de protease) por 30 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram sonificadas por 40 segundos em amplitude de 40% em sonificador *Sonics Vibra Cell VCX 130* (Sonics & Materials, Inc.) e centrifugadas a 10.000 g por 25 minutos a 4°C . O sobrenadante foi transferido para um tubo de 50 mL e foi adicionado 10 x o volume de acetona 100%. As amostras foram vortexadas e incubadas 30 minutos em temperatura ambiente para a precipitação das proteínas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.200 g por 15 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e 2 mL de água ultrapura foi adicionado. Posteriormente, as amostras foram secas em liofilizador *DryWinner 3* (Heto) e em seguida a quantificação das amostras foi realizada através do kit *QubitTM Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) em aparelho *QubitTM 3 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific). Para a continuação das análises, a $500 \mu\text{g}$ de proteína foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 7,9, contendo ureia a 7,5 M. As amostras foram incubadas

a 37 °C por 1 hora, a redução e a alquilação das amostras foram realizadas com a utilização de DTT 10 mM por 1 hora a 37 °C e iodoacetamina (IAA) 40 mM a 25 °C por 1 hora protegido da luz. Em seguida, as amostras foram diluídas em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 7.9 com cloreto de cálcio 1 M. Posteriormente, foi adicionada tripsina 20 ng/μL (*Sequencing Grade Modified Trypsin* - Promega) a 37° C por 18 horas para que ocorra a digestão. A digestão foi interrompida com o acréscimo de 5 μL de ácido fórmico. Em seguida, as amostras foram dessalinizadas utilizando uma coluna *Sep-Pak® Vac 1cc 100 mg C18 50 Cartridges* (Waters) de sílica condicionada com acetonitrila e ácido trifluoroacético (ACN/TFA 0,1%). Os peptídeos foram eluídos da coluna com ACN 80% / TFA 0,1% e concentradas em liofilizador *DryWinner 3* (Heto). Posteriormente, foram diluídas em acetonitrila a 50% / ácido fórmico 5% (v/v).

2.2.2 Espectrometria de massa

Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo μLC-ESI-micrOTOF-Q-III (Bruker Daltonics Bremen, Alemanha) acoplado a um sistema UFLC (Shimadzu) contendo duas bombas LC-20AD e um amostrador automático SIL- 20AHT. Foi utilizado um gradiente de 5 a 95% (v/v) ACN, contendo 0,05% (v/v) de ácido fórmico por 120 min, em coluna *XBridge® Peptide BEH C18 Column*, 300 Å, 3.5 μm (2.1 mm x 100 mm). Os dados de MS e MS/MS foram adquiridos em uma faixa de m/z 100 a m/z 2200. Os espectros MS/MS foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada pelo software *DataAnalysis* 4.1 (Bruker Daltonics). Em seguida, as análises de bioinformática foram realizadas com o servidor MASCOT 2.3.02 (Matrix Science, London, UK) com buscas contra o banco de dados *liver Homo sapiens* (310. 960 de entradas em 16/12/2019). Os parâmetros de busca foram utilizados de acordo com a taxonomia do organismo de estudo (*Homo sapiens*), assim como as modificações que possam ter ocorrido. Assim sendo, foram utilizados os seguintes parâmetros: a) Enzima: tripsina; b) Carbamidometilação (C) como modificação fixa; c) Oxidação (M) como modificação variável; d) Número de clivagens perdidas pela enzima: 3 e) Massa molecular do tipo: monoisotópica; f) Erro de tolerância de peptídeos ± 0,8 Da e erro de tolerância de MSn ± 0,8 Da; g) Protonação: +2, +3, +4 para o estado da carga dos peptídeos; h) Tipo de instrumento: ESI-Quad-TOF; i) Foram admitidos Protein Scores significativos (p<0,05) para a identificação das proteínas.

2.2.3 Análises de bioinformática: identificação gênica, enriquecimento de vias e redes de interação proteína-proteína a partir de análises proteômicas

As proteínas foram submetidas para análise no algoritmo Scaffold 4.3.2 (Proteome Software INC., Portland, OR) utilizando o cálculo do *FDR – false discovery rate* (< 1%), para validar a identificação dos peptídeos. Posteriormente, para interpretar os dados obtidos, o

agrupamento de proteínas foi realizado usando Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>) as análises das funções proteicas foram determinadas utilizando o banco de dados DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), o qual fornece um conjunto abrangente de ferramentas de anotação funcional para compreender o significado biológico por trás de grandes listas de genes. A ferramenta Funrich (<https://FunRich.org>), foi empregada para complementar o enriquecimento da análise funcional dos genes, na construção de gráficos como Venn e HeatMap, das proteínas. A ferramenta *String* (STRING, <https://string-db.org/>) foi empregada para simular as interações entre as proteínas usando uma pontuação mínima de interação de 0,7 para os modelos experimentais.

2.3 Ensaios bioquímicos epigenéticos

2.3.1 Quantificação da acetilação de histona H3 e H4

Os modelos celulares citados no item 2.1, primeiramente foram submetidos a extração de histona seguindo as recomendações descritas no protocolo do kit do fornecedor ABCAM ab113476 (*Histone Extraction Kit*). Para confirmação da extração, as amostras foram submetidas ao gel de SDS-PAGE e quantificadas no Nanodrop – NanoVue Plus (GE Healthcare, Life Sciences). Após, as amostras foram diluídas para a concentração de 200 ng/mL. A acetilação de histona H3 e H4 foi determinada utilizando o kit ABCAM ab115102 (*Histone H3 Acetylation Assay Kit*) e ab115103 (*Histone H4 Acetylation Assay Kit*), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Para a quantificação foram utilizados padrões de histonas do kit de 10 a 150 ng para a construção da curva padrão. Para a quantificação da acetilação, 2 µg de proteína histona das amostras foi utilizado. A acetilação foi determinada no leitor de placa modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (*Tecan, Crailsheim, Germany*) a 450 nm

Para encontrar a quantidade de acetilação das histonas H3 e H4 foi utilizada a seguinte fórmula:

$$ng/mg \text{ de proteína} = \frac{Abs \text{ amostras} - Abs \text{ do branco}}{Incrinação da curva} \times 1000$$

2.3.2 Quantificação de metilação de histona H3-K4

Para analisar o índice de metilação de histonas H3/K4, foi utilizado o kit P-30258 da Epigentek (*EpiQuik Global Pan-Methyl Histone H3-K4 Quantification Ki Colorimetric*), seguindo as recomendações do fabricante. Para a análise 100 ng das amostras proteicas de histonas extraídas foram utilizadas. Para a quantificação, uma curva de calibração foi determinada de 1 a 100 ng/µL com o controle padrão do kit. A metilação das histonas H3-K4,

foi determinada no leitor de placa modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (*Tecan, Crailsheim, Germany*) a 450 nm

Para o cálculo da quantidade em ng de mono-, di-, ou tri-metilação da H3/K4 o cálculo a seguir foi utilizado:

$$ng \text{ de histona metilada} = \frac{Abs (amostra - branco)}{proteína (\mu g) \times inclinação da reta} \times 1000$$

*Quantidade em μg de proteína adicionado aos poços.

2.3.3 Quantificação de metilação global do DNA

Para analisar o nível de metilação global de DNA das condições celulares, as amostras foram previamente submetidas a extração de DNA utilizando o kit *PureLink® Genomic (DNA Kits For purification of genomic DNA Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-0)*. A qualidade do DNA extraído foi confirmado em eletroforese em gel de agarose e sua quantificação foi determinada no Nanodrop – NanoVue Plus (GE Healthcare, Life Sciences). Na sequência, foi avaliado o perfil do nível de metilação global do DNA, utilizando-se o kit da ABCAM (*ab117128 Methylated DNA Quantification Kit – Colorimetric*) seguindo as recomendações do fabricante. Para a análise 100 ng de DNA das amostras previamente extraído foi utilizado. Para a quantificação uma curva padrão foi realizada com a amostra do kit na concentração de 0,5 a 10 ng/ μL . A metilação global do DNA foi determinada no leitor de placa modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (*Tecan, Crailsheim, Germany*) a 450 nm.

Para calcular o nível global de metilação do DNA, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$5 - mC \% = \frac{(Abs Amostra - Abs Controle negativo) \div 100 ng DNA}{(Abs Controle Positivo - Abs Controle negativo) \times 2 \div 5 ng Controle positivo} \times 100$$

2.3.4 Quantificação dos níveis de SAM e SAH

Para quantificação de SAM e SAH, foi utilizado o kit da *cel biolabs* STA-672 (S-Adenosylmethionine (SAM) ELISA) e MET-5151 (S-Adenosylhomocysteine (SAH) ELISA), respectivamente. As amostras celulares coletadas foram submetidas a lise em 500 μL de PBS por sonicação a 40 segundos com 40% de amplitude no equipamento *Sonics Vibra Cell VCX 130* (Sonics & Materials, Inc.). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000g por 15 minutos a 4°C e 50 μL do sobrenadante foi adicionado em cada poço da placa de ELISA. Para a análise, uma curva de calibração foi realizada utilizando os padrões do kit, do qual para SAM foi determinada de 0 a 25 μg , enquanto para SAH, a curva foi de 0 a 12 μM , conforme

recomendação do fabricante. A quantificação de SAM e SAH, foram determinados utilizando o leitor de placa modelo Infinite M200 Pro™ plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) a 450 nm.

2.3.5 Quantificação dos níveis de GSH

Para a quantificação dos índices de GSH, foi utilizado o kit KTB1600 da Abbkine (*CheKine™ Reduced Glutathione (GSH) Colorimetric Assay Kit*). Conforme descrito pelo fabricante, as condições celulares do item 2.1 foram coletados na concentração de 2×10^6 . As condições celulares foram submetidas ao processo de lavagem com PBS gelado e centrifugado a 600g por 10 minutos a 4°C. Após, o pellet obtido foi submetido a lise utilizando o tampão de extração do kit, com 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. As amostras foram submetidas a centrifugação a 8000g por 10 minutos a 4°C e 20 µL do sobrenadando foi adicionado nos respectivos poços. A curva padrão foi determinada de 0 a 100 µg/mL conforme recomendação do fabricante. A quantificação de GSH das amostras foi determinado no leitor de placa modelo *Infinite M200 Pro™* plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) 412 nm.

Para calcular a concentração de GSH a seguinte formula foi realizada:

$$\mu\text{g/mL de GSH} = (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) * a \text{ (da equação da reta da curva padrão)}$$

2.4 Ensaios de PCR quantitativo (qRT-PCR)

Os níveis de mRNA de todas as condições celulares de co-cultura foram investigados pelo método da PCR quantitativa em tempo real de transcrição reversa (RT-qPCR). Ao final de cada experimento celular descrito no item 2.1, o RNA total foi isolado utilizando TRIZOL® Reagent (*Thermo Fisher Scientific*) seguindo a orientação do fabricante. O RNA total de cada condição, foi então transcrito de forma reversa em cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). Subsequentemente, as amostras de cDNA foram quantificadas por qPCR utilizando o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific) em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems), após foram seladas com adesivo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™). As reações foram realizadas em triplicata e os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram projetados usando a plataforma Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) - Tabela 1. Os níveis de expressão de relevantes genes no metabolismo epigenético foram investigados. A expressão foi normalizada para o gene de

referência β -actina. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi usado para quantificação relativa e os gráficos foram plotados usando Graph Pad Prism® 8.9.

Tabela 1. Conjunto de primers utilizados para análise da PCR quantitativa.

Gene	Oligonucleotídeo sense (5'-3')	Oligonucleotídeo antisense (3'-5')	Amplicon pb
AHCY	TGAGCTCAGTGGTCTTGGAA	AGGCCTAGATGGCAAAACAC	100
BHMT2	GACGCAGTTCGTCAACTTCA	TCCTCACTGGCAGAAAAGGT	83
CBS	GGTAATCCTGGGAATGGTGA	GACTTTGCCAACTTGGTCTG	88
DHFR	ACCTGGTTCTCCATTCTCTGA	ATGAGCTCCTTGTGGAGGTT	96
DNMT1	GCGCACTGAAAAGGAGGAAGAAG	CAGTTTCTGTTTGGGTGTTGG	88
DNMT3A	TGTGCCAAAAGTCAAGAAG	CAGCAGATGGTGCAGTAGGA	85
DNMT3B	TTGAATATGAAGCCCCCAAG	CGATGCCATCAAACAATGAC	87
GNMT	ATGCCAGTGACAAGATGCTG	GCTTCTTCGATGACCCACTT	91
HADAC1	TAAATTCTTGCGCTCCATCC	AACAGGCCATCGAATACTGG	102
HADAC2	GAATCCGCATGACCCATAAC	TTCTTCGGCAGTGGCTTTAT	89
HADAC3	ATGTATGAAGTCGGGGCAGA	GATAACCGGCTGGAAAAGGT	105
HADAC4	ACGACGCCAAAGATGACTTC	TCGGCCACTTTCTGCTTTAG	88
HAT1	GCCATGGTGCTCAACTTCTT	GGATGGATCTTCCGCTGTAA	86
MAT1A	ATCCCCAGATATTGCCAGT	GCATAGCCGAACATCAAACC	87
MAT2A	GTTGTGCCTGCGAAATACCT	ATTTTGCGTCCAGTCAAACC	110
MAT2B	CCCCACACATGTCAAAGATG	ATTGCCAGACCAGTGAAAGG	100
MTHFD1	TCAAACCTGGGGCAATAGTC	TATGCCACATCACCCACAAC	94
MTHFD1L	CATTTGCCTCCCTCCAGATA	GCAAGGCCATGTACTCTGGTAT	87
MTHFD2	ATGGCCTCCTTGTTCAAGTTG	GCCATCAACATCCTTGTCTG	89
MTHFR	GCTGACCTGAAGCACTTGAA	TCACAAAGCGGAAGAATGTG	97
MTR	ACAGCAGCATCATGGTCAAG	TTCTCGGCGAACTCTTTCAT	83
MTRR	TGCTTGTTGGATCTCCTCCT	GAGCTTGACACGAATATGG	97
NNMT	CACTCTGCAGAAAGCCAGATT	AATCAGCAGGTCTCCCTTCA	110
p300	ACAGGCAGGCTTGACTTCTC	TTCCCATGGCAGGCTGATTT	113
SET	GGTCCCGATATGGATGATG	ATCCTCATCCCCTTCTTCGT	105
SHMT1	AAGCTGATCATCGCAGGAAC	CCCGTTCTCATCTGCAATCT	81
SHMT2	CGGGAGATCCCTTACACATTT	TACTGCAGCAATGGCATGAT	93
SIRT1	GTTTTTGCCACCAAATCGTT	TCTGGCATGTCCCACTATCA	116
SIRT3	TCTCTGAGACAGGGAAGGCA	GAAGGAGCCTGTGCAGAAGT	96
TRRAP	GGAAGATGCTGAAGGAGTCG	CTTTGCAGTCGGAAAACCTCC	90

2.5 Western Blot

As análises de *western blot* foram realizadas seguindo protocolo descrito em Da Silva et al., (2016). Para os ensaios, 100 μ g de proteína foram separadas em gel de poliácridamida a 10%, seguido de transferência das proteínas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), bloqueio em Blotto (5% leite-desnatado e TBS-T) e incubadas com anticorpos primários e secundários específicos. Nesses ensaios foram utilizados os anticorpos primários Anti-AHCYL (Cell Signalling - USA) e anti- β -actina (Cell Signaling, USA), incubados por 24 horas overnight a 4°C. Os anticorpos secundários conjugados Anti-rabbit (Cell Signalling - USA) foram incubados, por 2 horas. A imunoreatividade dos anticorpos foi detectada através

de kit de reação quimioluminescente e exposto em filme de raio-X (ECL – GE *Healthcare Life Sciences*). Para a quantificação relativa dos níveis de proteína, o software Image J (<http://rsbweb.nih.gov>) (SCHNEIDER et al., 2012) foi utilizado, tomando como normalizador os níveis proteicos de β -actina.

2.6 Gráficos e análises estatísticas

Três valores de cada ensaio (triplicata), foram utilizados para as análises, e os gráficos foram plotados usando Graph Pad Prism® 5. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e as diferenças entre as células sem tratamento (controle) e os demais grupos investigados, usando análise unidirecional de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Dunnett*. Quando necessário as análises de *Tuckey* também foram realizadas e a significância foi definida em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

3 Resultados

3.1 Análise de estudos proteômicos: abordagem de bioinformática e sua validação funcional

3.1.1 Análise proteômica de co-cultura de células hepática sugere indução de pró-esteatose no modelo celular incubado com ácidos graxos e sugere atuação do miR-1914-5p em processos epigenéticos.

A abordagem proteômica qualitativa de alto rendimento baseada na estratégia de *shotgun* foi utilizada para obter uma visão abrangente dos conjuntos de proteínas de cada condição celular descrita no item 2.1. A análise de bioinformática dos resultados, usando os algoritmos apropriados para a análise proteômica (item 2.2.3) apontou particularidades na expressão de proteínas em cada grupo analisado. Cabe observar, que para todas as análises, controles experimentais foram processados nas diferentes condições de cultivo celular. A Tabela 2 apresenta os resultados tabulados pelo algoritmo Scaffold 4.3.2 (Proteome Software INC., Portland, OR) utilizando o cálculo do *FDR* – *false Discovery rate* e Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org/>), que aponta a presença de vários peptídeos, nas análises. Na sequência, a tabela 3 apresenta uma lista completa dessas proteínas diferencialmente expressas.

