



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

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

LETÍCIA FERREIRA RAMOS

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

Fevereiro - 2020

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

Letícia Ferreira Ramos

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

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

Fevereiro – 2020

R175a Ramos, Letícia Ferreira
Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e associação com o processo pró-esteatótico em hepatócitos humanos.
/ Letícia Ferreira Ramos. -- Rio Claro, 2020
166 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Esteatose hepática. 2. Células HepG2. 3. Metabolismo lipídico. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e sua correlação com o processo pró-esteatótico em hepatócitos humanos.

AUTORA: LETÍCIA FERREIRA RAMOS

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

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

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



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



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



Rio Claro, 27 de fevereiro de 2020

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

Dedico essa pesquisa ao meu companheiro de vida, Jonathan.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Josh Billings

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

Keywords: Liver steatosis. HepG2 cells. Lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

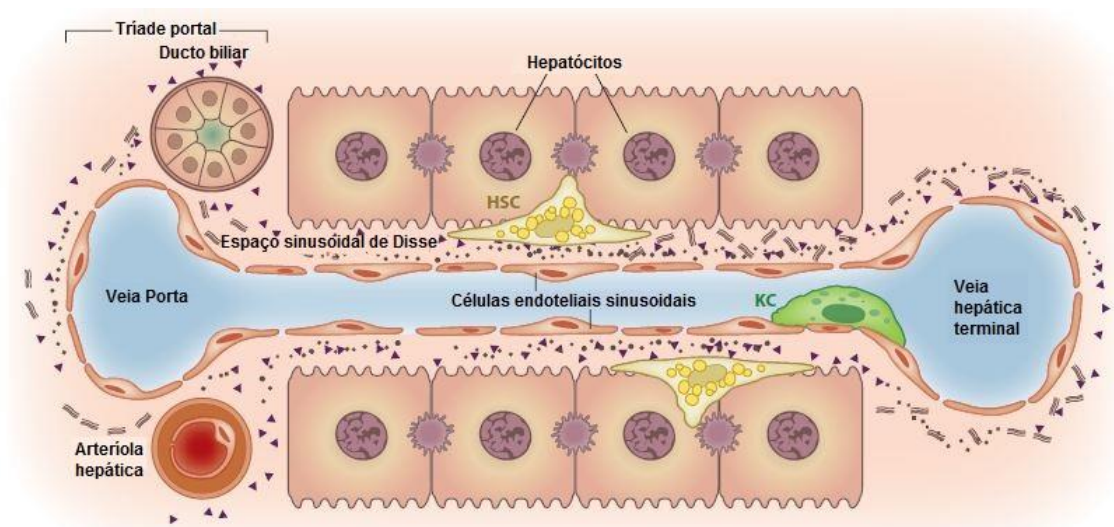
4.5 Análise da atuação funcional do miRNA-1914-5p no modelo celular.	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO II – Análises celulares e moleculares da pró-esteatose na linhagem celular HepG2.....	77
5.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miRNA: mensuração dos níveis do miRNA-1914-5p em células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

1 INTRODUÇÃO.

1.1 O fígado e as doenças hepáticas.

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

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



Adaptado de Hernandez-Gea; Friedman (2011).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

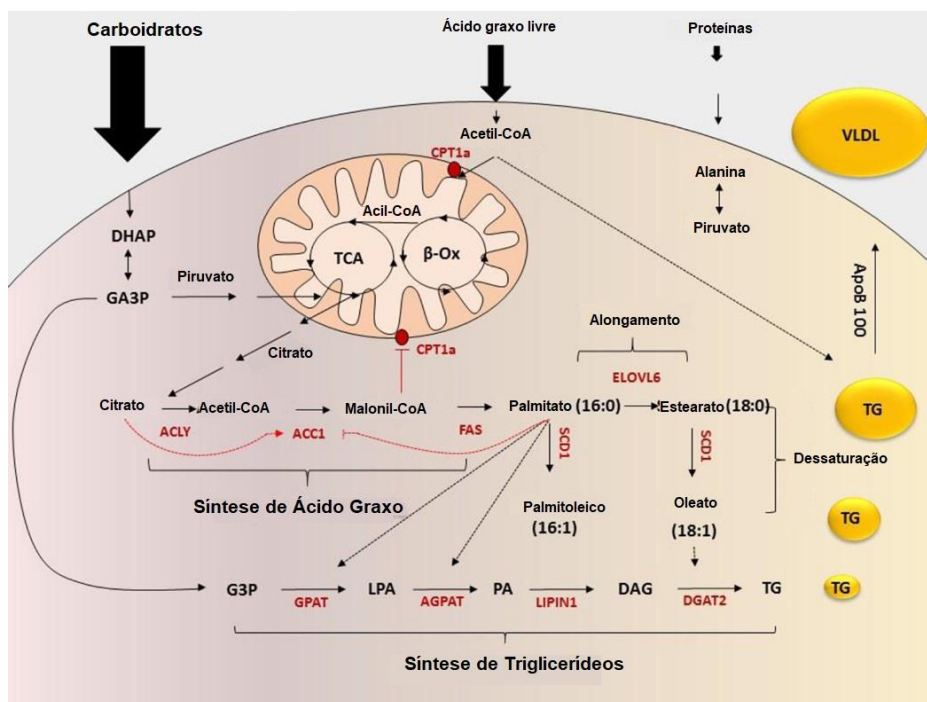
O fígado controla diversos aspectos do metabolismo e no que se refere ao metabolismo de lipídeos, o órgão assume posição ímpar, considerando sua função principal na síntese de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, na produção de corpos cetônicos, na formação de triacilgliceróis para originar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

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

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

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

Figura 2. Lipogênese *de novo* hepática.



Adaptado de Softic, Cohen e Kahn (2016).

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

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

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

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

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

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

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

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

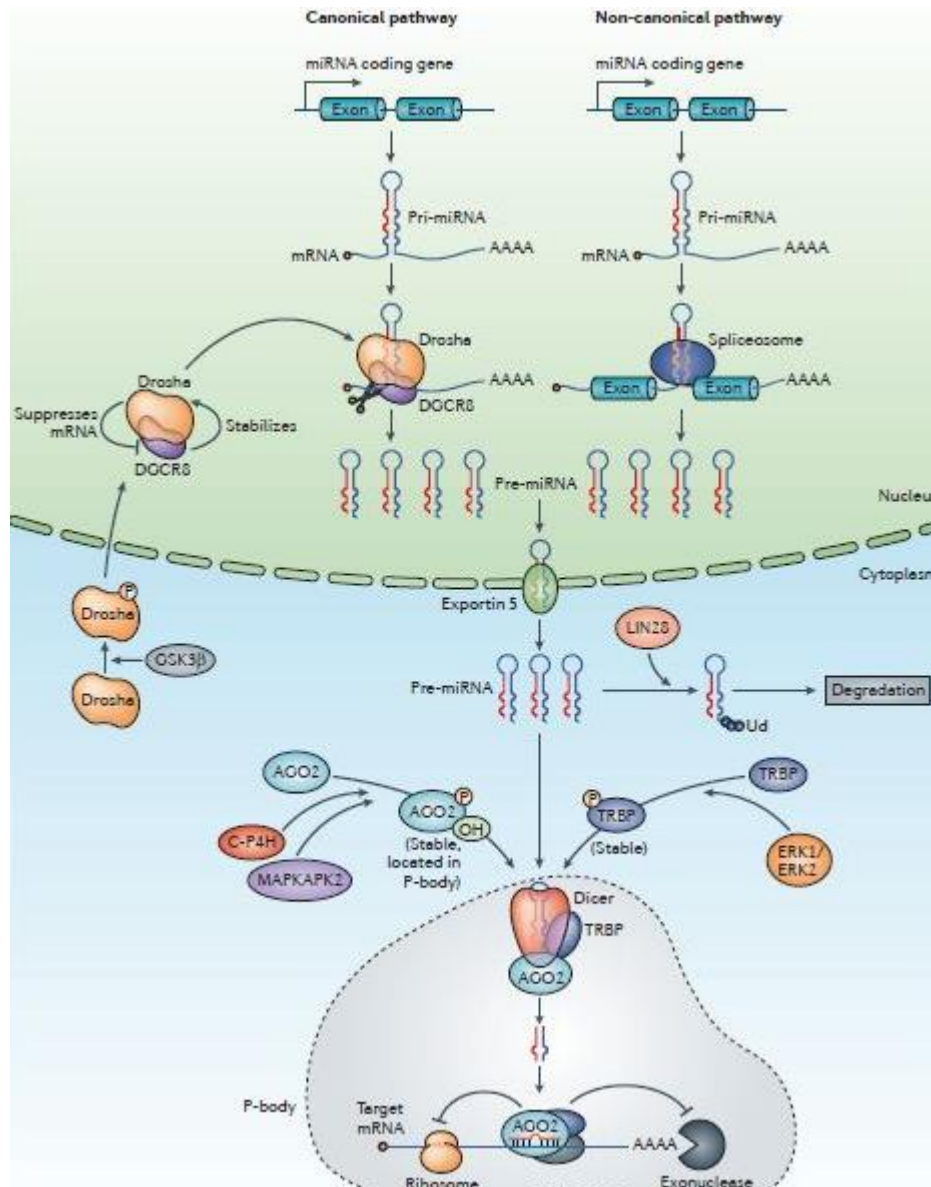
esse metabolismo e que poderão futuramente subsidiar inovações terapêuticas ainda não estão bem esclarecidos.

1.3 MicroRNAs e a modulação na homeostase celular hepática.

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

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

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



Fonte: Li; Rana, (2014).

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

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

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

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

e colaboradores (2018) identificaram três miRNAs (-1293, -873 e -1914) diferencialmente expressos em pacientes com adenocarcinoma de pulmão. Nesse estudo, os três miRNAs se encontram em superexpressão e extremamente relacionados com a sobrevivência geral dos pacientes. No mesmo ano, De Oliveira da Silva e colaboradores (2018), demonstraram a atuação do miRNA-1914-5p na modulação do metabolismo lipídico em células estreladas hepáticas de linhagem LX-2; e na cocultura de células LX-2 e hepatócitos HepG2. No ambiente hepático, o microRNA-1914-5p mostrou-se importante na modulação de enzimas chaves no metabolismo lipídico como malonil-CoA descarboxilase (MLYCD), acetil-CoA sintetase de cadeia longa 4 (ACSL4) e lipina (LPIN1), contribuindo para a reversão do fenótipo ativado para o fenótipo quiescente (normal) da linhagem LX-2. Dessa forma, essa forte correlação com o metabolismo lipídico reforça a relevância do presente estudo, aprofundando na correlação da função deste microRNA com o processo pró-esteatótico.

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivos gerais.

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

2.2 Objetivos específicos.

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

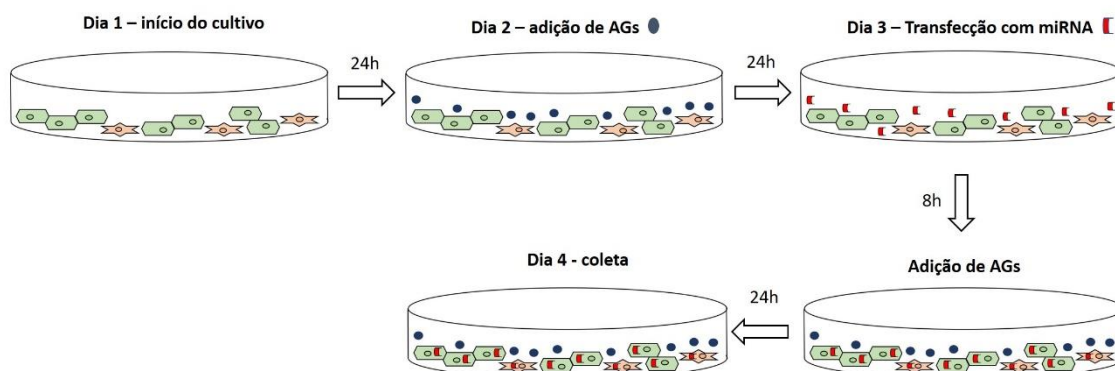
3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Estabelecimento do modelo pró-esteatótico.

Para o estabelecimento de um modelo pró-esteatótico para as análises funcionais, três linhagens de hepatócitos (HuH7- JHSRRB, Cat #JCRB0403, HepG2 - ATCC® HB-8065™ e HepG2/C3A - ATCC® CRL-10741™) foram cultivadas independentemente em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), na presença de 5% de CO₂ e a 37° C, adaptando-se metodologia de Barbero-Becerra *et al.* (2015). Estes meios foram suplementados com misturas de ácidos graxos oleico (C18:1) e palmítico (C16:0) (*Sigma-Aldrich - Merck*) na proporção de 2:1 diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), respectivamente, nas concentrações finais de 800 a 200 µM. Linhagens celulares não tumorais de hepatócitos não foram utilizadas em decorrência da necessidade de alta quantidade de insulina, dexametasona e outros hormônios, que podem alterar o metabolismo lipídico e dificultar a análise dos resultados obtidos. As células foram incubadas por até 48 h na presença dos AGs e ensaios de viabilidade celular (MTT) foram realizados (MOSMANN, 1983). Para melhor delineamento do modelo experimental sobre a eficiência da entrega do miRNA à célula em um meio contendo a mistura de AGs, foram realizados dois testes experimentais:

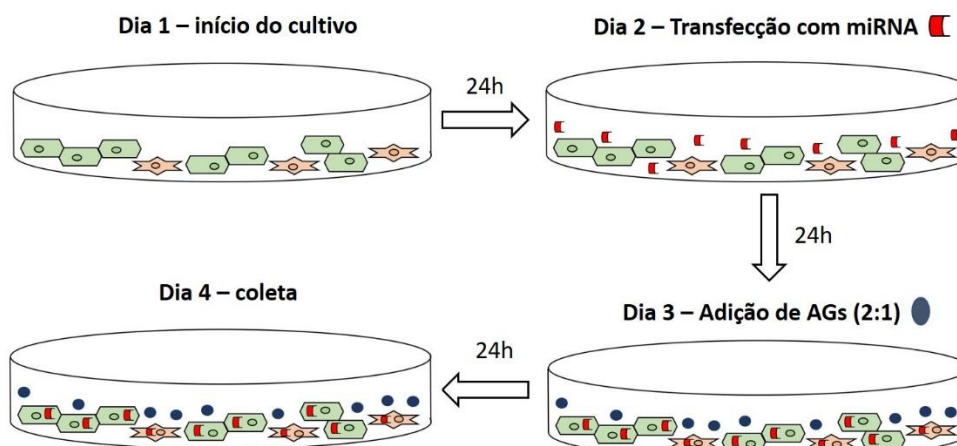
- O primeiro modelo testado foi a realização da transfecção celular após a adição da mistura de AGs (Figura 4);
- O segundo modelo testado foi a realização da transfecção celular antes da adição da mistura de AGs (Figura 5). Após a padronização, este modelo foi mantido em todos os ensaios subsequentes.