Tabela 2. Número total de proteínas apontadas em análises proteômicas nos diferentes grupos experimentais investigados.

Co-culturas	Número
Controle experimental	65
400 µM AG (2 oleico: 1 palmítico)	252
400 µM AG + 40 nM miR-1914-5p mimico	500
400 µM AG+ 40 nM miR-1914-5p inibidor	438
DMSO (solvente)	581
Lipofectamina RNaimax	230

AG = ácidos graxos

Tabela 3. Proteínas identificadas na proteômica com corte igual ou superior a 5 proteínas por condição celular.

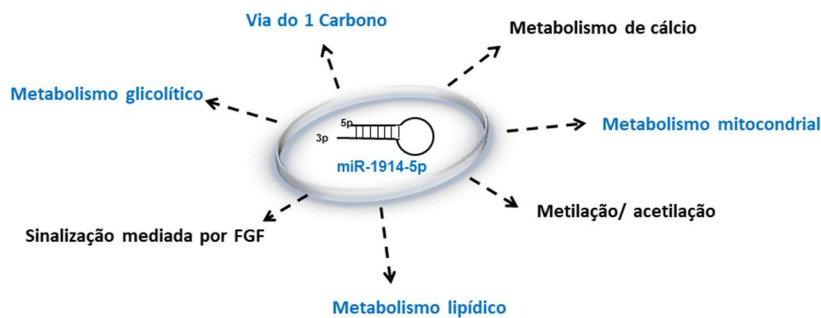
Proteínas identificadas (com cortes acima de 5 proteínas)	Gene	ID	Controle	400 µM AG	400 µM AG + 40 nM miRNA mimico	400 µM AG + 40 nM miRNA Inibidor
60 kDa heat shock protein	HSPD1	gi 129379 (+3)	10	9	62	87
Tubulin alpha-1C	TUBA1C	gi 20455322 [3]	65	80	21	32
Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	gi 20455322	15	14	10	9
Tubulin alpha-4A	TUBA4A	gi 55977476	2	6	1	0
Tubulin beta-5 chain	TUBB5	gi 56757569	35	62	2	8
Alpha-enolase	ENO1	gi 119339	18	50	12	5

Cluster of M2-type pyruvate kinase	PKM	gi 189998 [46]	16	43	6	4
M2-type pyruvate kinase	PKM	gi 189998 (+1)	9	36	1	0
Annexin 2	ANXA2	gi 113950 (+3)	38	21	8	30
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	gi 31645	15	25	10	7
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	gi 126047 (+32)	3	26	5	1
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90B1	gi 17865718 [6]	4	20	12	5
Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90B1	gi 17865718	4	18	2	3
Glucose-regulated protein	GRP78	gi 119360 (+1)	0	2	10	2
Heat shock cognate 71	HSPA8	gi 123648 (+1)	6	11	3	5
Profilin-1	PFN1	gi 130979	16	19	5	3
Triosephosphate isomerase	TPI1	gi 353526311 (+1)	10	17	5	3
Transketolase	TKT	gi 1729976 (+2)	2	26	5	0
ATP synthase subunit beta	ATP5F1B	gi 114549 [19]	0	3	39	40
Vimentin	VIM	gi 55977767 [3]	0	10	39	30
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	PPIA	gi 223459776 (+2)	1	16	2	3
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	gi 126041	5	7	7	1
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	gi 52000887	10	15	3	2
Cofilin-1	CFL1	gi 116848	6	9	6	5
Peroxiredoxin-6	PRDX6	gi 1718024 (+1)	3	12	2	1
Heat shock 70 kDa protein 1B	HSPA1B	gi 167466173 (+2)	5	4	5	6
Annexin A1	ANXA1	gi 113944	3	23	0	11
14-3-3 epsilon	YWHAE	gi 1561719 (+1)	2	18	3	3
Elongation factor 2	EEF2	gi 119172	3	17	1	0
Peroxiredoxin-1	PRDX1	gi 548453	6	24	2	9
Phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	gi 130348 (+3)	0	18	0	0
carbamoyl-phosphate synthase	CPS1	gi 1603768567	1	4	10	7
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	gi 92090606	3	11	2	1
Filamin-B	FLNB	gi 296434507 [2]	5	3	3	8
Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	gi 113606 [6]	9	12	4	1
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	gi 52788229	0	8	2	0
10 kDa heat shock protein	HSPB1	gi 47606335	2	0	11	9
Annexin A5	ANXA5	gi 113960	1	14	0	0
Alpha-actinin-4	ACTN4	gi 13123943 [4]	0	0	5	8
Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	EIF5A	gi 54037409	7	3	3	3
Protein disulfide-isomerase A6	PDIA6	gi 2501205	1	7	4	5
nucleophosmin isoform 1	NPM1	gi 957949912	0	0	3	6
CD98	CD98	gi 257051063	0	1	7	14
Thioredoxin	TXN	gi 135773	2	3	5	2
TCP-1-eta	TCP1	gi 3041738	0	13	0	0
T-complex protein 1 subunit zeta	TCP1	gi 730922	4	11	0	0
NME1-NME2 readthrough transcript	NME1-					
protein disulfide-isomerase precursor	NME2	gi 124376250 (+1)	2	7	1	0
Myosin-9	PDIA3	gi 20070125 (+1)	0	6	5	0
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	MYH9	gi 6166599	4	4	0	0
Importin subunit beta-1	BiP	gi 14916999	1	1	6	1
14-3-3 protein theta	KPNB1	gi 20981701	0	6	0	0
	YWHAQ	gi 112690	2	7	3	0

26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	gi 317373273 (+1)	5	6	0	0
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	gi 17380385	0	10	1	0
Fatty acid synthase	FASN	gi 269849686 (+1)	0	10	0	0
Cluster of ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	gi 156071459 [5]	0	0	4	6
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	C1QBP	gi 730772	5	0	3	5
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	gi 1170955 (+1)	0	7	2	1
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	gi 130683	0	0	5	9
RPS5	RPS5	gi 1494127361 (+1)	0	5	2	3
Clathrin heavy chain 1	CLTCL1	gi 1705916 (+2)	1	0	1	1
prohibitin-2 isoform 1	PHB2	gi 221307584 (+2)	0	0	2	9
lysosome-associated membrane protein-2	LAMP2	gi 1195542 (+3)	0	0	6	6
Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	gi 215274114	0	1	7	5
histone H4	H4C14	gi 386773 (+1)	0	0	4	10
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	gi 48429103	0	5	1	2
ribonucleoside-diphosphate reductase M1 chain variant	RRM1	gi 62897131	1	0	0	0
Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	gi 13638228	0	4	0	0
Prohibitin isoform 1	PHB1	gi 4505773 (+3)	0	0	2	5
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	gi 24418865	0	0	0	0
Talin-1	TLN1	gi 81175200	0	6	0	0
LysR family transcriptional regulator	KARS1	gi 1380301696	0	0	0	7
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	PFAS	gi 317373541	0	9	0	0
60S ribosomal protein L6	RPL6	gi 1350762 (+9)	0	1	0	0
Vinculin	VCL	gi 21903479	0	0	0	0
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	gi 294862538	0	0	0	0
Exportin-2	Exportin2	gi 62297557	0	0	0	0
Cluster of eIF-2-alpha kinase activator GCN1	GCN1	gi 296439506 [2]	0	0	0	0
Pyridoxal kinase isoform 2	PDXK	gi 1061899879 (+2)	0	0	0	0
Serine/threonine-protein phosphatase 2A	PP2A	gi 143811355	0	0	0	0
eIF3 p47	EIF3A	gi 6685511	0	0	0	0
CAND1	CAND1	gi 67460541	0	0	0	0
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	G6PD	gi 20981679	0	0	0	0
Histone H1.4	H1-4	gi 121919 (+2)	0	0	3	6

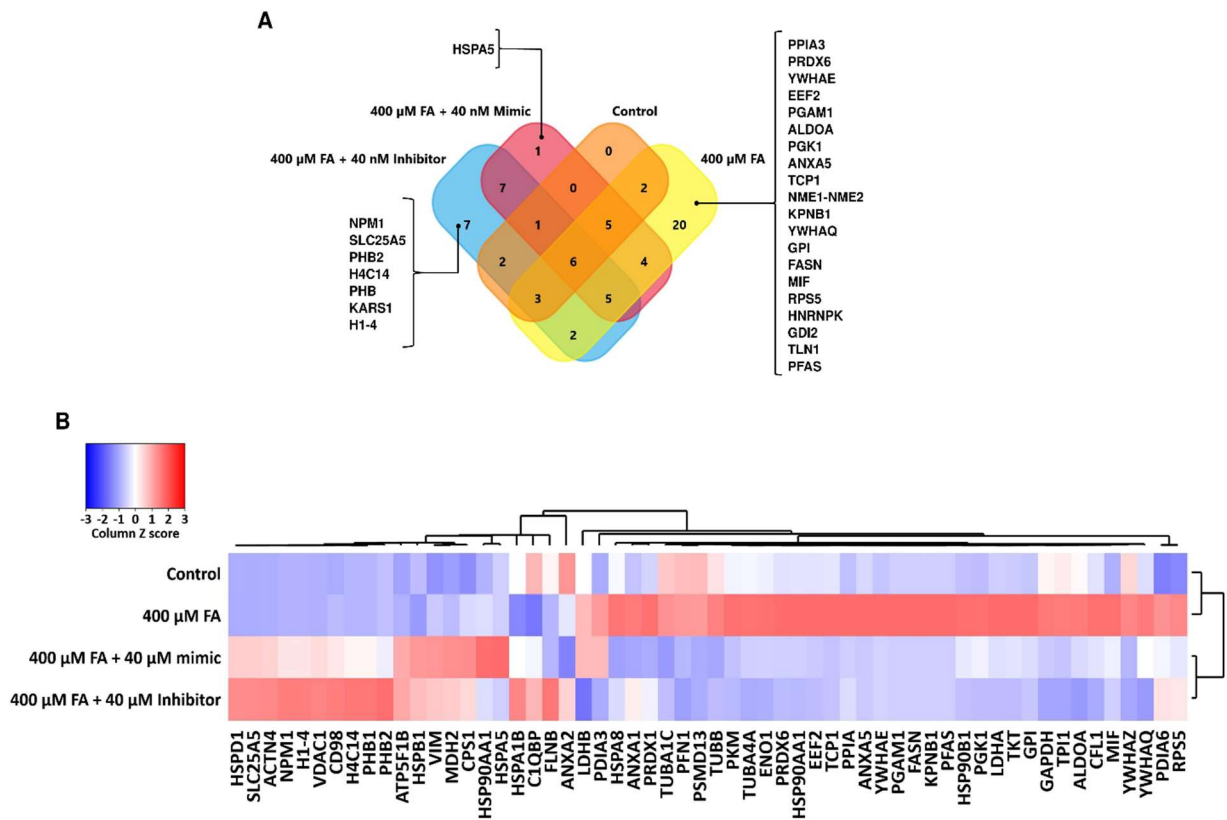
Considerando-se os resultados, foram adotados critérios para avaliar possíveis rotas metabólicas nos quais o miR-1914-5p possa estar modulando. Para isso, o algoritmo DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) e Panther (pantherdb.org) foram utilizados no agrupamento das proteínas em rotas fisiológicas gerais. A Figura 2 apresenta os resultados principais obtidos.

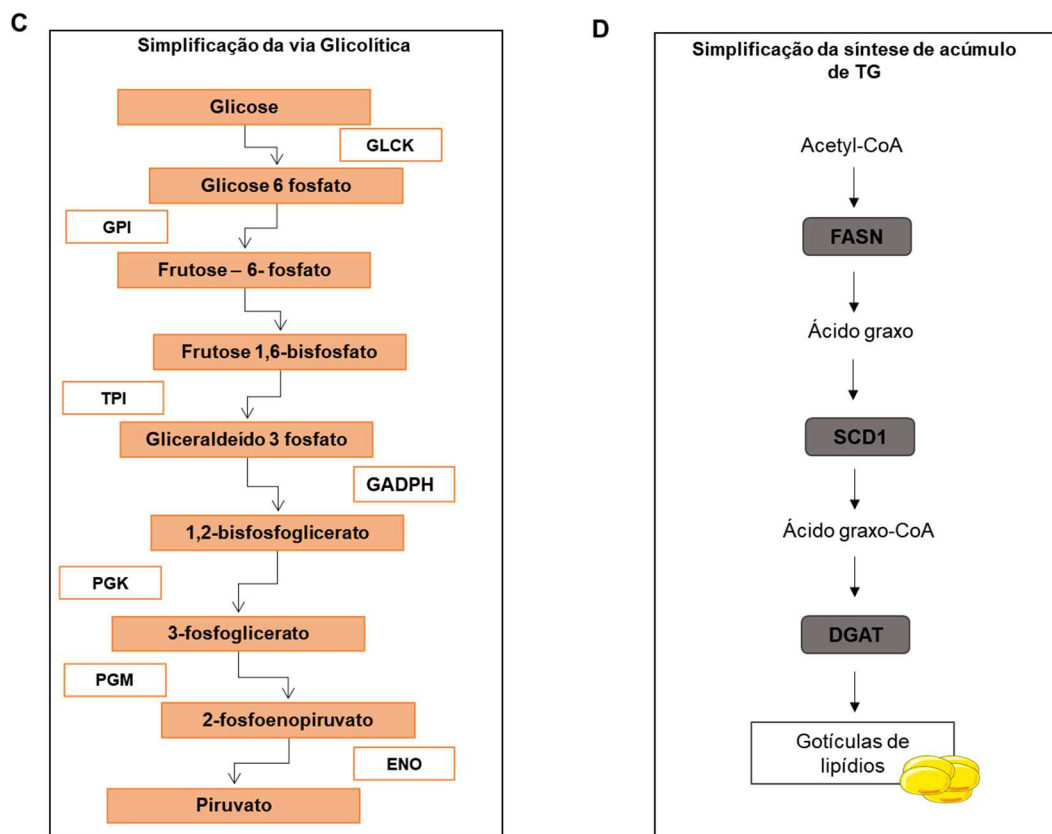
Figura 2. Principais rotas fisiológicas apresentadas na análise.



Assim, considerando-se as rotas metabólicas apontadas e complementares as informações de bioinformática, a ferramenta FunRich ([FunRich :: Functional Enrichment Analysis Tool :: Home](#)), que faz um enriquecimento de dados ômicos para análises funcionais, foi utilizado para construção da figura 3.

Figura 3. A - Diagrama de Venn com a sobreposição das proteínas identificadas nas quatro diferentes condições investigadas. B – HeatMap dos níveis de expressão das proteínas identificadas na proteômica de cada condição investigada. C – Esquema da via glicolítica. D – Esquema simplificado da síntese de ácido graxos.





Os resultados apresentados apontam que nas co-culturas incubadas com a mistura de ácidos graxos (AG) 20 proteínas foram expressas exclusivamente nesta condição, enquanto nas células transfectadas com o inibidor ou o mímico do miR-1914-5p, apresentaram expressão diferencial de 7 e 1 proteínas, respectivamente. A cultura considerada controle experimental não apresentou expressão diferencial / exclusiva de proteínas (Figura 3A). As proteínas fosfoglicerato Mutase 1 (PGAM1), fosfoglicerato quinase 1 (PGK1), glicose-6-fosfatase isomerase (GPI), envolvidas especificamente na metabolização da glicose (DU, 2022) (Figura 3 C), foram identificadas apenas na condição com AG, assim como a ácido graxo sintase (FASN), envolvida no processo de síntese de ácidos graxos (CHENG, 2020) (Figura 3D). Esses resultados são esperados, uma vez que o modelo se baseia na indução da pró-esteatose, portanto, as vias envolvidas na síntese e acúmulo de TG, assim como a da glicose, são esperadas estarem em maior evidência nesta condição.

Já na condição celular com a transfecção do mímico do miR-1914-5p, foi observada expressão exclusiva da proteína de choque térmico A (Hsp70) membro 5 (HSPA5), que é pertencente à família das Proteína de Choque Térmico (Figura 3 A), com nível elevado de expressão (Figura 3 B). Na mesma condição, outras proteínas também pertencentes a família das proteínas de choque térmico foram observada com níveis elevados (Figura 3 B). Esses resultados sugerem possível estresse celular pela presença do miRNA.

Diferentemente, na condição com o inibidor do miR-1914-5p, as HSP não apresentaram expressões elevadas quando comparadas (Figura 3 B), além disso, foi observada a presença exclusiva das proteínas histonas da família H1 e H4, as quais são relacionadas aos processos epigenéticos (ANWAR; RASHID; FAROOQ, 2022), assim como, foi observada o aparecimento exclusivo das proteínas proibitina 1 (PHB1) e proibitina 2 (PHB2) com elevada expressão (Figura 3A, B), atuantes nas atividades internas das mitocôndrias e que não foram observadas nas demais condições celulares. Em conjunto, os dados observados evidenciam a atuação das moléculas do miR-1914-5p, nos processos observados na figura 2, as quais destacam o metabolismo mitocondrial, lipídica, e via do 1C.