Figura 4. Modelo experimental 1. Neste modelo, após 24 horas de cultivo celular, foi adicionado a mistura de ácidos graxos, 48 horas após o início do cultivo o meio contendo AGs foi retirado, as células foram lavadas com PBS e a transfecção celular foi realizada. Oito (8) horas após a transfecção, a mesma concentração de AGs foi adicionada (400 μ M) e as células foram coletadas para ensaios após 72 horas de cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 5. Modelo experimental 2. Neste modelo experimental, as células foram transfectadas com o miRNA após 24 horas de cultivo. Ao completar 24 horas de transfecção celular, foram adicionados 400 μ M da mistura de AGs e 24 horas após as células foram coletadas para os experimentos posteriores.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

3.2 Microscopia de fluorescência: *BLOCK-iT™ Alexa Fluor®*.

Para verificar a eficiência da transfecção transiente no cultivo celular, $3,5 \times 10^4$ células HepG2 foram cultivadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em microplacas de 24 poços. Os ensaios foram realizados se utilizando dos dois modelos experimentais descritos no item 3.1. O processo de transfecção foi realizado com 40 nM do *BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control* (Thermo Fisher Scientific), utilizando-se o reagente de transfecção

Lipofectamine™ RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Esse reagente é uma dupla fita de RNA ligado ao fluoróforo *Alexa Fluor®555* e não é homólogo a nenhum gene conhecido. Dessa forma, é um indicador rápido e estável da eficiência da transfecção celular mediada por lipídeos. Ao final dos ensaios as células foram fixadas por 5 minutos em temperatura ambiente em solução contendo paraformaldeído a 1,4 % e 0,05% de Triton X-100. Em seguida, o núcleo foi marcado com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato) na concentração final de 3,33 ng/mL por um intervalo de 2 minutos em temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com tampão fosfato salino (PBS 1 X - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) 0,5 X, as lâminas foram montadas com auxílio de N-propilgalato. A visualização das lamínulas foi realizada a 555 nm em microscópio de fluorescência modelo BX51 OLYMPUS acoplado a uma câmera fotográfica.

3.3 Cultivo celular, transfecção e indução do processo pró-esteatótico.

Após o estabelecimento do modelo pró-esteatótico para as análises subsequentes, 1.5×10^5 células HepG2 foram crescidas em garrafas de 75 cm², seguindo as especificações previamente descritas, e cultivadas até que as culturas atinjam 80-90% de confluência. Em seguida, as células foram coletadas por tripsinização para serem utilizadas nos diferentes ensaios. Para as análises funcionais do miRNA-1914-5p, os hepatócitos foram crescidos em microplacas de 6 ou 24 poços e após 24 h de cultivo foram submetidos ao processo de transfecção transiente com 40 nM do *miRVana™ Mimics ou Inhibitor 1914-5p* (Thermo Fisher Scientific), utilizando-se o reagente de transfecção *Lipofectamine™ RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific) e seguindo condições previamente estabelecidas pelo nosso grupo (SILVA *et al.*, 2016; RAMOS, 2017). Após 24 h da transfecção, os hepatócitos foram incubados com 400 µM da mistura de AGs na proporção 2:1, para simular condições pró-esteatóticas, como descrito anteriormente. Os respectivos controles negativos da transfecção também foram realizados utilizando-se *miRVana™ miRNA Mimic Negative Control #1* e *miRVana™ miRNA Inhibitor Negative Control #1* (Thermo Fisher Scientific). Após as transfecções, as culturas celulares foram mantidas em cultivo por mais 48 h para permitir a interação sistêmica do miRNA nos

hepatócitos e, em seguida, foram recolhidos e utilizados em análises celulares e moleculares pertinentes. Todas as condições foram cultivadas na presença de 10% de SBF. Assim sendo, finalizamos com oito condições de estudo e cultivo:

- Células HepG2 controle;
- Células HepG2 com adição de 400 μ M de AGs;
- Células HepG2 com adição de DMSO a 0,4%;
- Células HepG2 transfectadas com RNAiMAX e com adição de 400 μ M de AGs;
- Células HepG2 transfectadas com o cópico do miRNA-1914-5p e com adição de 400 μ M de AGs;
- Células HepG2 transfectadas com o inibidor do miRNA-1914-5p e com adição de 400 μ M de AGs;
- Células HepG2 transfectadas com o controle negativo do cópico e com adição de 400 μ M de AGs;
- Células HepG2 transfectadas com o controle negativo do inibidor e com adição de 400 μ M de AGs.

As condições de cultivo com DMSO, RNAiMAX e os controles negativos do cópico e do inibidor foram realizadas como controle da diluição dos AGs e da transfecção, respectivamente. Os resultados obtidos dessas condições foram normalizados e neste trabalho estão apresentados os resultados normalizados das células controle, cultivadas com AGs e transfectadas com o cópico e inibidor.

A análise global dos resultados e dos comparativos entre os diferentes grupos celulares (hepatócitos pró-esteatóticos ou não e os grupos transfectados ou não) viabilizam a efetiva avaliação funcional do miRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico.

3.4 Análise de perfil lipídico: mensuração de triacilgliceróis e colesterol total.

Para analisar o perfil lipídico na linhagem celular e avaliar fisiologicamente a função do miRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico, a mensuração de triacilgliceróis e colesterol total foi realizada com a utilização de kits enzimáticos Labtest (Ref. 87 e 76, respectivamente). Ambos os testes são de sistema enzimático e realizam a mensuração por reação de ponto final,

conferindo boa reprodutibilidade e especificidade. Para isso, 5×10^5 células foram cultivadas em garrafas de 25 cm^2 conforme descrito no item 3.3. Posteriormente, as células foram coletadas por tripsinização em ambos os ensaios.

Nos ensaios para triglicérides, os extratos coletados foram ressuspensos em 100 μL de PBS-EDTA (tampão fosfato-salino contendo 0,7 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) e misturados em tubos de ensaio com 1 mL do Reagente 1 do kit Triglicérides Liquiform (tampão 50 mM pH 7,0; íons magnésio 4 mM; 4-clorofenol 2,7 mM; 4-aminoantipirina 0,3 mM; ATP 1,8 mM; lipoproteína lipase > 1400 U/L; glicerolquinase > 1000 U/L; glicerolfosfato oxidase > 1500 U/L; peroxidase > 900 U/L e azida sódica 0,095%). Em seguida foram incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e as absorbâncias das amostras e do padrão foram mensuradas em espectrofotômetro BioMate 3 (*Thermo Fisher Scientific*) a 505 nm. O padrão da reação foi preparado com 10 μL do reagente Padrão (triglicérides 2,26 mM e azida sódica 0,045%) e 1 mL do Reagente 1.

Nos ensaios para colesterol, os extratos coletados foram ressuspensos em 100 μL de PBS, pois conforme indicação do fabricante, o EDTA pode resultar em falsos positivos. Posteriormente, foram misturados em tubos de ensaio com 1 mL do Reagente 1 do kit Colesterol Liquiform (tampão 50 mM pH 7,0; fenol 24 mM; colato de sódio 0,5 mM; azida sódica 15 mM; 4-aminoantipirina 0,5 mM; colesterol esterase > 250 U/L; colesterol oxidase > 250 U/L e peroxidase > 1000 U/L), incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e as absorbâncias das amostras e do padrão foram mensuradas em espectrofotômetro BioMate 3 (*Thermo Fisher Scientific*) a 500 nm. O padrão da reação foi preparado com 10 μL do reagente Padrão (azida sódica 15 mM) e 1 mL do Reagente 1.

Os cálculos para obtenção do valor de triglicérides e colesterol em mg/dL foram realizados seguindo a informação do fabricante e posteriormente foram convertidos em pg/célula.

3.5 Análise de perfil lipídico: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).

Para avaliação dos lipídeos totais da célula, $2,2 \times 10^5$ células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços conforme descrito no item 3.3. Após atingirem 80% de confluência, as células foram coletadas como extratos e os mesmos foram ressuspensos em 100 μL de PBS. O volume total de cada extrato ressuspensão foi pipetado em uma lâmina de vidro e levado a uma estufa de secagem por 2 dias. Após a secagem, foram realizadas as leituras da lâmina em aparelho *Nicolet is10 FT-IR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific)* na luz infravermelha com 32 scans e o espectro foi obtido em absorbância. Os picos utilizados na normalização das amostras em análise foram os da amida II ($1560\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$) e 4 picos correspondentes aos lipídeos ($2956, 2920, 2870, 2850\text{ cm}^{-1}$) de acordo com Stuart (2004) e Sakane *et al.* (2013). Os cálculos foram realizados somando a área dos 4 picos correspondentes aos lipídeos e dividindo esse valor pela área do pico da amida II.

3.6 Análise de perfil lipídico: microscopia de campo claro com Oil Red O.

Para se avaliar a formação das gotículas de lipídeos, $3,5 \times 10^5$ células HepG2 foram cultivadas em placas de 24 poços nas condições descritas acima. Após atingirem 80% de confluência, as células foram fixadas com formol 4% a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Após sucessivas lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas por 10 minutos em propilenoglicol 100% (*Merck*). Em seguida, a solução de oil red O a 0,7% (0,17 mM de oil red *Merck* + 15 mL de propilenoglicol) foi acrescentada e mantida por 7 minutos em agitação, seguida de nova incubação em propilenoglicol 85% V/V por 3 minutos. Após o intervalo, a lamínula foi lavada com água destilada e incubada com hematoxilina de Harris (3 mM de hematoxilina + 20 mM de alúmen de potássio + 2 mM de óxido de mercúrio) por 1 minuto. Após as lavagens finais, as lâminas foram montadas com auxílio de gelatina glicerina e analisadas em microscópio de luz BX51 OLYMPUS. A quantificação das gotículas lipídicas foi realizada em triplicata com as imagens obtidas com o auxílio do software ImageJ (programa de domínio público desenvolvido pelo National Institute of Health, USA).

3.7 Análise de perfil lipídico: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Para mensuração dos ácidos graxos através da cromatografia gasosa (GC) $2,2 \times 10^5$ células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços conforme descrito no item 3.3. O extrato das células obtido foi lavado com PBS e as células foram submetidas ao processo de esterificação de Fischer (FISCHER; SPEIER, 1895). Esse processo permitiu a obtenção dos ácidos graxos na forma de éster através da hidrólise dos lipídeos por esterificação. A presença dos ácidos graxos na forma de éster facilita o movimento dessas moléculas pelo injetor e pela coluna cromatográfica. Para o início das reações de transesterificação, foi adicionado 1 mL de metanol 100% ao extrato de células e as amostras foram colocadas em banho ultrassom por 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram transferidas para novos tubos e aquecidas a 60 °C para completa secagem do metanol. Em seguida, foram adicionados 400 µL de metanol 100% e 100 µL de hidróxido de potássio a 1 N (KOH) preparado em metanol. O hidróxido de potássio é utilizado como um catalisador para a completa remoção dos ácidos graxos. Após isso, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 60 °C para completa saponificação das mesmas. Após o resfriamento das amostras, foram acrescentados 100 µL de H₂SO₄ a 7 N para derivatização dos ácidos graxos e as amostras foram aquecidas novamente a 60 °C por 10 minutos. Em seguida, 1 mL de hexano foi adicionado em cada amostra e todas foram homogeneizadas vigorosamente para a separação de fases ocorrer. A primeira fase formada foi transferida para novo tubo e guardadas em freezer – 20° C até a aplicação no cromatógrafo GC-210 (*Shimadzu Scientific Instruments*, Japão) equipado com coluna capilar RTX MS (30mx 0,25 mm DI 0,25 µm de espessura) e acoplado a um espectrômetro de massas (*Shimadzu GCMS-QP2010 Plus*). A eluição foi realizada com gás hélio a 1 mL/min. As amostras foram injetadas com o modo sem divisão (temperatura da porta: 250 °C) e mantidas por 1 minuto. A temperatura da coluna foi ajustada para início a 160 °C por 5 minutos, aumentar para 200 °C a 5 °C/min, permanecer a 200 °C por 3 minutos, aumentar para 280 °C a 8 °C/min e permanecer a 280 °C durante 6 minutos. O espectrômetro de massas utiliza ionização de elétrons a 70 eV como fonte de íons, com uma faixa de varredura de 40 a 500 m/z. Os tempos de retenção das amostras nas colunas foram utilizadas para a detecção dos ácidos graxos específicos, utilizando-

se padrões comparativos. Os padrões utilizados incluíam: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1), ácido esteárico (C18:0) e ácido araquidônico (C20:4) nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 5 ppm. Os dados foram processados utilizando o software GCMS Solution versão 2.5.

3.8 Mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Para mensuração de espécies reativas de oxigênio intracelulares, 1×10^4 células HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas conforme descrito no item 3.3. Após os devidos intervalos de incubação, os ensaios foram realizados com o *Fluorometric Intracellular ROS Kit* (Sigma-Aldrich - Merck). Após a reconstituição do *ROS Detection Reagent* com DMSO para formar o *500 X ROS Detection Reagent Stock Solution*, um mix da reação foi preparado com 50 μL do *500 X ROS Detection Reagent* e 10 mL do tampão da reação. Posteriormente, 100 μL do mix foi adicionado aos poços contendo as células nas diferentes condições de estudo. As células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com 5% de CO_2 atmosférico e em seguida foi realizada a leitura da intensidade da fluorescência com $\lambda_{\text{ex}} = 640$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 675$ nm em aparelho RChistoInfinite M200 PRO TECAN.

3.9 Mensuração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$).

Para mensuração do potencial de membrana mitocondrial, 1×10^4 células HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas conforme descrito no item 3.3. Após os devidos intervalos de incubação, os ensaios foram realizados com o *Mitochondrial Membrane Potential Kit* (Sigma-Aldrich - Merck). Após a preparação do *Dye Loading Solution* contendo 10 mL de *Assay Buffer A* em 50 μL de 200 *Mitochondrial Potential Dye*, o meio de cultivo celular foi retirado e 100 μL de *Dye Loading Solution* foi adicionado por poço e incubado por 30 minutos a 37 °C e 5% de CO_2 atmosférico. Em seguida, foram adicionados 50 μL por poço de *Assay Buffer B* e as células foram incubadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em aparelho RChistoInfinite M200 PRO TECAN com intensidade de fluorescência $\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm e $\lambda_{\text{em}} =$

590 nm. O controle positivo foi realizado com a adição de CCCP (Carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona) na concentração de 100 μ M.