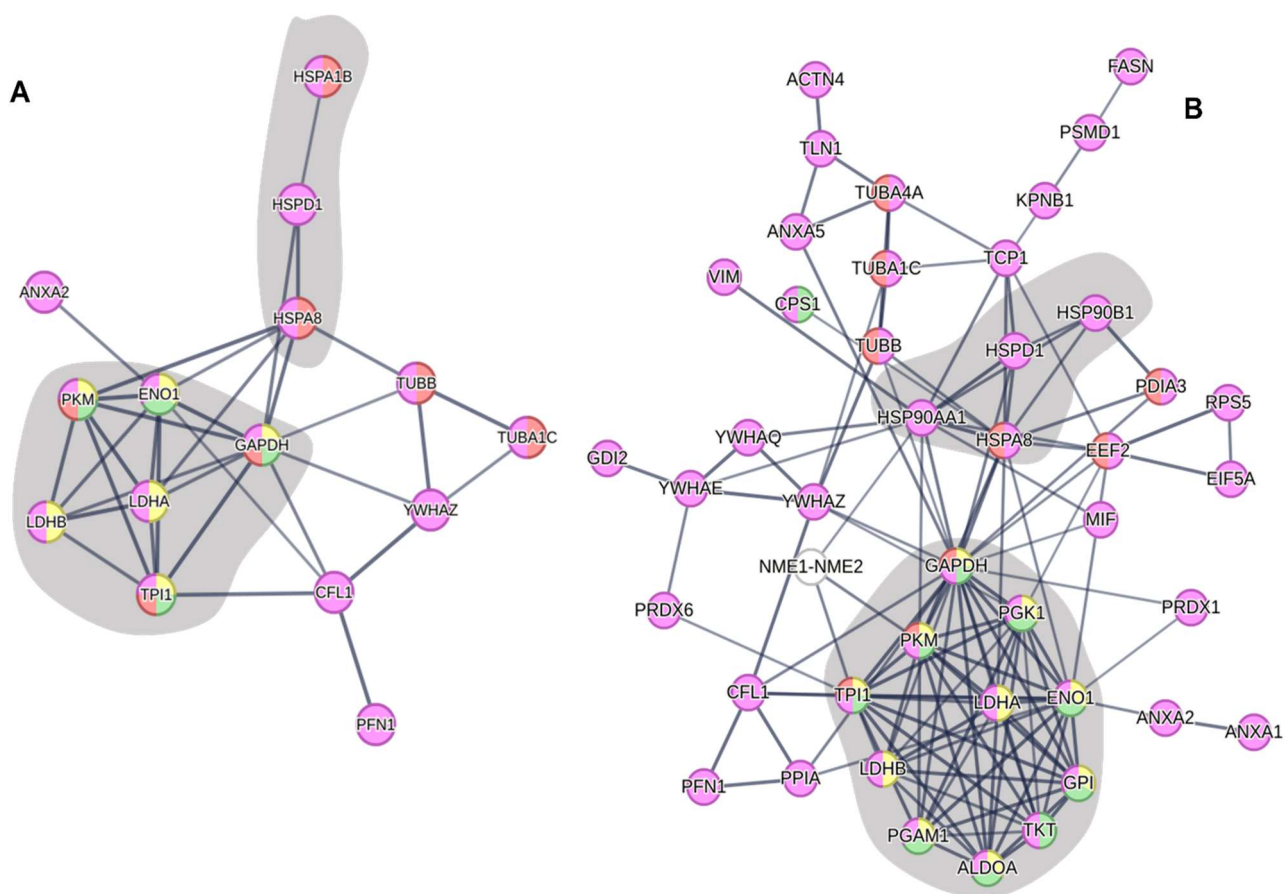
3.1.2 Redes de interação proteína-proteína sugerem atenuação da via glicolítica e da gliconeogênese após inibição do microRNA1914-5p

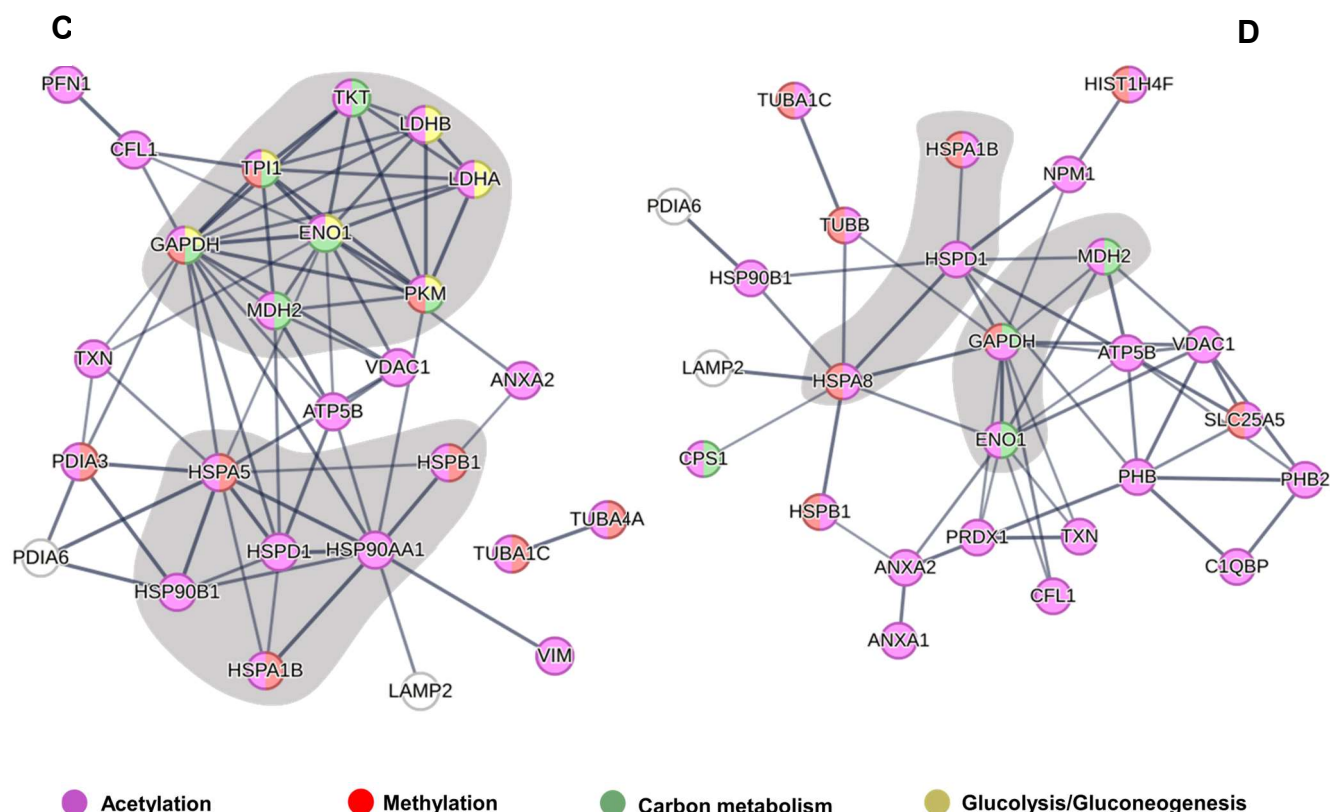
Usando o banco de dados STRING v10.5, construiu-se redes de interação proteína-proteína (PPI do inglês: *Protein-Protein Interaction*) a partir de resultados das análises proteômicas para estimar possíveis vias moleculares predominantes em cada uma das condições de cultivo celular (Figura 4). Para esta análise, utilizamos um *score* de alta confiança (0,700) e um número máximo de 2 interações entre as proteínas, para visualizar as interações com maior probabilidade de ocorrência no universo celular. Conforme ilustrado na Figura 4 (A, B, C e D), as cores dos nódulos representam as atividades biológicas que cada proteína está envolvida, podendo cada uma apresentar mais de uma atividade. Quando analisado os resultados obtidos, observa-se forte prevalência de conexão entre proteínas relacionadas a processos de acetilação nas quatro condições investigadas.

Ao observar as condições celulares separadamente, no AG o nível de interação de proteínas relacionadas a síntese de glicólise e gliconeogênese apresentaram estimativa de interação formando uma rede de conexão entre elas (Figura 4 B), além disso, uma rede também foi observada entre as proteínas de choque térmico (HSP). Similarmente, o cultivo celular com o mímico do miR-1914-5p, apresentou o mesmo padrão que a condição com AG, entretanto sua rede de interação apresentou menor conexão entre as proteínas glicolíticas e as HSP (Figura 4 C). Em ambos os tratamentos se observou as proteínas GAPDH, TPI1, ENO1 e PKM todas envolvidas na via glicolítica e gliconeogênese, assim como, as HSPD1, HSP90B1, HSP90AA1 e HSPA8, envolvidas na resposta ao estresse celular. Portanto, a estimativa de interação e conexão proteica da via glicolítica observada em ambas as condições (AG e mímico), podem sugerir aumento da metabolização energética, e aceleração dos processos celulares, e como consequência ativando proteínas de choque térmico, os quais podem estar ocorrendo por uma resposta da perturbação no metabolismo ocasionada pela presença do AG e do miRNA.

Diferentemente, o cultivo celular com o inibidor do miR-1914-5p apresentou baixa interação entre as proteínas relacionadas a síntese glicolítica, não formando uma rede de interação (Figura 4 D). Entretanto, mesmo a conexão da via glicolítica apresentar atenuação com a presença da molécula do inibidor, proteínas chaves para o metabolismo de energia continuam presentes e interligadas pelo GAPDH, Enolase 1 e MDH2, evidenciando continuidade na atividade do metabolismo energético (SHEN et al., 2015). Esses dados sugerem continuidade da atividade metabólica energética no inibidor e possível atenuação da perturbação celular ocasionada pelos processos pró-esteatótico.

Figura 4. Esquemas ilustrativos de possíveis interações proteína-proteína de grupos representativos de cada uma das condições investigadas nas análises proteômicas. A – Grupo controle. B – Grupo tratado com 400 μ M de ácidos graxos (AG). C – Grupo transfectado com 40 nM de molécula mimética/mímica e tratado com 400 μ M AG (400 μ M AG + 40 nM mímica). D – Grupo transfectado com 40 nM de molécula inibidora e tratado com 400 μ M AG (400 μ M AG + 40 nM inibidor).



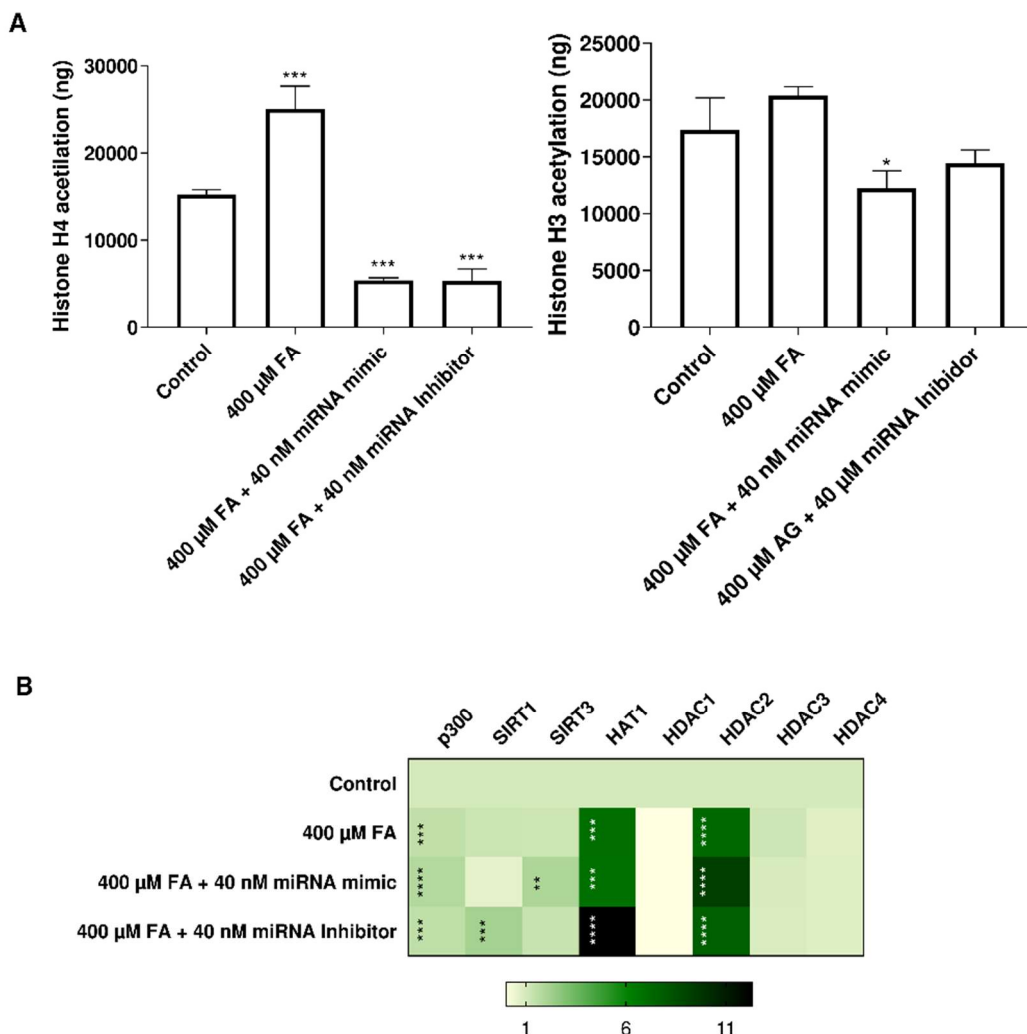


3.2 Validação dos resultados proteômicos no modelo celular de co-cultura

3.2.1 Níveis de acetilação de histonas H3 e H4 aumenta na presença de AG e não apresenta modulação pelo miR-1914-5p.

Para investigar e validar os resultados correlatos aos processos epigenético modulados pelo miR-1914-5p e sugeridos pelas análises proteômicas, ensaios bioquímicos e moleculares foram realizados. Para isso os níveis de acetilação de histonas H3 e H4 foram quantificados (Figura 5 A). Os resultados apontaram que os níveis de acetilação das histonas H3 e H4 aumentaram, em relação a condição controle experimental, na presença de AG (17% e 64%, respectivamente, para H3 e H4). Já nas células transfectadas com cóclon e inibidor do miR-1914-5p, a acetilação da H3 não apresentou diferenças em relação a condição controle, enquanto os níveis de acetilação da histona H4 reduziu em ~65% para ambas as condições de transfecção (Figura 5 A). Embora os índices da acetilação tenham reduzidos, esses resultados sugerem a não interferência diferencial das moléculas cóclon e inibidora do miRNA nesses mecanismos, uma vez que não houve diferença entre as células transfectadas com essas moléculas. Entretanto é possível que a presença ou a inibição do miRNA possa estar modulando vias secundárias e indiretamente modulando a acetilação da histona H4. É necessária uma investigação mais ampla dos mecanismos de atuação deste miRNA para de fato compreender as vias paralelas que esta molécula pode regular e secundariamente modular atividades metabólicas.

Figura 5 – Análise epigenética de acetilação. A – Níveis de acetilação de histona H3 e H4. B – Heat map do nível de expressão de genes atuante na via de acetilação



Para complementar a análise, genes principais nos processos de acetilação, como p300 e Histona acetiltransferase 1 (*HAT1*) foram analisados e seus níveis transcricionais foram significativamente elevados nas três diferentes condições (AG, mímico e inibidor) com 49%, 80% e 52% respectivamente, a mais que o controle. Embora este resultado corrobore com o aumento da acetilação no cultivo com AG, o mesmo não foi observado para os as condições com mímico e inibidor do miRNA, uma vez que a acetilação foi reduzida e em ambos e os genes encontravam-se elevados. Entretanto, o aumento significativo nos níveis transcricionais da sirtuina 1 (*SIRT1*) (~2x inibidor) e da histona decetiltransferase 2 (*HDAC2*) (~9x a mais no mímico e ~6x a mais no inibidor), responsáveis pela deacetilação de histonas, em ambos os genes (Figura 5 B), pode justificar os índices de acetilação reduzido nesta condição. É possível que o aumento da *HDAC2* seja uma resposta pelo aumento de *HAT1*, devido aos níveis elevados de acetilação (ARIAS-ALVARADO et al., 2020). Ainda, o nível elevado das deacetiltransferases pode ter ocorrido mecanisticamente por indução da presença do AG nas condições, para controlar/amenizar a acetilação que apresentou

aumento com a adição de AG. Contudo, os resultados observados não apresentam modulação pela presença e/ou inibição do miR-1914-5p, nas atividades de acetilação.

3.2.2 Inibição do miR-1914-5p apresenta atenuação da condição pró-esteatose do modelo de co-cultura por possível atuação na via do 1C.

Para analisar outros mecanismos epigenéticos, elementos correlatos aos processos de metilação foram avaliados. Inicialmente foi quantificado os níveis de SAM e SAH, dos quais apenas SAH apresentou aumento significativo nas três condições celulares (AG, mímico e inibidor com 28%, 20% e 24%, respectivamente) frente ao controle, mas sem diferença entre eles (Figura 6 A). Esse resultado evidencia que a modulação está acontecendo pela presença dos Ags e não por atuação e/ou ausência da molécula de miR-1914-5p. Entretanto, ao analisar os índices de metilação global do DNA no cultivo com AG, este apresentou redução de ~60% do nível de metilação quando comparado ao controle, diferente das condições com a molécula mímica e inibidora do miR-1914-5p que não apresentaram alterações significativas (Figura 6 B). Em paralelo, o nível de metilação das histonas H3/K4, também foram observadas e na condição com AG houve um aumento significativo de metilação da histona H3/K4 de ~16% frente ao controle (Figura 6 B). Os cultivos celulares com mímico e inibidor do miR-1914-5p também não apresentam alterações significativas na metilação das histonas H3/K4. Esses dados em conjunto, sugerem que a presença do AG está modulando os níveis de metilação.

Para complementar esta análise, os níveis transcricionais dos genes atuantes nos processos de metilação e ciclo do carbono foram analisados (Figura 6 C). Na condição com AG, o gene *MAT2A* se destacou por seu aumento transcricional significativo de ~20 vezes mais que o controle. Este gene é conhecido por substituir a expressão do gene *MAT1A* no fígado em condições de estresse, rápido crescimento e diferenciação celular (LU; MATO, 2005). Esses dados corroboram com nossos resultados, uma vez que o gene *MAT1A* apresentou redução da sua transcrição na condição com AG, sugerindo desequilíbrio nos processos moleculares nesta condição. Similarmente, o cultivo com o mímico do miR-1914-5p, apresentou aumento transcricional significativo do *MAT2A* (~20x) frente ao controle, enquanto o gene *MAT1A*, também foi reduzido. Além disso, foi observado o aumento transcricional significativo de *MAT2B* (~6x) frente ao controle na condição com o mímico. Este gene controla a atividade de *MAT2A*, e ambos são expressos em tecidos extra-hepáticos como células não parenquimatosas do fígado (por exemplo, células estreladas hepáticas e células de Kupffer) (LU; MATO, 2005). Além disso, a expressão em conjunto desses genes ocorre em múltiplas doenças hepáticas durante o crescimento e diferenciação celular (MURRAY et al., 2019). Esses dados evidenciam aumento da perturbação celular com a presença do mímico do miR-1914-5p em condições de pró-esteatose.

Diferentemente, na condição com o inibidor do miR-1914-5p, embora o nível transcricional do gene *MAT2A* esteja significativamente aumentado (~4x) frente ao controle, o gene *MAT1A* surpreendeu com um aumento transcricional significativo de ~28 vezes a mais que o controle. Esse resultado pode sugerir possível tentativa da recuperação do equilíbrio celular pelo aumento do gene *MAT1A* após inibição do miR-1914-5p. Juntamente com esse resultado, os genes *BHMT2*, *MTHFD2* e *MTR*, também apresentaram níveis transcricionais significativamente elevados (~4x, ~10x e ~10x, respectivamente). Além destes, o gene *AHCY* também surpreendeu com seu alto nível transcricional significativo de ~19x mais que o controle. Ainda os níveis proteicos deste gene que não foram observados na condição mimica foi observada a recuperação da expressão na condição com o inibidor (Figura 6 E). Esses resultados reforçam que a inibição do miR-1914-5p esteja influenciando o aumento transcricional de genes atuantes na via do 1C, evidenciando tentativa molecular da célula de recuperar o equilíbrio nas condições de pró-esteatose.

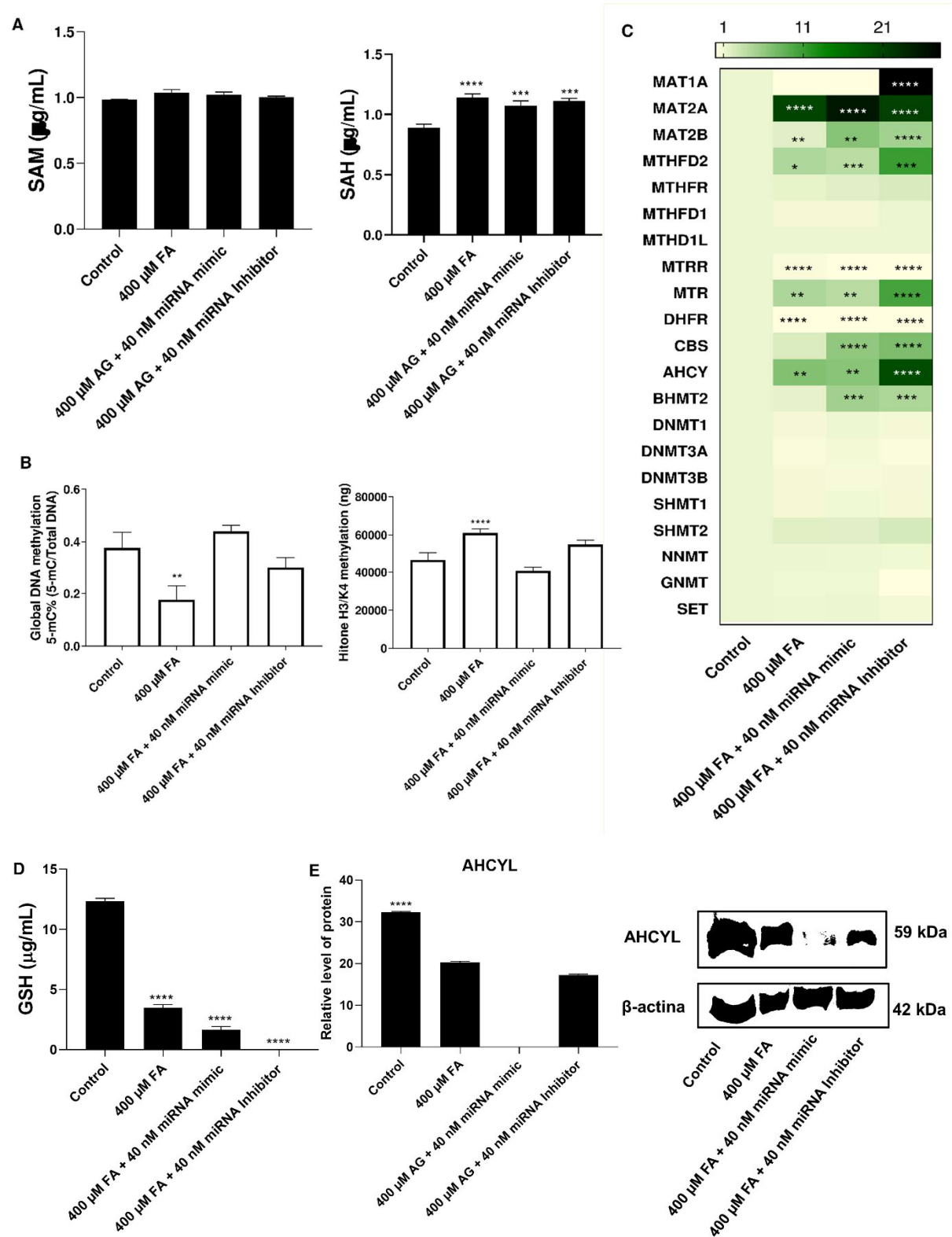
3.2.3 Inibição do miR-1914-5p reduz GSH por possível utilização para o equilíbrio da célula.

Com o aumento do *AHCY*, tanto transcricional quanto proteico, foi investigado o índice de GSH proveniente da via da transsulfuração (Figura 6 F), uma vez que o *AHCY* é responsável pela produção de homocisteína, o principal substrato para ativação desta via. Entretanto, os índices de GSH, foram reduzidos em 70% após adição de AG e 80% após a adição do miRNA-1914-5p, já o inibidor do miR-1914-5p não apresentou índices de GSH (Figura 6 D). Quando observado o índice transcricional do gene *CBS*, responsável pela conversão da homocisteína em cistationina o primeiro produto do início da via da transsulfuração, seus índices apresentaram-se elevados nas três diferentes condições: AG (~1x), mímico (~5x) e inibidor (~6x) a mais, quando comparados ao controle (Figura 6 C). Esses dados sugerem que pode não ter ocorrido uma inibição da via da transsulfuração mas sim sugerir que a inibição do miR-1914-5p, pode ter aumentado/facilitado o consumo exacerbado da molécula GSH, uma vez que esta é essencial para o potencial redox da célula. Entretanto, em complementaridade ao analisarmos a transcrição gênica, o gene *MTR*, também responsável pela captação da homocisteína e sua conversão em metionina, apresentou aumento significativo na condição com o inibidor do miRNA. O gene *MTR* aumentou ~10 vezes mais sua transcrição que o controle e ~6 vezes mais que a condição com AG (Figura 6 E). Esta observação do aumento do *MTR* em conjunto com o possível uso exacerbado do GSH, pode explicar a ausência da molécula de GSH na condição com o inibidor do miR-1914-5p.

Contudo, em conjunto os resultados observados na condição com o inibidor mostraram atenuar os desequilíbrios celulares observados em condição de pró esteatose do modelo

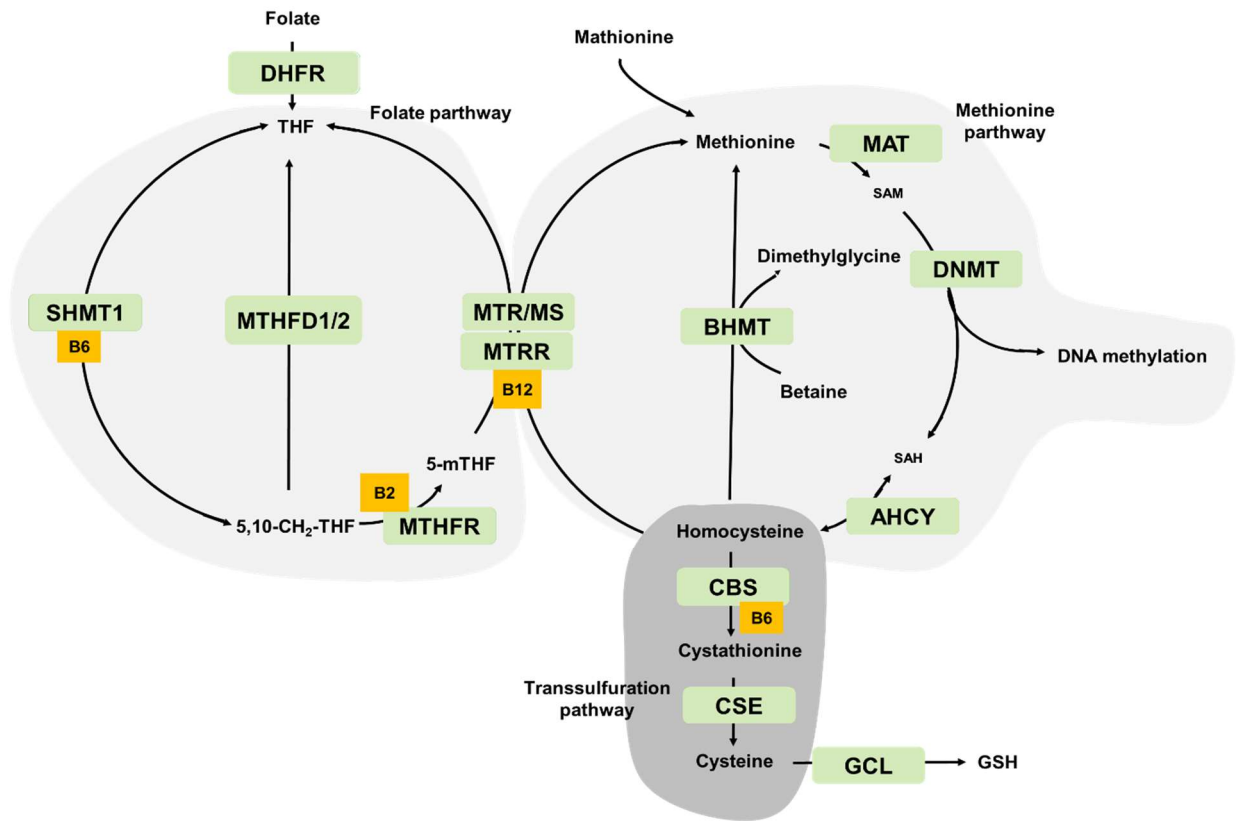
celular, ao comparar a sua similaridade de resultados com a condição controle, o que pode sugerir a utilização imediata do GSH, pela biotransformação de resíduos tóxicos e do estresse oxidativo causado pela presença da mistura de AGs. Os níveis intra e extracelulares de GSH são determinados pelo equilíbrio entre sua produção, consumo e transporte e devido às importantes funções fisiológicas do GSH, esses processos são fortemente regulados. As atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do GSH são controladas nos níveis transcricional, translacional e pós-traducional (AQUILANO et al., 2014), cabendo, portanto, uma avaliação mais detalhada de todas as etapas. Futuras análises em modelos translacionais poderão comprovar tais observações.

Figura 6. Análise epigenética dos processos de metilação. A – Níveis de SAM e SAH. B – Nível de metilação global do DNA e nível de metilação de Histonas H3-K4. C – Nível de expressão dos genes atuante na via da metilação e transsulfuração. D – Nível de GSH. E – Western Blot. F – Via do 1 elaborada pela autora da tese utilizando como base o artigo de CLARE et al., 2018.



F

Via do 1 Carbono



4 Discussão

A busca pela compreensão molecular da DHGNA tem cada vez mais ganhado protagonismo na área, uma vez que a elucidação completa de seus mecanismos pode apoiar no desenvolvimento de terapias e/ou medicamentos específicos para o tratamento desta doença. Com isso, a junção de esforços sustentáveis pode contribuir para a descoberta de candidatos biomarcadores no diagnóstico e/ou prognóstico da DHGNA, assim como seu tratamento. Recentemente, a análise proteômica tem ganhado força e sido considerada uma ferramenta valiosa e aliada para a compreensão molecular de diversas doenças (ZHANG, 2022), e neste contexto, o uso de modelos celulares *in vitro* em co-cultura tem se mostrado eficientes para o estudo do fígado gorduroso, por mostrarem resultados similares aos encontrados em ensaios e análises do metabolismo humano de acúmulo de gordura, já conhecidos desta doença (BARBERO-BECERRA et al., 2015; XIAO et al., 2022; RAMOS et al., 2023 - dados ainda não publicados). No presente estudo, buscou-se validar resultados analisados pela proteômica qualitativa das quatro diferentes condições do modelo celular de co-cultura (Controle, 400 μ M de FA, 40 nM de mimico do miR-1914-5p + 400 μ M de FA e 40 nM Inibidor do miR-1914-5p + 400 μ M de FA) para oferecer uma visão das nuances função hepática a nível de proteína com AG e sua relação com o miR-1914-5p. Este estudo visou compreender a modulação molecular de condições pró-esteatótica na presença e ausência do miRNA, assim como, identificar proteínas chaves que potencialmente regulam ou modulam processos que favorecem o estabelecimento da DHGNA. Além disso, dados proteômicos, assim como a validação destas análises a nível molecular podem fornecer informações úteis para pesquisadores interessados na biologia molecular do fígado em condições de pró-esteatose.

As análises proteômicas apresentaram diferentes classes de proteínas expoentes em cada um dos tipos do modelo celular (Figura 3 A,B). O modelo celular com ácidos graxos (AG) foi responsivo as características de pró-esteatótica visto que proteínas atuantes no metabolismo de lipídios e de AG foram aumentadas, assim como proteínas relacionadas a gliconeogêneses (Figura 3 C, D). Este resultado é esperado, uma vez que o modelo celular foi induzido a esteatose pelo aumento da disponibilidade de AG. A DHGNA pode resultar do desequilíbrio entre o aumento da AG disponíveis e aumento da síntese e captação hepática dos ácidos graxos livres (AGL), que leva ao acúmulo excessivo destas moléculas nos hepatócitos (DONNELLY, 2005; KWANTEN, 2014; BESSONE; RAZORI; ROMA, 2019). Ainda, com relação ao modelo celular, estudos realizados por JOSHI-BARVE et al. (2007) e por GARCÍA-RUIZ et al. (2015), utilizando células HepG2 imortalizada, os autores conseguiram o fenótipo de esteatose crônica benigna, utilizando a junção de dois tipos de ácidos graxos, o ácido palmítico (PA) e ácido esteárico (SA), uma vez que, o uso de um único

AG, já foi relatado como insuficiente para induzir alterações metabólicas em células (PÉREZ-CARRERAS, 2003). Esses resultados reforçam o potencial do uso do nosso modelo celular pró esteatótico, uma vez que, ao utilizarmos a junção de dois AG, levou a perturbação de vias fundamentais para o metabolismo do fígado (PÉREZ-CARRERAS et al., 2003), as quais, quando desequilibradas levam ao desenvolvimento da DHGNA (ADNAN, 2021).

No presente estudo, a presença de altas concentrações do miR-1914-5p nas células sob condições de pró-esteatose, favoreceram o aumento expressivo das proteínas de choque térmico (Figura 3 B), as quais, são fundamentais em situações de perturbação e estresse celular (YUN et al., 2020). Nesta mesma condição, se destacou a expressão da HSP5 (Figura 3 A), membro das proteínas que são reguladas pela glicose (GAWRIEH, 2010) e atua como um sensor de estresse para o retículo endoplasmático (RE) (NI, 2007), o que sugere possível perturbação do RE nesta condição. Em estudos realizados pelos autores KOO et al., 2021 sugeriram que o estresse do RE está clinicamente associado à progressão da DHGNA, por impulsionar a doença para o avanço do tecido adiposo, fase hepática para inflamação ou fibrose. Portanto esses dados sugerem a possibilidade da presença do miR-1914-5p estar impulsionando o avanço de condições pró-esteatóticas em cultura celular (SMITH, 2004; MIOZZO, 2015; MARINOVA, 2011; FRITAH, 2009). Conjuntamente, no processo de metilação do DNA, a presença do miR-1914-5p, conduziu a um aumento na expressão gênica do gene MAT2A (Figura 6 C). A expressão deste gene já foi relatada por levar a diminuição do nível de SAM em células estreladas hepáticas, promovendo assim a ativação dessas células (WANG et al., 2019). Esses dados reforçam a possível atuação do miR-1914-5p na progressão do estado pró-esteatótico, uma vez que o desequilíbrio da metilação global do DNA já foi associado a progressão da DHGNA para a forma mais complexas das condições patológicas do fígado em estudos de metiloma e transcriptoma (SODUM et al., 2021).