3.10 Análise de níveis transcricionais.

3.10.1 Extração de RNA total.

Células da linhagem HepG2 nas diferentes condições de cultivos foram crescidas em placas de 6 poços conforme as especificações do item 3.3. Para as análises de expressão gênica, as células foram coletadas com *TRIZOL™ Reagent (Thermo Fisher Scientific)* e o RNA total foi extraído seguindo as recomendações do fornecedor. Para isso, as células foram ressuspensas em 500 μ L de *TRIZOL™*, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos e transferidas para novo tubo. Foram adicionados a cada amostra 100 μ L de clorofórmio (*Merck*), seguido de agitação vigorosa do tubo até a junção das fases e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C originando uma mistura trifásica. Desta mistura trifásica, foi retirada a primeira fase (transparente) e transferida para um novo tubo. Nesse novo tubo foram adicionados 250 μ L de álcool isopropílico (100%), seguido de agitação suave e incubação em gelo por 10 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 80%. Os tubos foram centrifugados a 7.600 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Após isso, os precipitados de RNA foram colocados para secarem por um breve intervalo a temperatura ambiente. Após secos, o RNA foi ressuspenso em 30 μ L de água livre de RNase e quantificado em aparelho espectrofotômetro *NanoVue™ Plus (GE Healthcare)*, utilizando-se a razão A260/A280 (260 nm - absorbância de DNA/ 280 nm – absorbância de proteína) e A260/A230 (230 nm – absorbância de contaminantes, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol) para se avaliar a qualidade do RNA extraído.

3.10.2 Transcrição reversa de RNA total.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total extraído das diferentes condições de cultivo de HepG2, utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific). As reações de transcrição reversa foram realizadas com 200 ng do RNA extraído, 10 µM de oligonucleotídeos (10 X RT Random Primers), 8 mM de dNTPs (25 X dNTP Mix 100 mM) e 1,25 U de transcriptase reversa (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*). As reações foram colocadas em termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf) e o ciclo foi realizado conforme orientações do fornecedor. 10 minutos a 25 °C, seguido de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C para inativação enzimática. O cDNA resultante foi diluído (1:10) para utilização em qPCR.

3.10.3 Extração de miRNA.

Para a análise da expressão de miRNAs dos diferentes grupos de cultivo de HepG2, as células foram cultivadas em placas de 6 poços como já descrito e os miRNAs foram extraídos com o kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen®). As células foram coletadas com 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent* e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 140 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a solução aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 1,5 x V/V de etanol 100%. Em seguida, as amostras foram transferidas para as mini colunas (*RNeasy® Mini Column - Qiagen®*) e centrifugadas a 8.000 g por 15 segundos à temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e em cada uma das colunas foram adicionados 700 µL de tampão RWT (*Qiagen®*) com posterior centrifugação a 8.000 g por 15 segundos em temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e às colunas foram adicionados 500 µL de tampão RPE (*Qiagen®*), seguido de nova centrifugação a 8.000 g por 15 segundos a temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados novamente e a cada coluna 500 µL de RPE foram adicionados com posterior centrifugação a 8.000 g por 2 minutos em temperatura ambiente. As colunas foram transferidas para novo tubo e foram adicionados

40 µL de água livre de RNase diretamente sobre as membranas das colunas, com centrifugação posterior de 8.000 g a 1 minuto em temperatura ambiente para a obtenção do filtrado final contendo o miRNA total de cada amostra. O miRNA total foi quantificado em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare) a 260 nm, utilizando a razão A260/A280 e A260/A230 para avaliar-se a qualidade do miRNA extraído.

3.10.4 Transcrição reversa de miRNA.

A obtenção do cDNA foi realizado com o *miScript II RT Kit* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, foram realizadas reações com 500 ng de miRNAs extraídos, 20 mM de tampão (5 X *miScript HiSpec Buffer*), 10 mM de oligonucleotídeos (10 X *miScript Nucleics Mix*), 10 mM da enzima transcriptase reversa (*miScript Reverse Transcriptase Mix*) e água livre de RNases para completar o volume final de 20 µL. As reações foram colocadas em termociclador *Mastercycler pro S®* (Eppendorf) por 10 minutos a 25 °C, seguidos de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C.

3.10.5 Análise de expressão dos níveis transcricionais por reação de polimerase em cadeia quantitativa (qPCR).

Para se avaliar a atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e no processo pró-esteatótico dos hepatócitos, níveis transcricionais de genes relevantes nesses metabolismos foram avaliados em reações de qPCR. Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - ThermoFisher Scientific), em placas de 96 poços (*MicroAmp® Optical 96 Well Reacion Plate* – Applied Biosystems) e seladas com o adesivo óptico (*Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film* – Thermo Fisher Scientific™). Cada reação foi processada com um volume final de 5 µL, contendo 0,75 µM de oligonucleotídeos, 1 µL de cDNA (1:10) e 2,5 µL de SYBR® *Green PCR Master Mix*. Os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas para todos os genes avaliados, com o controle endógeno (β -actina) presente em todas as placas. As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔC_t), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras. Os níveis dos genes

alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno. Os resultados foram lançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo normalizado ($\Delta\Delta C_t$). As reações de qRT-PCR foram conduzidas em aparelho AB *Applied Biosystems Step One Plus Real time PCR System*. Genes específicos e correlatos ao metabolismo de lipídeos e ao processo pró-esteatótico foram desenhados com auxílio do programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e verificados em BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados se encontram no Quadro 1.

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (3'-5')	Amplicon (pb)
<i>acc1</i>	TGTAAGAGCTCATTTTGGAG GA	GAATCGAGAGTGCTGGTTCA G	82
<i>acc2</i>	GCAGCTGATGACCAACTTCA	TCCGGGTAGACTCACGAGAT	92
<i>acly</i>	CATCCGGAGGTAGATGTGCT	CGGATCTGGGCATAGTTCAT	89
<i>acsl4</i>	ATGGATGATTGCAGCACAG A	CTGCTTCTTTGCCAAGTGTG	80
<i>acsl5</i>	GAGCCCACTCCTGATGATGT	GGCTCCACAGCTGTACACAA	93
<i>agpat1</i>	AATGGCTGGATCCTCTTCCT	GAGCAGCATTAGACGCAAG A	99
<i>agpat2</i>	GTTCGTGCGAAGCTTCAAGT	TGGTTGGAGACGATGACAC A	99
<i>agpat3</i>	GCAGTCATCATCCTCAACCA	TTCTTAGCGAGGACCTTGGA	104
<i>apob</i>	TTCAGAAGGCATCTGGGAGT	ATGTGGAAGTCTGGCAATCC	106
<i>atg5</i>	TTTGCATCACCTCTGCTTTC	TAGGCCAAAGGTTTCAGCTT	118
<i>atg7</i>	TGCCAGAGGATTCAACATGA	CAGTTGCTCCACATCTCTGC	97