Diferentemente, no modelo celular com a molécula inibidora do miR-1914-5p, a inibição apresentou possivelmente atuar no controle e/ou reversão da desorganização celular, colaborando com o estabelecimento da homeostasia nas atividades celulares. Para se chegar a esta análise, alguns pontos foram observados na condição com a inibição do miRNA, que possivelmente podem ter levado a recuperação do equilíbrio da célula, dentre eles o aparecimento de proteína PHB1 e 2 (Figura 3 A), sugerindo presença das atividades mitocôndrias. Ambas as proteínas atuam na membrana interna da mitocôndria formando um grande complexo multimérico, conhecido como o complexo PHB, que protege proteínas recém-importadas das degradações por proteases mitocondriais, além de promover a síntese de proteínas mitocondriais, manter a organização e o número de cópias de DNA mitocondrial (BARBIER-TORRES; LU, 2020). Além disso, não se pode descartar a possibilidade da atuação do miR-1914-5p sobre mRNAs envolvidos no metabolismo do fígado, principalmente

mRNAs pertencentes a via do 1 carbono (Figura 6 F). Essa associação se baseia na presença de possíveis regiões de interação entre o miR-1914-5p e mRNAs das rotas metabólica do 1 carbono observadas anteriormente. Diante do contexto, ao analisar os efeitos fisiológicos e metabólicos na condição com o inibidor do miR-1914-5p, os genes de *MAT1A*, *MTR*, *MTHFD2* e *AHCYL* foram significativamente expressos (Figura 6 C). Em conjunto, a expressão proteica, da proteína AHCYL apresentou redução na condição celular mimica e aumento significativo da expressão após a inibição do miR-1914-5p (Figura 6 E). Esses dados podem sugerir possível regulação desse gene por atuação do miR-1914-5p, uma vez que, em análise ao banco de dados *TargetScan human* 8.0, foram encontrados 2 putativos sítios de ligação do AHCYL com miR1914-5p, o que reforça a hipótese de possível atuação do miRNA sobre este gene. Portanto, a inibição do miRNA pode levar a recuperação eficiente da expressão do AHCYL e suas atividades no metabolismo hepático na via do 1C. Juntamente com esse resultado, houve o aumento significativo da expressão transcricional do gene *MTR* nesta condição (Figura 6 C), o qual capta a homocisteína para sua transformação em metionina, reforçando continuidade na atividade da via do 1C (Figura 6 F). Esses dados corroboram, quando analisado os níveis de metilação global do DNA, assim como o de metilação de histonas H3/K4, que apresentaram similaridades ao controle, juntamente com os níveis de SAM e SAH (Figura 6 B), que não apresentaram alterações, sugerindo estabilidade quanto ao ciclo do 1C e de metilação na condição com o inibidor do miRNA. Curiosamente, a produção de GSH foi inibida ou consumida exageradamente nesta condição (Figura 6 D). O GSH é considerado o mais importante tampão redox celular e o principal defensor contra o estresse oxidativo (VAIRETTI ET AL., 2021). Está molécula também está associado a via do 1C, uma vez que sua produção acontece na via da transsulfuração, anexa e dependente da homocisteína produzida no ciclo do carbono (Figura 6 F). Entretanto, em nossos estudos foi observado uma redução exacerbada de GSH na condição com inibidor. Os autores VAIRETTI et al., 2021 associam essa resposta à uma rápida ativação do sistema antioxidante para proteger a célula. Além disso, esta molécula muda rapidamente, e possui uma meia vida de 2-3h (LU, 2020). Portanto, é possível que no presente estudo o consumo imediato da molécula GSH foi em resposta ao estresse celular ocasionado pelo AG, assim como a inibição do miRNA pode ter facilitado a utilização desta molécula para auxiliar no equilíbrio redox da célula. Embora as hipóteses citadas necessitem de maiores esclarecimentos, os resultados em conjunto observados, sugerem tentativa recuperação da homeostasia do metabolismo hepático após a inibição do miR-1914-5p em células em condições de pró-esteatose. E análises futuras e mais detalhada de todas as etapas, juntamente com modelos translacionais poderão comprovar tais observações.

5. Conclusão

Em conclusão, os ácidos graxos adicionados no tratamento celular induziram ao perfil pró-estatótico no modelo celular por perturbação nas vias do metabolismo energético e síntese de lipídios. A condição com mimico do miR-1914-5p apresentou aumentar a perturbação do equilíbrio celular por favorecer o aumento de proteínas de choque térmico e HSP5, uma proteína sinalizadora de estresse do retículo endoplasmático. Ainda na condição com a molécula mimética do miRNA, observou-se indício de progressão da DHGNA por possível diminuição do gene *MAT1A*, associado ao aumento de *MAT2A* e *MAT2B*, os quais são expressos em condições patológica no fígado.

Contrariamente, na condição com o inibidor do miR-1914-5p, foi observada atenuação nos processos pró-esteatótico por modelar mecanismos chaves como o ciclo do 1 carbono. Nesta condição foi observado aumento dos níveis transcricionais de genes pertencentes a via do 1C, tais como *MAT1A*, *MTR*, *MTHFD2* e principalmente o *AHCYL*, que se observou significativamente expresso de forma transcricional quanto proteico, o qual é essencial para a ativação da via da transsulfuração. Esses resultados corroboram, uma vez que na condição inibidora houve consumo exacerbado de GSH, que apresentou proporcionar/facilitar o consumo dessa molécula produzida na via da transsulfuração. Em conjunto, a modulação destas vias chaves pela inibição do miR-1914-5p, podem ter contribuído para a recuperação do equilíbrio e homeostasia da célula. Entretanto, estes resultados necessitam de maiores investigação e esclarecimentos para de fato compreender a atuação do miR-1914-5p na via do 1C e transsulfuração.

Referências

- ADNAN, M. L. The Effect of Probiotic Supplementation as Alternative Therapy for NAFLD: A Literature Review. **European Journal of Translational and Clinical Medicine**, v. 4, n. 2, p. 75–85, 2 dez. 2021.
- ANWAR, M.; RASHID, S.; FAROOQ, Z. Epigenetics and Medical Biotechnology. Em: ANWAR, M.; AHMAD RATHER, R.; FAROOQ, Z. (Eds.). **Fundamentals and Advances in Medical Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 209–231.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 26 ago. 2014.
- ARIAS-ALVARADO, A. et al. Measuring acetyl-CoA and acetylated histone turnover in vivo: Effect of a high fat diet. **Analytical Biochemistry**, v. 615, p. 114067, fev. 2021.
- AVILA, M. A. et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 907–914, dez. 2000.
- BARBERO-BECERRA, V. J. et al. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1753–1758, out. 2015.
- BARBIER-TORRES, L.; LU, S. C. Prohibitin 1 in liver injury and cancer. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 5, p. 385–394, mar. 2020.
- BESSONE, F.; RAZORI, M. V.; ROMA, M. G. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 1, p. 99–128, jan. 2019.
- BONACINI, M. et al. Racial differences in prevalence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 763–773, 27 jul. 2021.
- CHENG, C. et al. Natural alkaloid and polyphenol compounds targeting lipid metabolism: Treatment implications in metabolic diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 870, p. 172922, mar. 2020.
- CONDRAT, C. E. et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. **Cells**, v. 9, n. 2, p. 276, 23 jan. 2020.
- DE CONTI, A. et al. Inhibition of the Cell Death Pathway in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)-Related Hepatocarcinogenesis Is Associated with Histone H4 lysine 16 Deacetylation. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 9, p. 1163–1172, 1 set. 2017.
- DE ROOIJ, L. A. et al. The microRNA Lifecycle in Health and Cancer. **Cancers**, v. 14, n. 23, p. 5748, 23 nov. 2022.
- DONGIOVANNI, P. et al. Causal relationship of hepatic fat with liver damage and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver. **Journal of Internal Medicine**, v. 283, n. 4, p. 356–370, abr. 2018.

- DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343–1351, 2 maio 2005.
- DU, D. et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 2, p. 558–580, fev. 2022.
- ESTES, C. et al. Modelling NAFLD disease burden in four Asian regions-2019-2030. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, n. 8, p. 801–811, abr. 2020.
- FRITAH, S. et al. Heat-Shock Factor 1 Controls Genome-wide Acetylation in Heat-shocked Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 23, p. 4976–4984, dez. 2009.
- FROHME, J.; TACKE, F. The socioeconomic aspects of nonalcoholic fatty liver disease: food insecurity as a novel risk factor for steatosis and liver fibrosis. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 9, n. 4, p. 543–545, ago. 2020.
- GARCÍA-RUIZ, I. et al. *In vitro* treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in non-alcoholic steatohepatitis. **Disease Models & Mechanisms**, p. dmm.018234, 1 jan. 2014.
- GAWRIEH, S. et al. Hepatic Gene Networks in Morbidly Obese Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 12, p. 1698–1709, dez. 2010.
- JOSHI-BARVE, S. et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 823–830, set. 2007.
- JUANOLA, O. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5227, 14 maio 2021.
- KALHAN, S. C. et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, v. 60, n. 3, p. 404–413, mar. 2011.
- KOO, J. H.; HAN, C. Y. Signaling Nodes Associated with Endoplasmic Reticulum Stress during NAFLD Progression. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 242, 8 fev. 2021.
- KWAK, H. C. et al. Sulfur amino acid metabolism in Zucker diabetic fatty rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 256–266, ago. 2015.
- KWANTEN, W. J. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: A controversial issue. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7325, 2014.
- LECORGUILLÉ, M. et al. Association between dietary patterns reflecting one-carbon metabolism nutrients intake before pregnancy and placental DNA methylation. **Epigenetics**, v. 17, n. 7, p. 715–730, 3 jul. 2022.
- LEE, J. et al. 3,4-dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, suppresses the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice by inhibiting p300 histone acetyltransferase activity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 9, p. 1449–1460, set. 2021.

- LEE, J.-I. et al. HepG2/C3A cells respond to cysteine deprivation by induction of the amino acid deprivation/integrated stress response pathway. **Physiological Genomics**, v. 33, n. 2, p. 218–229, abr. 2008.
- LU, Z. et al. m6A mRNA methylation analysis provides novel insights into heat stress responses in the liver tissue of sheep. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 484–492, jan. 2021.
- MARINOVA, Z. et al. Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7–8, p. 1109–1115, jun. 2011.
- MARTINOV, M. V. et al. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - **Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 1, p. 89–96, jan. 2010.
- MERONI, M. et al. mir-101-3p Downregulation Promotes Fibrogenesis by Facilitating Hepatic Stellate Cell Transdifferentiation During Insulin Resistance. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2597, 29 out. 2019.
- MIOZZO, F.; SABÉRAN-DJONEIDI, D.; MEZGER, V. HSFs, Stress Sensors and Sculptors of Transcription Compartments and Epigenetic Landscapes. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 24, p. 3793–3816, dez. 2015.
- NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules*, v. 12, n. 6, p. 824, 13 jun. 2022.
- NI, J.-Q. et al. Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. **Genes & Development**, v. 20, n. 14, p. 1959–1973, 15 jul. 2006.
- PACANA, T. et al. Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136822, 31 ago. 2015.
- PAOLINI, A. et al. Improving the Diagnostic Potential of Extracellular miRNAs Coupled to Multiomics Data by Exploiting the Power of Artificial Intelligence. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 888414, 9 jun. 2022.
- PASCHOS, P.; PALETAS, K. Non alcoholic fatty liver disease two-hit process: multifactorial character of the second hit. **Hippokratia**, 13 (2) (2009), p. 128
- PÉREZ-CARRERAS, M. et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 999–1007, out. 2003.
- POGRIBNY, I. P. et al. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 669, n. 1–2, p. 56–62, out. 2009.
- POOYA, S. et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 344–351, ago. 2012.

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

SHANKAR, S.; KUMAR, D.; SRIVASTAVA, R. K. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: Implications for personalized nutrition. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 1–17, abr. 2013.

SHEN, L. et al. Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage. **Journal of Proteomics**, v. 123, p. 101–113, jun. 2015.

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

SMITH, S. T. et al. Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 162–167, fev. 2004.

SODUM, N. et al. Epigenetics in NAFLD/NASH: Targets and therapy. **Pharmacological Research**, v. 167, p. 105484, maio 2021.

SUKUR, G.; UYSAL, F.; CINAR, O. High-fat diet induced obesity alters Dnmt1 and Dnmt3a levels and global DNA methylation in mouse ovary and testis. **Histochemistry and Cell Biology**, 9 jan. 2023.

SUNNY, N. E.; BRIL, F.; CUSI, K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 4, p. 250–260, abr. 2017.

SUZUKI, K. et al. Clinical Implication of Plasma Hydrogen Sulfide Levels in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. **Internal Medicine**, v. 56, n. 1, p. 17–21, 2017.

TALENS, M. et al. What Do We Know about Inequalities in NAFLD Distribution and Outcomes? A Scoping Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, p. 5019, 28 out. 2021.

VAIRETTI, M. et al. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 364, 28 fev. 2021.

WANG, H.; WU, Y.; TANG, W. Methionine cycle in nonalcoholic fatty liver disease and its potential applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 200, p. 115033, jun. 2022.

WANG, H.; WU, Y.; TANG, W. Methionine cycle in nonalcoholic fatty liver disease and its potential applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 200, p. 115033, jun. 2022.

WANG, K. et al. TGF- β 1/P65/MAT2A Pathway Regulates Liver Fibrogenesis via Intracellular SAM. **SSRN Electronic Journal**, 2019.

WERGE, M. P. et al. The Role of the Transsulfuration Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1081, 5 mar. 2021.

WONG, R. J. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. **Gastroenterology**, v. 148, n. 3, p. 547–555, mar. 2015.

WU, D.-D. et al. Hydrogen Sulfide as a Novel Regulatory Factor in Liver Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 20 jan. 2019.

WU, D.-D. et al. Hydrogen Sulfide as a Novel Regulatory Factor in Liver Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–16, 20 jan. 2019.

XIAO, J. et al. Development of an in vitro insulin resistance dissociated model of hepatic steatosis by co-culture system. **BioScience Trends**, v. 16, n. 4, p. 257–266, 31 ago. 2022.

XU, L. 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, 1 jan. 2005.

YANG, S. et al. Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 259–268, jun. 2000.

YOUNES, R.; BUGIANESI, E. NASH in Lean Individuals. **Seminars in Liver Disease**, v. 39, n. 01, p. 086–095, fev. 2019.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. **Gut**, v. 69, n. 3, p. 564–568, mar. 2020.

YOUNOSSI, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 3, p. 531–544, mar. 2019.

YU, C.; CHEN, J.; REN, J. Advances of microRNAs in regulating mitochondrial function: new potential application in NAFLD treatment. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 10, p. 9841–9853, out. 2022.

YU, J. et al. Modification of N6-methyladenosine RNA methylation on heat shock protein expression. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198604, 14 jun. 2018.

YUN, C. W. et al. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 60, 24 dez. 2019.

YUN, K. U. et al. Plasma homocysteine level and hepatic sulfur amino acid metabolism in mice fed a high-fat diet. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 127–134, fev. 2013.

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

ZHANG, Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Liver Tissues and Serum in db/db Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9687, 26 ago. 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

ANEXO

A seguir é apresentado um artigo realizado em paralelo estudos paralelos realizados durante o desenvolvimento desse trabalho de doutoramento, os quais possibilitaram a construção do artigo apresentado a seguir. Este artigo, também está associado a estudos de mecanismos pro-pesteatóticos que subsidiam o estabelecimento da DHGNA, entretanto o viés do desenvolvimento desta condição são os agrotóxicos. Uma vez que as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas são ocasionadas por desequilíbrio metabólico no fígado que levam ao acúmulo exagerado de gordura nos hepatócitos, esta condição também pode ser desencadeada pelos agrotóxicos, os quais são nocivos à saúde. Os agrotóxicos são encontrados principalmente nos alimentos e meio ambiente, o que torna este agente um fator preocupante, uma vez que a alta demanda populacional tem cada vez mais acelerado a produtividade e neste contexto levado ao aumento dos agrotóxicos na agricultura. Contudo, é possível que futuramente o aumento dos casos de DHGNA no mundo alcance proporções além do estipulado pelos estudos estatísticos. Portanto, o artigo a seguir, teve como objetivo investigar os efeitos do fitossanitário Fipronil em células HepG2, a fim detalhar os efeitos do produto químico no metabolismo lipídico e abordar possíveis opções terapêuticas para o tratamento induzido por pesticidas.

Para este estudo, foi utilizada cultura de célula HepG2 e adição do fitossanitário Fipronil em 3 diferentes concentrações. Estas condições celulares foram submetidas a ensaios bioquímicos de mensuração do nível de triglicerídeos e glicose, assim como, foi utilizado a metodologia de microscopia de fluorescência para complementar a análise de quantificação de triglicerídeo acumulado na célula. Ainda, com o método de microscopia de fluorescência, foi analisada a atividade de β -oxidação das células. Para complementar todas essas análises, a quantificação da transcrição gênica dos genes chaves dos processos metabólicos citados, também foram analisados.