<i>atgl</i>	GGTGGCATTTCAGACAACCT	GATGTTGGTGGAGCTGTCCT	92
<i>cd36</i>	GCAAAATCCACAGGAAGTG A	CGTCCTGGGTTACATTTTCC	110
<i>chrebp</i>	TGCAAACAGCTCTTCTCCAG	CGGACAAAAAGCAATTGAG G	100
<i>cidec</i>	ACTGCAGTGAAAGCCCAAG T	GGGCACTACCAGTTAAGCGT	81
<i>cpt1a</i>	GCTCATGGTGAACAGCAACT	TAAAGCAGGATGGCATGGA T	105
<i>cpt2</i>	CCAGCCAGCTACCACTGACT	TTAGCAGCTGTGATGCCAGT	90
<i>cs</i>	CCATCCACAGTGACCATGAG	GCTGCAAAGGACAGGTAAG G	94
<i>dgat1</i>	GCCTTCTTCCACGAGTACCT	AGTGGGATCTGAGCCATCA	86
<i>dgat2</i>	TGAGTCTCTGAGCTCCATGC	AACCAGGTCAGCTCCATGAC	97
<i>fasn</i>	TCCTGCTGACCAAGAAGTCC	CTTGCTCCTTGAAGCCATCT	87
<i>fgf21</i>	ATGGATCGCTCCACTTTGAC	GCTTCGGACTGGTAAACATT G	85
<i>g6pc</i>	TGCAGCTGAATGTCTGTCTG T	AACAGCAATGCCTGACAGG A	89
<i>gpat1</i>	TCGATGAACACCAGATGGA	CAAGAATTGCTGCTGTGCGAA	83
<i>gpat3</i>	CAGAAGGGAGGCATTTGTGT	ATGAACCTGGCCAACCATAG	96
<i>hsl</i>	TTTGAGATGCCACTGACTGC	GAGATGAGCCTGACGAGGA C	98
<i>lc3</i>	TGCTGGTGAACAACAAGAG C	TGTACACGAAGCCATCCTCA	90
<i>lpin1</i>	ATGAATTACGTGGGGCAGTT	ATGATGTCAATGCACCCTGA	101
<i>lpin2</i>	TGAGCTCCGATGATGACAAG	TGATCCCCAGAATGGAAGA G	106
<i>lpin3</i>	TTCAGCCTGACACAGAGGAT	GAGCTCTGAGTCTTGCTTTC CT	82

<i>lxra</i>	TCCACTACAATGTTCTGAGC	ACGCATGTAGGTGTCCAT	119
<i>lxrb</i>	TGAAGGCATCCACTATCGAG	TCGTCCTTGCTGTAGGTGAA	106
<i>magl</i>	GATCGCCTATGTGACAGCAA	GCTCCTTGTTGGAGAACATGG	87
<i>mlycd</i>	GACATCTCCAGCAACATCCA	CTGGGTCAAGCTGATGGAAT	108
<i>pepck1</i>	AAGACCAACCCCAATGCCAT	TAGCGGCTCATCAATGCCTT	108
<i>ppar-α</i>	GGCCTCAGGCTATCATTACG	ACCAGCTTGAGTCGAATCGT	81
<i>ppar-γ</i>	GGCTTCATGACAAGGGAGTT TC	AACTCAAACCTGGGCTCCAT AAAG	74
<i>rxra</i>	GTTTCGCTAAGCTCTTGCTC	CATAAGGAAGGTGTCAATG G	115
<i>scd1</i>	GGACGATATCTCTAGCTCCT	TCGTCTCCAACCTTATCTCCT	92
<i>srebp1</i>	CCCTGTAACGACCACTGTGA	TTCATGGCTGTCAGAAGCAG	99
<i>srebp1c</i>	AATCCGCCGCGCCTTGACAG	AAGTGCAATCCATGGCTCC	107
<i>β-actina</i>	CGGGACCTGACTGACTAC	CTCCTTAATGTCACGCAC	87

3.10.6 Análise de expressão diferencial por qPCR: miRNA-1914-5p.

As amostras de cDNA dos miRNAs foram utilizadas em reações de qPCR utilizando o miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen®) para se identificar a expressão diferencial do miRNA-1914-5p nas diversas condições estudadas. Assim sendo, cada reação foi processada em volume final de 5 μ L em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) seladas com o adesivo óptico (Applied Biosystems® Micro Amp® Optical Adhesive Film – Thermo Fisher Scientific™). As reações foram realizadas em triplicatas técnicas, com a utilização do U6 como normalizador. O equipamento utilizado para o ensaio

foi o AB *Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System* onde o ciclo consiste de uma etapa de ativação inicial de 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (desnaturação: 94 °C – 15 segundos; anelamento: 55 °C – 30 segundos; e extensão: 70 °C – 30 segundos). As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta C_T$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre diferentes amostras.

3.11 Análise proteômica.

Para a obtenção das amostras, $1,5 \times 10^6$ células HepG2 foram crescidas em garrafas de 75 cm² nas diferentes condições de cultivo, conforme descrito anteriormente. O conjunto de células foi coletado por tripsinização e ressuspenso em tampão de lise (Triton X-100 0,5%, Tris HCl pH 7,2 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 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 sonicadas 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 µg de proteína foram adicionados 100 µL 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 foi realizada 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*

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). Para as análises de espectrometria de massas foi utilizado um espectrômetro do tipo μ LC-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 μ m (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 $\pm 0,8$ Da e erro de tolerância de $MS_n \pm 0,8$ 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.

Após, 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*, para validar a identificação dos peptídeos. Posteriormente, para interpretar os dados obtidos, as proteínas

identificadas foram analisadas de acordo com o Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) (SCHMIDT; FORNE; IMHOF, 2014).

3.12 Análise bioinformática.

As análises de bioinformáticas foram realizadas para investigar os possíveis sítios de ligação do miRNA-1914-5p com os mRNAs. Foram utilizadas três plataformas online, o miRDB (<http://www.mirdb.org/>), miRBase (<http://www.mirbase.org/>) e o Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_72/).

3.13 Análise estatística.

As análises estatísticas foram geradas utilizando-se o programa Graph Pad, versão 5.0 (*Prism Inc.*), onde as médias $\pm$ desvio padrão foram obtidas. A análise de significância estatística foi realizada com a utilização do teste estatístico *One Way ANOVA* seguido de teste de Dunnett ou Tukey sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO I - O modelo pró-esteatótico.

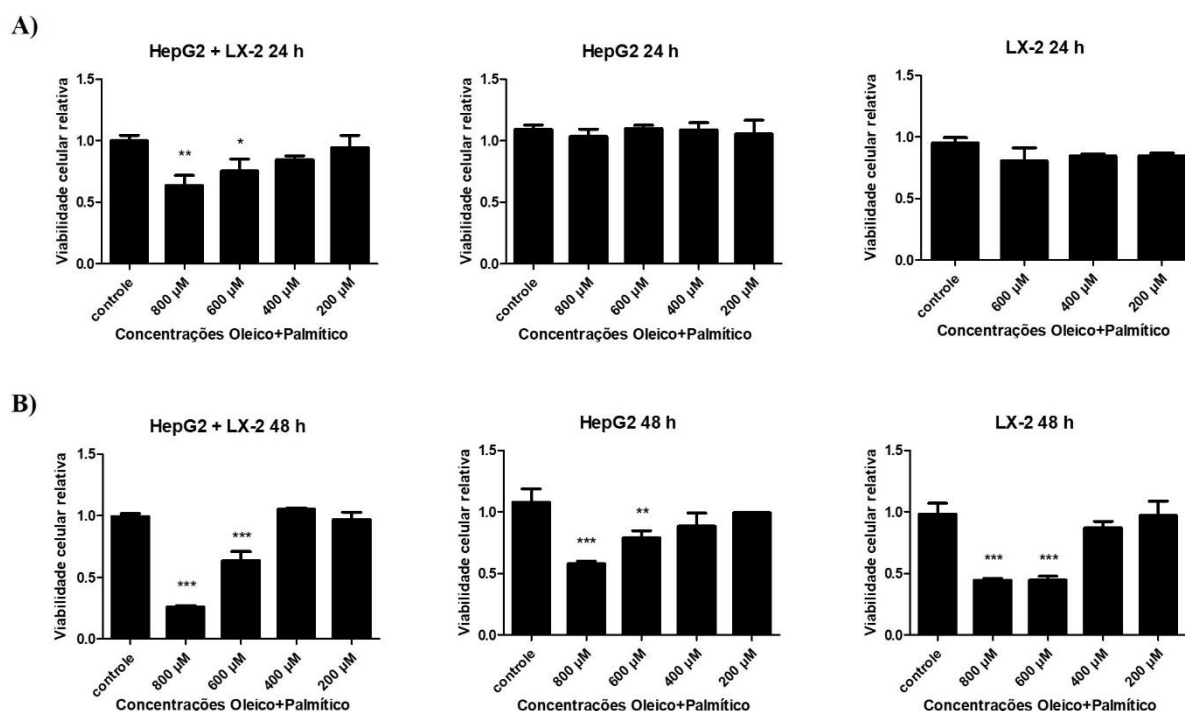
O estabelecimento do modelo pró-esteatótico está inserido no projeto “Análise mecanístico-funcional do microRNA-1914-5p no processo pró-esteatótico hepático não alcoólico em cultura celular” (Processo FAPESP 2018/05286-3) da professora Dr.^a Karen. C. M. Moraes. Assim sendo, ele foi realizado em cocultura de hepatócitos com células estreladas hepáticas (linhagem LX-2). Entretanto, o mesmo modelo estabelecido foi utilizado nas linhagens cultivadas isoladamente (HepG2 e LX-2) para um comparativo entre as respostas metabólicas de cada condição ao processo pró-esteatótico. Parte desses resultados serão apresentados no Capítulo II e III. Os resultados apresentados aqui fazem parte das análises desenvolvidas pelo grupo da professora orientadora e que são considerados relevantes dentro do estudo em andamento.