Neste trabalho foi observado que o fitossanitário Fipronil se despontou como perturbador da homeostasia da célula e promotor do acúmulo de lipídios por alterações moleculares nas vias lipídicas e lipogênese *de novo*. Esse resultado sugere o favorecimento do desenvolvimento de DHGNA pelos efeitos do fitossanitário e os detalhes do desenvolvimento deste trabalho encontra-se no artigo que está a seguir anexado e que foi submetido para a revista: *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*.



Cellular and molecular effects of fipronil in lipid metabolism of HepG2: a dark side of persistent insecticide use and its possible connection to NAFLD

Journal:	<i>Journal of Biochemical and Molecular Toxicology</i>
Manuscript ID	JBT-23-172
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	10-Feb-2023
Complete List of Authors:	Pansa, Camila; UNESP, Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular Molica, Letícia; UNESP, DBGA de Oliveira Júnior, Fabiano; UNESP, Pós Graduação em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia Santello, Lara; UNESP, Pós Graduação em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia Moraes, Karen; UNESP, IB - Biologia
Keywords:	cell culture, lipid metabolism, NAFLD, pesticide, detoxification processes

SCHOLARONE™
Manuscripts

Cellular and molecular effects of fipronil in lipid metabolism of HepG2: a dark side of persistent insecticide use and its possible connection to NAFLD

Camila Cristiane Pansa¹, Letícia Ramos Molica¹, Fabiano Cláudio de Oliveira Júnior¹, Lara Cavallari Santello², Karen C. M. Moraes^{1*}

¹ Laboratório Sinalização Celular e Expressão Gênica, DBGA, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

² Laboratório de Microbiologia Ambiental, DBGA, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil

Corresponding author:

*Karen C.M. Moraes

Laboratório Sinalização Celular e Expressão Gênica, DBGA, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, SP, Brazil.

Zip Code 13506-900, Rio Claro, SP - Brazil

E-mail: kcm.moraes@unesp.br / Tel.: +55-19-3526-4144/ Fax: +55-19-3526-4136

Keywords: cell culture; lipid metabolism; NAFLD; pesticide; detoxification processes.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a global public health problem that affects more than a quarter of the population. The development of this disease is correlated with metabolic dysfunctions that lead to lipid accumulation in the liver. Pesticides are one of etiologies that supports NAFLD establishment. Therefore, the effects of the insecticide fipronil on the lipid metabolism of the human hepatic cell line, HepG2 was investigated, considering its widespread use in field crops and even to control domestic pests. To address the goals of the study, biochemical, cellular, and molecular analyzes of different concentrations of fipronil in cell cultures were investigated, after 24 h of incubation. Relevant metabolites such as triglycerides and glucose levels, β -oxidation processes, and gene expression of relevant elements correlated with lipid and metabolism of xenobiotics were investigated. The results suggested that at 20 μ M, the pesticide increased the accumulation of triglycerides and neutral lipids by reducing fatty acid oxidation and increasing *de novo* lipogenesis. In addition, changes were observed in genes that controls the oxidative stress and the xenobiotic metabolism. Together, the results suggest that the metabolic changes caused by the insecticide fipronil may be deleterious if persistent, favoring the establishment of hepatic steatosis.

1 Introduction

In the last fifty years, modern societies have changed their lifestyle, which increased environmental pollution [1,2]. After the 1960's, investments in agriculture contribute to the total amount of food produced around the world. This period was called the Green Revolution, which was supported by the development of new technologies, including the development and large-scale use of fertilizers and pesticides [3]. Especially

1
2
3 in underdeveloped countries where economies are more likely to depend on agriculture
4 products the use of pesticides and other chemicals has been facilitated [4]. However,
5
6 several studies consider the deleterious effects of the compounds on humans and
7
8 animal' health [5,6,7], correlating their use with metabolic diseases such as non-
9
10 alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [8].
11
12
13

14
15 NAFLD is considered a pandemic problem, which affects different countries and
16
17 populations [9]. This pathological condition is defined as the occurrence of excessive fat
18
19 accumulation in the liver, corresponding to levels greater than 5% of organ weight. This
20
21 liver pathology has many different etiologies, including genetic background, poor diet,
22
23 obesity, diabetes, and virused [10-13]. In addition, over the last few decades,
24
25 environmental pollutants have been considered a deleterious agent in NAFLD
26
27 establishment [8,14]. In general, the establishment of NAFLD is due to metabolic
28
29 changes in hepatic tissues, disrupting lipid metabolism and inducing lipotoxicity [15],
30
31 which exacerbates the production of reactive oxygen species (ROS) due to
32
33 mitochondrial dysfunction [16,17]. If persistent, the physiological changes in liver
34
35 homeostasis may progress to more deleterious stage activating inflammatory processes
36
37 that could end in non-alcoholic fatty steatohepatitis (NASH), fibrosis, and even in
38
39 hepatocarcinoma (HCC) in a percentage of patients [13,18,19,20].
40
41
42
43

44
45 Pesticides can be considered a NAFLD agent because these chemicals act on
46
47 different metabolic routes of both target and in non-target species [14]. Fipronil is a large-
48
49 scale pesticide used to control pests in various crop fields [21]. In addition, this chemical
50
51 has been used to control veterinary pests in cattle and even in domestic animals [22,23].
52
53 Fipronil is an insecticide that blocks GABA receptors changing neural signaling in target
54
55 organisms (24), leading to their death. In addition, studies have demonstrated the toxic
56
57 effects of fipronil in non-target animals, and, especially in humans, the pesticide
58
59
60

1
2
3 demonstrate toxicity to the liver, inducing the accumulation of lipids and ROS in the
4 organ [24,25-27]. Other studies pointed to the accumulation of the pesticide in the
5 environment and on food, indicating the use of fipronil as a major concern for public
6 health and to the environment [28-30]. Based on such observations, the present study
7 aims to describe cellular and molecular mechanisms in the human hepatocyte cell line,
8 HepG2, which is very responsive to exogenous stimuli, to elucidate details about the
9 effects of the chemical on lipid metabolism and to address possible therapeutic options
10 to treat pesticides induced. NAFLD-pathologies.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **2 Materials and methods**

24 **2.1 Cell culture**

25
26
27
28 HepG2 hepatocyte carcinoma cells (American Type Culture Collection, ATCC®:
29 HB-8065™) were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
30 supplemented with 4 mM of L-glutamine, 1 % de Antibiotic-Antimycotic solution and 10%
31 of fetal bovine serum (FBS) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. All reagents were
32 purchased from Thermo Fisher Scientific, USA.
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **2.2 Cytotoxicity assays**

43
44 The cytotoxicity analyses were performed adapting the protocol described in
45 Mosman [31]. For that, 8 x 10³ cells were seeded in 96-well plates. After 24 h incubation,
46 fipronil (Merck) was added or not at different concentrations (0.2; 2, e 20 µM) to the
47 cultures, followed by a subsequent incubation of 24 h under regular culture condition.
48
49 Next, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Merck) was added to each well at 0.5
50 µg/ mL and cells were incubated at 37 °C overnight. Next, the assembled formazan
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

crystals were dissolved using DMSO. The results were evaluated in microplate reader (Biochrom EZ Read 400) at absorbance of 570 nm.

2.3 Biochemical measurements: triglycerides and glucose analyses

For these analyses, 2.2×10^5 cells were cultivated in 6-well plates for 24 h and incubated with the pesticide as described in 2.2. Next cells were collected from the independent wells, and triglyceride (TG) and glucose were measured using commercial chemical reagents (Triglicérides e Glucose Liquiform, LabTest), according to the supplier's instruction at 505 nm and 595 nm. Protein measurements were processed according to the Bradford at 595 nm [32]. All analyses were processed in a spectrophotometer Thermo Biomate 3 UV-Vis and the results were plotted in graphs in a comparative ratio to the protein amount.

2.4 Microscopy analyses for neutral lipid droplets staining

Fluorescence microscopy to analyze neutral lipids were performed according to basic protocol from our laboratory. For that, 3×10^4 cells were seeded in 24-well plates containing circular-coverslips and treated as described (2.2). Next, cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde solution containing 0.05% of Triton X-100 for 5 minutes at room temperature (RT) and, subsequently, incubated in 1% bovine serum albumin (BSA, Merck) solution for 2 hours at RT. For the neutral lipid droplets labelling, fixed cells were incubated with Nile Red solution at 100 µg/ mL for 2 hours at RT. Cells were counterstained with 3.33 ng/ mL of 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Merck) for 3 minutes at RT, followed by consecutive washes in phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). The coverslips containing cells were mounted onto slides and subjected to microscopic

analyses. The images were obtained with a BX51 OLYMPUS microscope equipped with an HBO 100 W mercury lamp, the corresponding filter sets, and DP71 digital photographic system. One hundred randomly selected cells were analyzed in each independent treatment group using the software Image-J (<http://rsbweb.nih.gov>)

2.5 Fluorescent pulse-chase for fatty acids oxidative analyses

Fluorescent microscopy analyses for fatty acid tracking inside the cells were performed according Rambold et al. [33] and Silva et al. [34] For the assays, 3×10^4 cells were cultivated on circular coverslips in 24-well plates, and cells were treated as previously described (2.2). To the culture medium containing or not fipronil, $1 \mu\text{M}$ of BODIPYTM 558/568 C₁₂ (Bodipy-C₁₂) (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (Thermo Fisher Scientific) was added to different groups of cells. Next, they were cultivated for 16 hours, under regular conditions. After this period, the medium containing the Bodipy-C₁₂ was replaced by a fresh medium without C₁₂ followed by an additional one-hour cellular incubation. Next cells were fixed using paraformaldehyde solution, or they were incubated for additional 8 hours in the presence or not of fipronil to access the effect of such compounds on the LDs and cell metabolism, prior their fixation. The control assays were performed incubating the cells with $25 \mu\text{M}$ of Etomoxir (2[6(4-38 chlorophenoxy) hexyl] oxirane-2-carboxylate) (Merck).

In addition of BODIPYTM 558/568 C₁₂ was tracking after cellular uptake, storage in LDs and its oxidation. It was performed through the LD labeling with 200 ng /mL of BODIPYTM 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) (Thermo Fisher Scientific) for 20 minutes, followed by consecutive washes in PBS. Cell nuclei were stained with DAPI following the protocol described in Da Silva et al. (34). The images were taken as previously described (2.4) and quantified using

the Image-J software (<http://rsbweb.nih.gov>) with the "JACoP" plug-in [35] to obtain a Pearson's coefficient between Bodipy-C₁₂ overlap and lipid droplets.

2.6 RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was obtained from independent cellular groups using TRIZOL[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific) and they were reversed transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Next, qPCR reactions were performed using SYBR Green/Rox qPCR Master MIX reagents (Thermo Fisher Scientific, USA) and an A&B cyclor - StepOnePlus[™] machine. The expression of the *β-actin* gene was set as the reference gene and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was applied to calculate the relative quantification. The oligonucleotides were designed using the Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) algorithm and sequences are presented in Supplementary Material - Table 1.

2.7 Graphs and statistical analyses

Values from at least three independent assays were used for analysis, and graphs were generated using Graph Pad Prism[®] 5. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation and the differences between the control and treated groups were measured using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's or Tuckey tests. Significance was set at **** $p < 0,0001$

3 Results

3.1 Effects of fipronil olackn HepG2 lipid metabolism

To investigate molecular details of the effects of fipronil on lipid metabolism, the HepG2 hepatocyte cell line was chosen due to its intense metabolic characteristic [36,37]. Cellular viability analyses for the investigated concentrations did not present toxic effects in 24 h - incubation period (results not presented). However, the results demonstrated that the pesticide induced lipid accumulation in cells incubated at 20 μ M (accepted daily intake by the Brazilian Regulatory Agency), observed in microscopy analyses (Nile red staining of neutral lipids, Figure 1A) and in biochemical studies of TG (Figure 1B), when compared to the results found in the group of cells considered as experimental control. The analyses for the 0.2 μ M and 2 μ M did not present relevant changes in lipid accumulation, when compared to the controlling assays. Moreover, to understand the molecular network that supports the observed relevant changes in cellular physiology, the expression level of *CD36* was measured. This molecule synthesizes a transmembrane receptor of fatty acids that is involved in this organic molecule translocation in the cells. Figure 1 C illustrates the increased expression of mRNA level at 20 μ M fipronil cellular incubation (~40% increase in mRNA level expression), compared to the control.

3.2 Molecular connector of lipid metabolism in fipronil-induced HepG2 cells

To address the relevant changes induced by fipronil in cellular lipid metabolism, the transcriptional levels of the relevant enzymes in this metabolic process were evaluated (Figure 2A). Fatty acid synthase (FASN) is an important enzyme in the *de novo* lipogenesis pathway [38]. In the presented study, FASN transcriptional levels increased ~160% in cultures incubated with 20 μ M of pesticide, compared to the expression level found in control cultures. At the same pesticide concentration, cells increased malonyl-CoA decarboxylase (MLYCD) levels by – 38%, compared to the

control, which reverts malonyl-CoA to acetyl-CoA, collaborating with lipid biosynthesis (Figure 2B). To better understand this metabolic route, the levels of acetyl-CoA carboxylases (ACC) transcripts were measured. ACC1, metabolizes acetyl-CoA to the cytosolic malonyl-CoA, and in our assays, all the investigated samples presented lower expression levels of the gene, compared to the control culture. On the other hand, ACC2 enzyme is localized in the external mitochondrial membrane, and synthesizes malonyl-CoA, which blocks carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) activity, inhibiting the fatty acid (FA) oxidation [38]. In addition, the 20 μ M induced an expressive increase in the ACC2 transcripts (~ 72% %, when compared to the results found in the control level), suggesting effective changes in cellular β -oxidation, induced by high pesticides level.

Next, to describe the fine-tuning mechanisms in cellular metabolism due to the effects of the pesticide, the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) genes were investigated. The analyses demonstrated that the pesticide modulates the *PPAR γ* and *PPAR α* expression in a dose-dependent manner. Transcriptional level of *PPAR γ* increased ~371% when cells were incubated with 2 μ M of fipronil, compared to the levels found in the control groups. At the same pesticide concentration, transcriptional levels of *PPAR α* reduced ~47%, and statistically increased 22.8% in group of cells incubated with 20 μ M of the pesticide, reinforcing the suggestion that the toxic compound disrupts lipid metabolism.

3.3 Effects of fipronil on β -oxidation and glucose metabolism in HepG2 cells

The effects of fipronil on β -oxidation of fatty acid (FA) in HepG2 cells, were investigated using microscopy analyses of pulse-chase method to track BODIPY-C12 (33,34). The analyses investigated cellular capacity to maintain C-12 in lipid droplets inside the cells, in different cultures during the investigated time. The cells exposed to

the concentration of 25 μM of etomoxir was set as the experimental control of the assay. Etomoxir blocks the process of β -oxidation by inhibiting CPT-1 activity [39]. The images were analyzed with the Slidebook Imaging Software (3i) and ImageJ (National Institutes of Health) to calculate Pearson's coefficients. The results presented in Figure 3A were processed using the images at 1 h and 8 h time-points after removal of C12 from the culture media. The overlapped images revealed the pattern of the lipid droplets and β -oxidation quantification. Thus, considering different concentrations of pesticides used in HepG2 cultures, the intracellular neutral lipid accumulation in droplets was stronger in cells incubated with 20 μM of fipronil, after 24 h time point. The increased rates of Pearson's coefficients at this pesticide concentration suggested the blockage of the β -oxidation metabolism [40].

To better understanding molecular aspects of the lipid oxidation, gene expression analyses of CPT1 and CPT2 molecules were investigated (Figure 3B). The results demonstrated a reduction in gene expression in cells incubated with fipronil and an expressive decrease of $\sim 85\%$ and 37% , respectively, in the transcript levels of cells incubated with 20 μM of pesticide, compared to the results found in the control group of cells. On the other, incubation with 20 μM final concentration of the pesticide extremely increased glucose levels in cells (Figure 3C). The results suggested the existence of an intricate cellular metabolism to supply energy to the cells to keep them alive [41].

3.4 Effects of fipronil on metabolic routes of oxidative stress and detoxification processes

Considering the effect of pesticides on lipid metabolism and in the disruption of β -oxidation, gene expression of relevant molecules in oxidative stress pathway was measured. Figure 4A presents the results of the analyses for superoxide dismutase 1

(SOD1), catalase 1 (CAT1), glutathione peroxidase 1 (GPX1), and glutathione-disulfide reductase (GSR). The analyses demonstrated that fipronil caused significant increase in gene expression of GPx (~5x) and GSR (~3x), compared to the transcriptional level found in control group of cells. Those results suggest activation of detoxification mechanisms in fipronil-treated group of cells, which avoid cellular death under the investigated conditions, as observed in viability assays (3.1). Those molecules work in a synchronized manner, controlling the toxic effects in the cell and collaborating with the maintenance of cellular homeostasis [42,43].

To add more details to the analyses, transcriptional levels of xenobiotic genes were investigated (Figure 4B). Among them, the molecule cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1 (*CYP2E1*); aryl hydrocarbon receptor (AHR), which helps control CYP family members; constitutive androstane receptor (CAR); and estrogen receptor (ER) were selected considering their relevant effects in the xenobiotics metabolism [44-46]. *CYP2E1* is often highly expressed in hepatocytes to metabolize drugs and xenobiotics; however, its excessive production can increase ROS production [47,48]. The results demonstrated an elevated expression of *CYP2E1* at 0.2 μ M, and a ~90% reduction in expression at 2 and 20 μ M of pesticide, compared to the control culture. The same pattern of gene expression was observed for the AHR (a gene that produces a protein that regulates xenobiotic-metabolizing enzymes and works as a transcriptional factor for genes correlated with several metabolic routes even lipid metabolism) [49,50] and *CAR* gene (molecule that processes toxic molecules in the organism and also collaborates in glucose and lipid metabolism) [49]. The *AHR* and *CAR* genes presented significant increases in their expression at 0.2 μ M fipronil concentration and a reduction of ~5% in cells incubated with 2 and 20 μ M of the pesticide, when compared to the control. Contrary to the previously results for the ER gene, all the investigated fipronil-

effect condition demonstrated greater than 80% reduction in transcripts, when compared to the results observed in the control culture. Combined, the results suggest an attempt to survive, due to the pesticide toxicity.

4 Discussion

The liver acts to maintain metabolic homeostasis in the body by coordinating lipid and glycolytic metabolism [51] and working to detoxify xenobiotics and endobiotics (52). Changes in the hepatic equilibrium may cause metabolic imbalances, which conducts the organ accumulation of lipids, and if persistent, can lead to steatosis, which is currently considered a public health issue [53,54].

Environmental contaminants, including pesticides, are considered agents of hepatic metabolic disorders [54-56]. Previous studies point to this direct correlation between pesticide use and steatosis [27,57-59]; however, mechanistic analyses of the effects of those chemical in liver health still need to be better investigated. Therefore, the present study investigated the effects of the insecticide fipronil on HepG2 liver cells, to better detail cellular and molecular mechanisms that support the development of steatosis in individuals considering the real concern of food contamination with this pesticide.

Basically, the imbalance between lipid synthesis and consumption causes their intracellular accumulation [60]. Thus, different concentrations of fipronil were investigated to evaluate the process, and those that did not alter cell viability were selected for subsequent analysis. In the present study, fipronil concentrations of 0.2 μ M, 2 μ M and 20 μ M were used in HepG2 cultures. At a concentration of 20 μ M, the insecticide induced the packing of a high number of lipid droplets and expressive increases in TG levels in cells, compared to the experimental control. In addition, gene

expression analyzes under the same concentration of 20 μ M of fipronil showed significant increases in the CD36 membrane protein (Figure 1), which suggests an increase in the uptake of exogenous lipids in the cell [61]. Previous studies with mice submitted to a high-fat diet found a direct correlation between the development of hepatic steatosis and increased expression of the protein and transcriptional levels of *CD36*, while the knockout of this gene resulted in a decrease in hepatic lipid levels [62]. Moreover, in the present study, at a concentration of 20 μ M of fipronil, significant increases were also observed in the levels of genes correlated with lipid synthesis and metabolism pathways, strongly suggesting an imbalance in lipid metabolism and a decompensated de novo lipogenesis (Figure 2) [63-65]. In addition, the combined result suggests a cellular machinery that attempts to control intracellular lipid levels. The malonyl-CoA produced by *ACC1* serves as a substrate for the synthesis of FA; thus, the increase in the transcriptional levels of the decarboxylase *MLYCD* suggests an attempt to control lipid levels. At the same time, increased levels of *ACC2*, which stimulates malonyl-CoA synthesis, suggest the blockage of the FA oxidation process, corroborated by pulse-chase analyzes (Figure 3A). Furthermore, the reduction in *CPT1* expression levels reinforces the decrease in oxidative metabolism (Figure 3B). Inhibition and/or reduction of *CPT1* levels is a limiting aspect in the rate of transport of fatty acids to mitochondria and the decrease in the β -oxidation of FAs [38,66], which facilitates the accumulation of intracellular lipids. In addition, to better describe the fine-tuning of the effects of the fipronil on the hepatocyte, *PPAR* genes were evaluated, considering their relevant function in lipid metabolism [67,68]. Increased *PPAR α* level at 20 μ M of fipronil reinforces the imbalance of oxidative processes and homeostasis disruption [69]. On the other hand, the reduction in *PPAR γ* levels in cells incubated with 20 μ M of the pesticide suggests a cellular attempt to control the accumulation of lipids [70,71].

1
2
3 Considering the problematic large-scale use of pesticides and their correlation with
4
5 NAFLD, previous studies using animal models demonstrated the adverse effect of the
6
7 pesticide on FA metabolism. Bhatia and Venkitasubramanian observed an increase in
8
9 the accumulation of FA in mice exposed to dieldrin [72]. Liu et al. demonstrated changes
10
11 in HepG2 lipid metabolism when cells were exposed to β -hexachlorocyclohexane [73].
12
13 In addition, other studies described the effect of pesticides on disruption of lipid
14
15 metabolism in hepatocytes, such as cis-bifenthrin [74], permethrin [75], myclobutanil
16
17 [55], mancozeb [76] and 1,3-dichloro-2-propanol [77]. Combined those studies reinforce
18
19 the deleterious potential of those chemical compounds in the development of hepatic
20
21 liver disease including NAFLD, as we observed in fipronil-induced cells.
22
23
24

25
26 In addition, our results demonstrated that HepG2 cells incubated with 20 μ M of the
27
28 pesticide induce significant increase in glucose levels, when compared to all treatments,
29
30 including the control (Figure 3C). This result, once again, suggests the breakdown of
31
32 cellular metabolism homeostasis in metabolism, as observed in metabolic and pro-
33
34 steatotic syndromes [78,79]. Changes in biochemical parameters are classic indicators
35
36 of liver disorders [80,81].
37
38

39
40 Next, to evaluate the mechanisms by which liver cells maintained their viability,
41
42 under the investigated conditions, gene expressions of relevant molecules correlated to
43
44 the oxidative stress processes and metabolism of xenobiotics were investigated.
45
46 Considering the deleterious effects of pesticides, previous studies evaluated the
47
48 production of ROS in liver cells [82,83]. Enzymes correlated to those metabolic routes
49
50 are essential for detoxification of free radicals and reactive species in cells [84], which
51
52 control apoptotic processes. In our studies, we observed that *SOD* and *CAT* levels did
53
54 not show significant changes, compared to the control, while the expression levels of
55
56 the antioxidant molecules *GPx* and *GSR* increased significantly in cultures incubated
57
58
59
60

with fipronil (Figure 4). The results suggested a possible attempt by cells to control the redox potential to survive [84]. To reinforce those analyzes, the transcriptional levels of molecules that correlate with xenobiotic metabolism were evaluated. The results demonstrated high expression levels of *CYP2E1*, *AHR*, and *CAR* in cultures incubated with the lowest concentration of fipronil (0.2 μ M). While at higher concentrations (2 and 20 μ M), the expression of these genes was significantly reduced compared to the control. Combined, the results reinforced the strong metabolic effect of the pesticide on HepG2 cells. The considerable reduction in *CYP2E1*, *AHR*, and *CAR* expression may correlate with controlling cellular detoxification mechanisms, because once exaggerated they may lead to cell death. In the same direction, transcriptomic studies in HepaRG cells after the combined use of the two pesticides, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and endosulfan, showed a drastic reduction in the expression of several genes, including alcohol dehydrogenases and *CYP2E1* [85]. The molecular mechanisms involved in inhibition of transcriptional levels are not yet known; however, studies by Attignon et al. [86] observed that TCDD treatment decreases the mRNA and protein levels of several alcohol dehydrogenases through *AHR*. This gene, along with *CAR*, is the main sensor and activator of the xenobiont pathway. In our assays, these genes were significantly reduced in the highest concentrations of fipronil, suggesting their metabolic function in controlling cell survival. It should be noted that the *AHR* and *CAR* genes act on routes that control lipid metabolism [84,87,88] and their reduced levels at higher concentrations of fipronil under analyses probably contribute to the breakdown of lipid homeostasis, as presented in this study.

The *ER* gene is also a classic marker of xenobiont metabolism [89], whose levels were extremely reduced in the presence of the pesticide, suggesting the participation of this molecule in different metabolic routes. Reinforcing these observations, Qiu et al.

[90] demonstrated that metabolic syndrome presents disruptions in the functionality of estrogen receptors. Thus, the low expression of ER in our analyzes may also reinforce the metabolic changes that lead to the increase in intracellular levels of lipids.

It is worth reinforcing that the analyses performed in this study correspond to a short interval of 24 h-analyses, and the results demonstrated negative effects of the pesticide on cellular energetic metabolism to guarantee the survival of cells. However, we can infer if the pesticide exposure continues, it may result in damage to liver cells, resulting in pro-steatotic conditions. This may be a suggestive bias for future investigations and further studies about the effects of the large-scale use of the pesticide fipronil in crops in different countries.

6 Conclusion

In this study, the pesticide fipronil at 0.2, 2 and 20 μM did not reduce HepG2 cellular viability in the 24-h interval. However, the pesticide caused the breakdown of homeostasis, resulting in metabolic changes and lipid accumulation, by *de novo* lipogenesis, absorption of lipids from the extracellular environment and reduction of the oxidative processes of FAs. The results suggest a synchronized metabolic dysfunction, which can be harmful to an organism if persistent, and favor the establishment of NAFLD conditions.

Acknowledgments

We thank MAMM for StepOne™ Real-Time PCR System machine and CAPES and CNPq scholarships (PIBIC, UNESP 2020, 2021, 2022; PIBIT 2017).

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2018/05286-3; 2022/06302-8).

Conflict of Interest: The authors affirm that they have no conflict of interest.

Figure Captions

Figure 1. Effects of the insecticide fipronil on neutral lipids accumulation in HepG2 hepatocyte. A) Representative microscopic analyses. Cells were incubated or not with different concentrations of the pesticide for 24 hours and images were taken on an Olympus BX51 microscope. The labelling of lipid droplets was processed Nile red staining and nuclei with DAPI. B) Biochemical analyses of triglycerides and C) gene expression analyses of CD 36. Graphs represents the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments and the statistics was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's analyses between the investigated groups. The significance level was set at $p < 0.05$ (*).

Figure 2. Modulatory effect of fipronil in gene expression of lipid metabolism in HepG2 cell line. A) The figure presents the transcriptional level of relevant molecules in lipid metabolism pathway and their heat map. B) Schematic representation of lipid metabolic route in a hepatocyte. Graphs represents the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments and the statistics was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's analyses between the investigated groups. The significance level was set at $p < 0.05$ (*).

Figure 3. Fipronil effects on lipid absorption and oxidation in hepatic cells HepG2. A) β -oxidation analyses using fluorescent FA pulse-chase technique. The images present the overlap between the lipid droplets (BODIPY™ 493/503), the BODIPY 558/568 C₁₂ and the nucleus staining. The quantification presented in the graph represents the Person's coefficient. B) Transcriptional analyses of CPT-1, CPT-2. C) Glucose measurements. The graphs represent the mean and standard deviation, and the significance level was set at $p < 0.05$ (*). Ns = no significance.

Figure 4 Effector elements in HepG2 metabolic routes of oxidative stress and detoxification processes. A) Transcriptional levels of SOD1, CAT, GPx and GSR. B) Analyses of mRNA levels of xenobiotics metabolizing enzymes (CYP2E1, AHR, CAR and ER). Graphs represents the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments and the statistics was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test, between the quiesced-like cells (control) and the other investigated groups. The significance level was set at $p < 0.05$ (*).

References

1. De Carvalho RM, Szlafsztein CF. Urban vegetation loss and ecosystem services: the influence on climate regulation and noise and air pollution. *Environ Pollut.* **2019**; 245:844-852.
2. Liang L, Wang Z, Li J. The effect of urbanization on environmental pollution in rapidly developing urban agglomerations. *Journal of Cleaner Production.* **2019**; 237:117649.
3. Zeigler RS. Plant sciences, public policies and food security. *Outlook Agric.* **2019**; 48(3):220-228.
4. Jacquet I, Wang J, Zhang J, Wang K, Liang S. An understanding of education in

- supporting cotton production: an empirical study in benin, west africa. *Agriculture*. **2022**; 12(6):836.
5. Sun L, Li J, Zuo Z, Chen M, Wang C. Chronic exposure to paclobutrazol causes hepatic steatosis in male rockfish *Sebastiscus marmoratus* and the mechanism involved. *Aquat Toxicol*. **2013**; 126:148-153.
6. Capitão A, Lyssimachou A, Castro LFC, Santos MM. Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective. *Environ Int*. **2017**; 106:153-169.
7. Ravindran S, Noor HM, Salim H. Anticoagulant rodenticide use in oil palm plantations in Southeast Asia and hazard assessment to non-target animals. *Ecotoxicology*. **2022**; 31(6):976-997.
8. Jiang F, Peng Y, Sun Q. Pesticides exposure induced obesity and its associated diseases: recent progress and challenges. *Journal of Future Foods*. **2022**; 2(2):119-124.
9. Lazarus JV, Mark HE, Anstee QM, et al. Advancing the global public health agenda for NAFLD: a consensus statement. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2022**; 19(1):60-78.
10. Boeckmans J, Rombaut M, Demuyser T, et al. Infections at the nexus of metabolic-associated fatty liver disease. *Arch Toxicol*. **2021**; 95(7):2235-2253.
11. Makri E, Goulas A, Polyzos SA. Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and emerging treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Arch Med Res*. **2021**; 52(1):25-37.
12. Eslam M, George J. Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2020**; 17(1):40-52.
13. Nassir F. NAFLD: mechanisms, treatments, and biomarkers. *Biomolecules*. **2022**; 12(6):824.
14. Rajak S, Raza S, Tewari A, Sinha RA. Environmental toxicants and NAFLD: a neglected yet significant relationship. *Dig Dis Sci*. **2022**; 67(8):3497-3507.

15. Wang W, Ren J, Zhou W, et al. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-naflD) and the development of metabolic syndrome: a retrospective study. *Sci Rep*. **2022**; 12(1):10977.
16. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2018**; 15(1):11-20.
17. Wang J, He W, Tsai PJ, et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis*. **2020**; 19(1):72.
18. Branković M, Jovanović I, Dukić M, et al. Lipotoxicity as the leading cause of non-alcoholic steatohepatitis. *IJMS*. **2022**; 23(9):5146.
19. Lee YA, Friedman SL. Inflammatory and fibrotic mechanisms in NAFLD—Implications for new treatment strategies. *J Intern Med*. **2022**; 291(1):11-31.
20. Shah PA, Patil R, Harrison SA. NAFLD-related hepatocellular carcinoma: The growing challenge. *Hepatology*. **2023**; 77 (1):323-338.
21. dos Reis EB, Farnese FS, Oliveira MS, et al. Responses of freshwater planarian *girardia tigrina* to fipronil-based insecticide: survival, behavioral and physiological endpoints. *Diversity*. **2022**; 14(9):698.
22. Gill JPS, Bedi JS, Singh R, et al. Pesticide residues in peri-urban bovine milk from india and risk assessment: a multicenter study. *Sci Rep*. **2020**; 10(1):8054.
23. Bhatt P, Gangola S, Ramola S, et al. Insights into the toxicity and biodegradation of fipronil in contaminated environment. *Microbiol Res*. **2023**; 266:127247.
24. Suzuki T, Hirai A, Khidkhan K, et al. The effects of fipronil on emotional and cognitive behaviors in mammals. *Pestic Biochem Physiol*. **2021**; 175:104847.
25. Das PC, Cao Y, Cherrington N, Hodgson E, Rose RL. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem Biol Interact*. **2006**; 164(3):200-214.

26. Kartheek RM, David M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective. *Toxicol Rep.* **2018**; 5:448-456.
27. Wasef L, Nassar AMK, El-Sayed YS, et al. The potential ameliorative impacts of cerium oxide nanoparticles against fipronil-induced hepatic steatosis. *Sci Rep.* **2021**; 11(1):1310.
28. Hano T, Ito K, Ohkubo N, et al. Occurrence of neonicotinoids and fipronil in estuaries and their potential risks to aquatic invertebrates. *Environ Pollut.* **2019**; 252:205-215.
29. Liu Z, Chen D, Lyu B, Li J, Zhao Y, Wu Y. Exposure to Fipronil Insecticide in the Sixth Total Diet Study - China, 2016-2019. *China CDC Wkly.* **2022**; 4(9):185-189.
30. Wang JX, Cheng YF, Pan XH, Luo P. Tissue-specific accumulation, transformation, and depuration of fipronil in adult crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* **2022**; 232:113234.
31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **1983**; 65(1-2):55-63.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**; 72(1-2):248-254.
33. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev Cell.* **2015**; 32(6):678-692.
34. Silva CM, Ferrari GD, Alberici LC, Malaspina O, Moraes KCM. Cellular and molecular effects of silymarin on the transdifferentiation processes of LX-2 cells and its connection with lipid metabolism. *Mol Cell Biochem.* **2020**; 468(1-2):129-142.
35. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* **2006**; 224(3):213-232.
36. Seviour DK, Pelkonen O, Ahokas JT. Hepatocytes: The powerhouse of

- biotransformation. *Int J of Biochem Cell Biol.* **2012**; 44(2):257-261.
37. Silva AM, Martins-Gomes C, Silva TL, Coutinho TE, Souto EB, Andreani T. In vitro assessment of pesticides toxicity and data correlation with pesticides physicochemical properties for prediction of toxicity in gastrointestinal and skin contact exposure. *Toxics.* **2022**; 10(7):378.
38. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* **2013**; 18(2):153-161.
39. Labarre A, Guitard E, Tossing G, et al. Fatty acids derived from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HA-114 suppress age-dependent neurodegeneration. *Commun Biol.* **2022**; 5(1):1340.
40. Greseth MD, Traktman P. De novo fatty acid biosynthesis contributes significantly to establishment of a bioenergetically favorable environment for vaccinia virus infection. Alwine JC, ed. *PLoS Pathog.* **2014**; 10(3):e1004021.
41. Bravo-Ruiz I, Medina MA, Martínez-Poveda B. From Food to Genes: Transcriptional Regulation of Metabolism by Lipids and Carbohydrates. *Nutrients.* **2021**;13(5):2-24.
42. Zoccarato A, Nabeebaccus AA, Oexner RR, Santos CXC, Shah AM. The nexus between redox state and intermediary metabolism. *FEBS J.* **2022**; 289(18):5440-5462.
43. Nascè A, Gariani K, Jornayvaz FR, Szanto I. NADPH oxidases connecting fatty liver disease, insulin resistance and type 2 diabetes: current knowledge and therapeutic outlook. *Antioxidants.* **2022**; 11(6):1131.
44. Naik A, Belić A, Zanger UM, Rozman D. Molecular interactions between NAFLD and xenobiotic metabolism. *Front Gene.* **2013**;4:2.
45. Petrick JS, Klaassen CD. Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metab Dispos.* **2007**; 35(10):1806-1815.
46. Wahlang B, Alexander NC, Li X, Rouchka EC, Kirpich IA, Cave MC.