4.1 A escolha da concentração de ácidos graxos.

Como descrito acima, o estabelecimento do modelo celular se iniciou com análises de três tipos de linhagens celulares correspondentes a hepatócitos humanos, HepG2, HuH7 e HepG2/C3A. A linhagem celular HepG2/C3A não prosperou em cultivo dentro das condições de nosso laboratório. Dessa forma, essa linhagem foi descartada da padronização logo no início das atividades. Assim sendo, as análises iniciais de viabilidade celular foram realizadas com as células HepG2 e HuH7 isoladas e em cocultivo com a linhagem de células estreladas hepáticas LX-2. Os resultados dos ensaios de viabilidade celular correspondentes à HuH7 não serão demonstrados em gráficos. Não houve variação significativamente estatística entre as diferentes concentrações da mistura de AGs utilizadas (200 μ M a 800 μ M) durante 24 horas na presença de AGs. A variação estatística se mostra presente apenas no cultivo desta linhagem em 48 horas na presença da mistura de AGs (**p<0,005 para 800 μ M; *p<0,05 para 600 μ M; **p<0,005 para 400 μ M e *p<0,05 para 200 μ M); entretanto, a porcentagem de células viáveis está acima de 75%, não sendo indicativo de alta citotoxicidade. Tal fato demonstra que a adição dos AGs não é citotóxica para essa linhagem celular que responde de maneira positiva com a adição dos mesmos.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular da linhagem HepG2 estão demonstrados na Figura 6. Com esses resultados observa-se que as concentrações mais altas da mistura de AGs (800 μM e 600 μM) apresentaram maior citotoxicidade no cocultivo, tanto em 24 horas e em 48 horas de presença de AGs (** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$, respectivamente em 24 h) e (** $p < 0,0005$ para ambos em 48 h). As concentrações de 400 μM e 200 μM foram bem toleradas nesse tipo de cultura. A linhagem HepG2 cultivada isoladamente e por um intervalo de 24 horas na presença da mistura de AGs não apresentou diferença estatística entre as diversas concentrações de AGs. Entretanto, ao ser cultivada por um intervalo de 48 horas na presença da mistura de AGs, as maiores concentrações (800 μM e 600 μM) apresentaram uma maior toxicidade à célula (** $p < 0,0005$ e ** $p < 0,005$, respectivamente). Paralelamente, as análises de citotoxicidade na linhagem de células estreladas hepáticas LX-2, não induziram diferenças estatísticas significativas entre as diversas concentrações quando as células foram cultivadas por 24 horas na presença da mistura de AGs. Porém, como visto nas outras culturas celulares, ao cultivar as células por 48 horas na presença da mistura de AGs, as maiores concentrações de AGs apresentaram grande toxicidade (** $p < 0,0005$). Assim sendo, as concentrações de 800 μM e 600 μM foram descartadas do estudo por apresentarem alta citotoxicidade, principalmente com a linhagem LX-2, onde menos de 50% das células estavam viáveis.

Figura 6. Ensaio de viabilidade celular. A) Células cultivadas na presença de AGs por um intervalo de 24 horas. B) Células cultivadas na presença de AGs por um intervalo de 48 horas. Gráficos do cocultivo HepG2+LX-2; HepG2 isolada e LX-2 isolada, apresentados respectivamente. Células cultivadas em 10% de SBF (controle), 800 μ M, 600 μ M, 400 μ M e 200 μ M de AGs. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** p <0,0005, ** p <0,005 e * p <0,05 em comparação com o controle.



Ao buscar na literatura o efeito dos ácidos oleico e palmítico, observa-se que podem ser utilizados como fonte de energia celular. Corroborando isso, Schlich *et al.* (2015) e Meng *et al.* (2018) demonstraram que 100 μ M e 200 μ M de ácido oleico pode agir como um estimulante da proliferação de células musculares lisas humanas e de células epiteliais mamárias de rato (SCHLICH *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2018). Dessa forma, a concentração de 200 μ M foi descartada para evitar que fosse utilizada uma condição em que os AGs adicionados fossem aplicados apenas como fonte de energia. Considerando que a melhor concentração de AGs seria a que possibilitaria a manifestação de uma condição pró-esteatótica e que mostrasse uma boa porcentagem de células viáveis, a concentração escolhida foi a de 400 μ M.

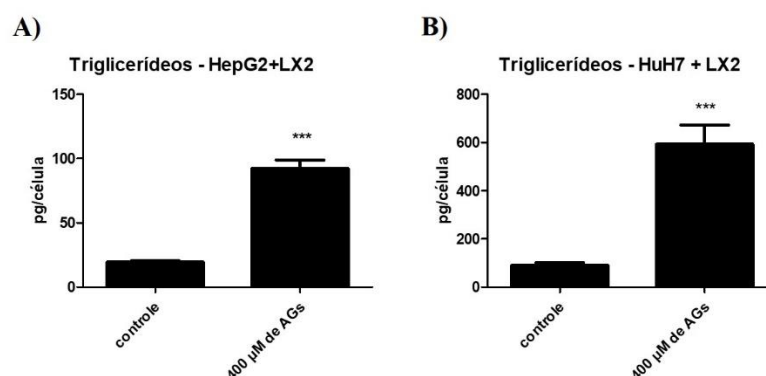
Após escolhida a concentração ideal da mistura de AGs, foi dada continuidade nas análises lipídicas utilizando o modelo experimental 1, descrito no item 3.1 – Materiais e Métodos (Figura 4). Inicialmente, este modelo foi utilizado pois buscamos avaliar a

funcionalidade do microRNA-1914-5p como um possível agente terapêutico e para isso a transfecção após a indução do quadro pró-esteatótico foi realizada.