- Polychlorinated biphenyls altered gut microbiome in CAR and PXR knockout mice exhibiting toxicant-associated steatohepatitis. *Toxicol Rep.* **2021**; 8:536-547.
47. Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol.* **2018**; 7:44-51.
48. Kwon HC, Kim DH, Jeong CH, et al. Tebuconazole fungicide induces lipid accumulation and oxidative stress in hepg2 cells. *Foods.* **2021**; 10(10):2242.
49. Wang J, Lu P, Xie W. Atypical functions of xenobiotic receptors in lipid and glucose metabolism. *Medical Review.* **2022**; 0(0). doi:10.1515/mr-2022-0032
50. Sondermann NC, Faßbender S, Hartung F, et al. Functions of the aryl hydrocarbon receptor (Ahr) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* **2023**; 208:115371.
51. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metab Dispos.* **2009**; 37(1):221-228.
52. Iluz-Freundlich D, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. *Ann Hepatol.* **2020**; 19(2):204-208.
53. Jeong CH, Kwon HC, Cheng WN, Kim DH, Choi Y, Han SG. Aluminum exposure promotes the metastatic proclivity of human colorectal cancer cells through matrix metalloproteinases and the TGF- β /Smad signaling pathway. *Food Chem Toxicol.* **2020**; 141:111402.
54. Kwon HC, Sohn H, Kim DH, et al. *in vitro* and *in vivo* study on the toxic effects of propiconazole fungicide in the pathogenesis of liver fibrosis. *J Agric Food Chem.* **2021**; 69(26):7399-7408.
55. Stellavato A, Lamberti M, Pirozzi AVA, de Novellis F, Schiraldi C. Myclobutanil worsens nonalcoholic fatty liver disease: An in vitro study of toxicity and apoptosis on HepG2 cells. *Toxicol Lett.* **2016**; 262:100-104.
56. Armstrong LE, Guo GL. Understanding environmental contaminants' direct effects

- on non-alcoholic fatty liver disease progression. *Curr Envir Health Rpt.* **2019**; 6(3):95-104.
57. Sun Q, Clark JM, Park Y. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of human studies. *Toxicological & Environmental Chemistry.* **2017**; 99(9-10):1283-1303.
58. Xiao X, Clark JM, Park Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food Chem Toxicol.* **2017**; 105:456-474.
59. Gueffi M, Maioli MA, Tavares MA, Mingatto FE. Citotoxicity of fipronil on hepatocytes isolated from rat and effects of its biotransformation. *Braz arch biol technol.* **2015**; 58(6):843-853.
60. Yang T, Ma X, Jiang M, et al. The role of tea tree oil in alleviating palmitic acid-induced lipid accumulation in bovine hepatocytes. *Front Vet Sci.* **2022**; 8:814840.
61. Komatsu M, Kanda T, Urai H, et al. NNMT activation can contribute to the development of fatty liver disease by modulating the NAD⁺ metabolism. *Sci Rep.* **2018**; 8(1):8637.
62. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-specific disruption of cd36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in hfd-fed mice. *Endocrinology.* **2016**; 157(2):570-585.
63. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* **2014**; 63(7):895-902.
64. Beysen C, Schroeder P, Wu E, et al. Inhibition of fatty acid synthase with FT-4101 safely reduces hepatic de novo lipogenesis and steatosis in obese subjects with non-alcoholic fatty liver disease: Results from two early-phase randomized trials. *Diabetes Obes Metab.* **2021**; 23(3):700-710.
65. Kasapkara CS, Civelek Ürey B, Ceylan AC, Ünal Uzun Ö, Çetin İİ. Malonyl coenzyme A decarboxylase deficiency with a novel mutation. *Cardiol Young.* **2021**; 31(9):1535-1537.

- 1
2
3
4 66. Zhao L, Yang L, Ahmad, K. Kaempferol ameliorates palmitate-induced lipid
5 accumulation in HepG2 cells through activation of the Nrf2 signaling pathway.
6 Hum Exp Toxicol. **2023**; Jan-Dec (42): 9603271221146780.
7
8
9 67. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM,
10 dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol*. **2017**; 13(1):36-49.
11
12
13 68. Tutunchi H, Ostadrahimi A, Saghafi-Asl M, et al. Oleoylethanolamide
14 supplementation in obese patients newly diagnosed with non-alcoholic fatty liver
15 disease: Effects on metabolic parameters, anthropometric indices, and
16 expression of PPAR- α , UCP1, and UCP2 genes. *Pharmacol Res*. **2020**;
17 156:104770.
18
19
20 69. Mooli RGR, Ramakrishnan SK. Emerging role of hepatic ketogenesis in fatty liver
21 disease. *Front Physiol*. **2022**; 13:946474.
22
23
24 70. Silva AKS, Peixoto CA. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in
25 non-alcoholic fatty liver disease inflammation. *Cell Mol Life Sci*. **2018**;
26 75(16):2951-2961.
27
28
29 71. Wilson HE, Stanton DA, Rellick S, Geldenhuys W, Pistilli EE. Breast cancer-
30 associated skeletal muscle mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is
31 reversed by PPARG. *Ame J of Physiol Cell Physiol*. **2021**; 320(4):C577-C590.
32
33
34 72. Bhatia SC, Venkitasubramanian TA. Mechanism of dieldrin-induced fat
35 accumulation in rat liver. *J Agric Food Chem*. **1972**; 20(5):993-996.
36
37
38 73. Liu Q, Wang Q, Xu C, et al. Organochloride pesticides impaired mitochondrial
39 function in hepatocytes and aggravated disorders of fatty acid metabolism. *Sci*
40 *Rep*. **2017**; 7(1):46339.
41
42
43 74. Xiang D, Chu T, Li M, Wang Q, Zhu G. Effects of pyrethroid pesticide cis-
44 bifenthrin on lipogenesis in hepatic cell line. *Chemosphere*. **2018**; 201:840-849.
45
46
47 75. Yang JS, Qi W, Farias-Pereira R, et al. Permethrin and ivermectin modulate lipid
48 metabolism in steatosis-induced HepG2 hepatocyte. *Food Chem Toxicol*. **2019**;
49 125:595-604.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
76. Pirozzi AVA, Stellavato A, La Gatta A, Lamberti M, Schiraldi C. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicol Lett.* **2016**; 249:1-4.
77. Lu J, Fan Y, Liu M, Zhang Q, Guan S. 1,3-dichloro-2-propanol induced lipid accumulation by blocking autophagy flux in HepG2 cells. *Toxicology.* **2021**; 454:152716.
78. Haydarova F, Sadikova D. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: Diagnostic methods. *EJEA.* August 2020.
79. Ziolkowska S, Binienda A, Jablkowski M, Szemraj J, Czarny P. The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *IJMS.* **2021**; 22(20):11128.
80. Bataller R, Gao B. Liver fibrosis in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis.* **2015**; 35(02):146-156.
81. Ramos LF, Silva CM, Pansa CC, Moraes KCM. Non-alcoholic fatty liver disease: molecular and cellular interplays of the lipid metabolism in a steatotic liver. *Expert Rev of Gastroenterol Hepatol.* **2021**; 15(1):25-40.
82. Miao Z, Miao Z, Wang S, Wu H, Xu S. Exposure to imidacloprid induce oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, apoptosis and mitophagy via NF-kappaB/JNK pathway in grass carp hepatocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **2022**; 120:674-685.
83. Iihui X, Jinming G, Yalin G, Hemeng W, Hao W, Ying C. Albicanol inhibits the toxicity of profenofos to grass carp hepatocytes cells through the ROS/PTEN/PI3K/AKT axis. *Fish Shellfish Immunol.* **2022**; 120:325-336.
84. Ore A, Akinloye O. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina.* **2019**; 55(2):26.
85. Ambolet-Camoit A, Ottolenghi C, Leblanc A, et al. Two persistent organic

pollutants which act through different xenosensors (Alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interact in a mixture and downregulate multiple genes involved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism. *Biochimie*. **2015**; 116:79-91

86. Attignou EA, Leblanc AF, Le-Grand B, et al. Novel roles for AhR and ARNT in the regulation of alcohol dehydrogenases in human hepatic cells. *Arch Toxicol*. **2017**; 91(1):313-324.
87. Szántó M, Gupte R, Kraus WL, Pacher P, Bai P. PARPs in lipid metabolism and related diseases. *Prog Lipid Res*. **2021**; 84:101117.
88. Shan Q, Li H, Chen N, Qu F, Guo J. Understanding the multiple effects of PCBs on lipid metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes*. **2020**; 13:3691-3702.
89. Tarnow P, Tralau T, Luch A. Chemical activation of estrogen and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways and their interaction in toxicology and metabolism. *Expert Opin on Drug Metab Toxicol*. **2019**; 15(3):219-229.
90. Qiu S, Vazquez JT, Boulger E, et al. Hepatic estrogen receptor α is critical for regulation of gluconeogenesis and lipid metabolism in males. *Sci Rep*. **2017**; 7(1):1661.

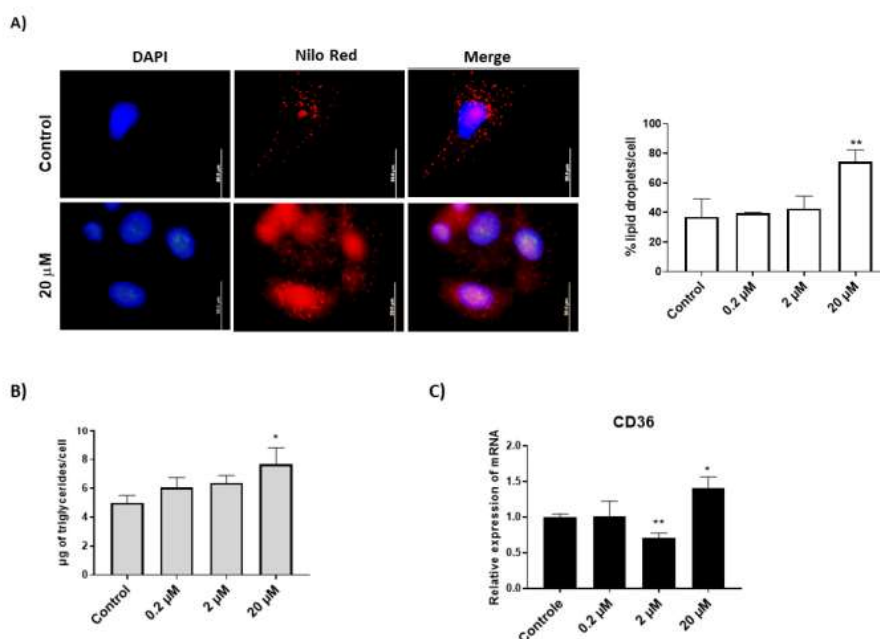


Figure 1. Effects of the insecticide fipronil on neutral lipids accumulation in HepG2 hepatocyte. A) Representative microscopic analyses. Cells were incubated or not with different concentrations of the pesticide for 24 hours and images were taken on an Olympus BX51 microscope. The labelling of lipid droplets was processed Nile red staining and nuclei with DAPI. B) Biochemical analyses of triglycerides and C) gene expression analyses of CD 36. Graphs represents the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments and the statistics was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's analyses between the investigated groups. The significance level was set at $p < 0.05$ (*).

93x68mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

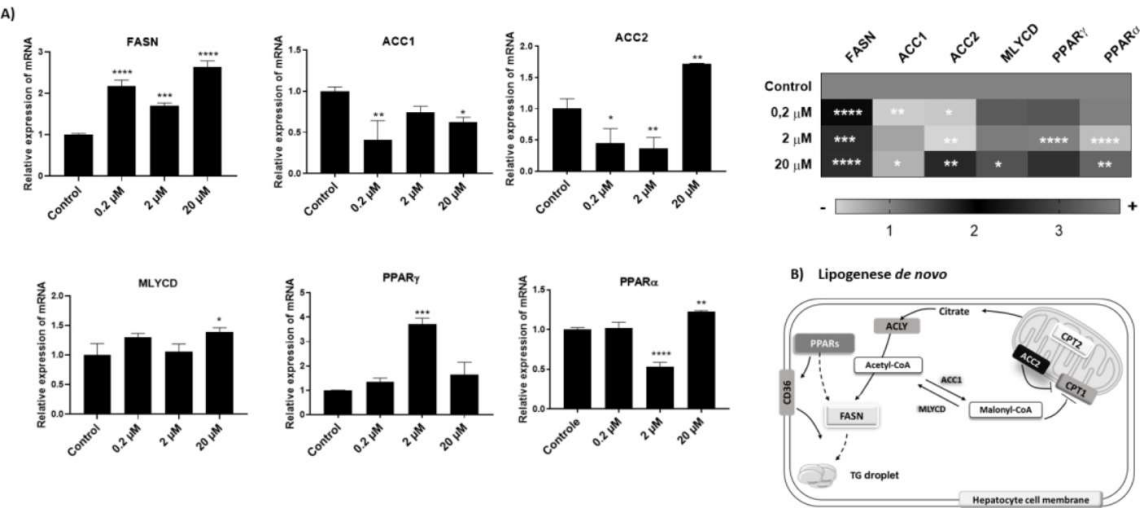
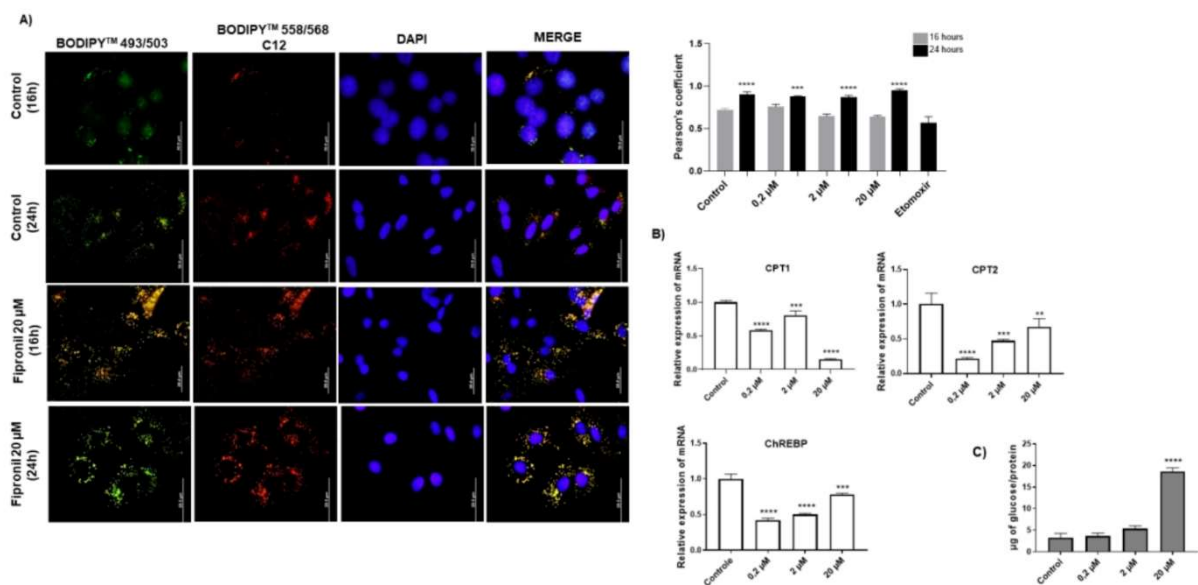


Figure 2. Modulatory effect of fipronil in gene expression of lipid metabolism in HepG2 cell line. A) The figure presents the transcriptional level of relevant molecules in lipid metabolism pathway and their heat map. B) Schematic representation of lipid metabolic route in a hepatocyte. Graphs represents the mean $\pm$ SD from at least three independent experiments and the statistics was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's analyses between the investigated groups. The significance level was set at $p < 0.05$ (*).

150x67mm (300 x 300 DPI)



153x74mm (300 x 300 DPI)