4.2 Análises lipídicas das linhagens hepáticas.

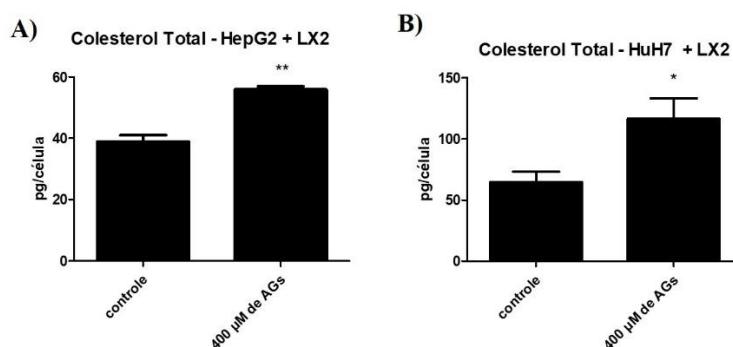
Considerando-se que uma das características comuns do estabelecimento do quadro pró-esteatótico se correlaciona com o aumento de triacilgliceróis e colesterol, essas análises foram realizadas em nossas culturas celulares. Com essas análises pode-se certificar de que os hepatócitos estavam acumulando lipídeos e o modelo estava sendo bem-sucedido. Essas análises foram realizadas para os dois grupos de células em cocultivo como apresentado nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Ensaio enzimático colorimétrico de triglicerídeos. A) Células HepG2+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. B) Células HuH7+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



Observa-se na Figura 7 que ambas as culturas celulares tiveram um aumento significativo (*** $p < 0,0005$) no acúmulo de triglicerídeos. A cocultura HepG2+LX-2 apresentou um aumento de triglicerídeos de aproximadamente 4,7 vezes em comparação com a célula controle. Por sua vez, a cocultura HuH7+LX-2 apresentou um aumento de aproximadamente 6,5 vezes, ao compararmos a célula cultivada com a mistura de AGs com a célula controle.

Figura 8. Ensaio enzimático colorimétrico de colesterol total. A) Células HepG2+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. B) Células HuH7+LX-2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



No gráfico acima se observa que ambas as células tiveram um aumento significativo no colesterol total ao serem cultivadas na presença dos AGs. O cocultivo de HepG2+LX-2 apresentou um aumento de aproximadamente 1,4 vezes (** $p < 0,005$), por sua vez, a cocultura de HuH7+LX-2 apresentou um aumento de aproximadamente 1,8 vezes (* $p < 0,05$).

Os resultados das análises lipídicas para ambos os cocultivos nos mostram que as células HuH7+LX-2 apresentam níveis altos de triglicérides e colesterol total na condição de controle, em comparação com HepG2+LX-2 controle. Isso poderia indicar que o cocultivo de HuH7+LX2 nesta condição já estaria saturado de lipídeos, podendo ser menos sensível à modulação dos ácidos graxos adicionados no meio celular.

4.3 Análise de expressão gênica das linhagens hepáticas.

Para se avaliar melhor os aspectos moleculares correlatos ao metabolismo de lipídeos nas coculturas em estudo e incubadas com as misturas de AGs, investigou-se a modulação da expressão dos níveis transcricionais de alguns elementos centrais desse metabolismo, utilizando-se para isso de reações qPCR, normalizadas para o gene de referência β -actina. Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio do software *Primer 3 Plus* (<https://primer3plus.com/>) (Quadro 1). É certo que alguns desses elementos possuem

sequências que são possíveis alvos de interação com o miRNA-1914-5p como avaliado em bancos de dados tais como miRDB, miRBase e Target Scan, para se avaliar aspectos sistêmicos da incubação com os AGs nos modelos celulares. As Figuras 9 e 10 apresentam esses resultados para ambas as coculturas submetidas a indução do quadro pró-esteatótico por um intervalo de 24 h e/ ou 48 h.

Figura 9. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *ppar γ* , *ppar α* e *srebp1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

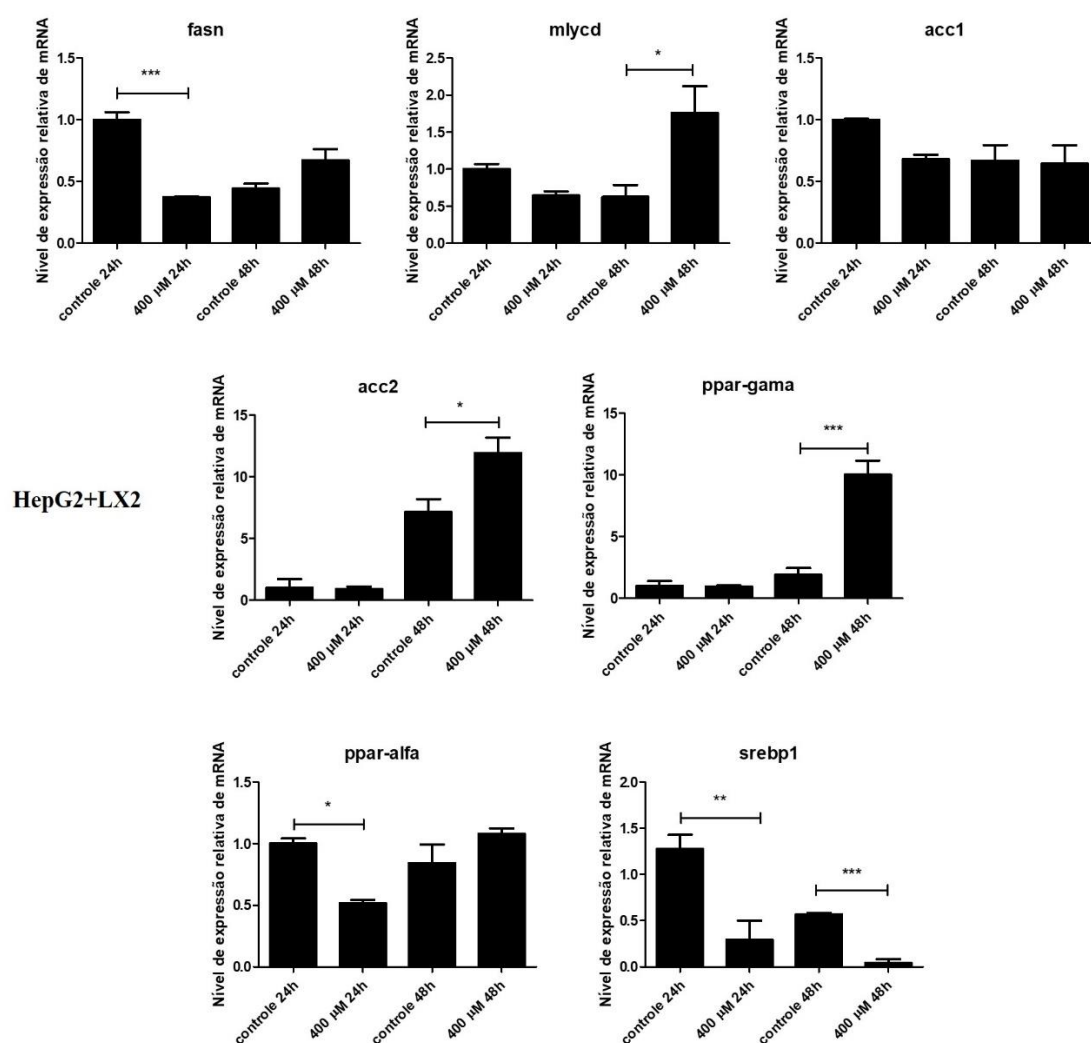
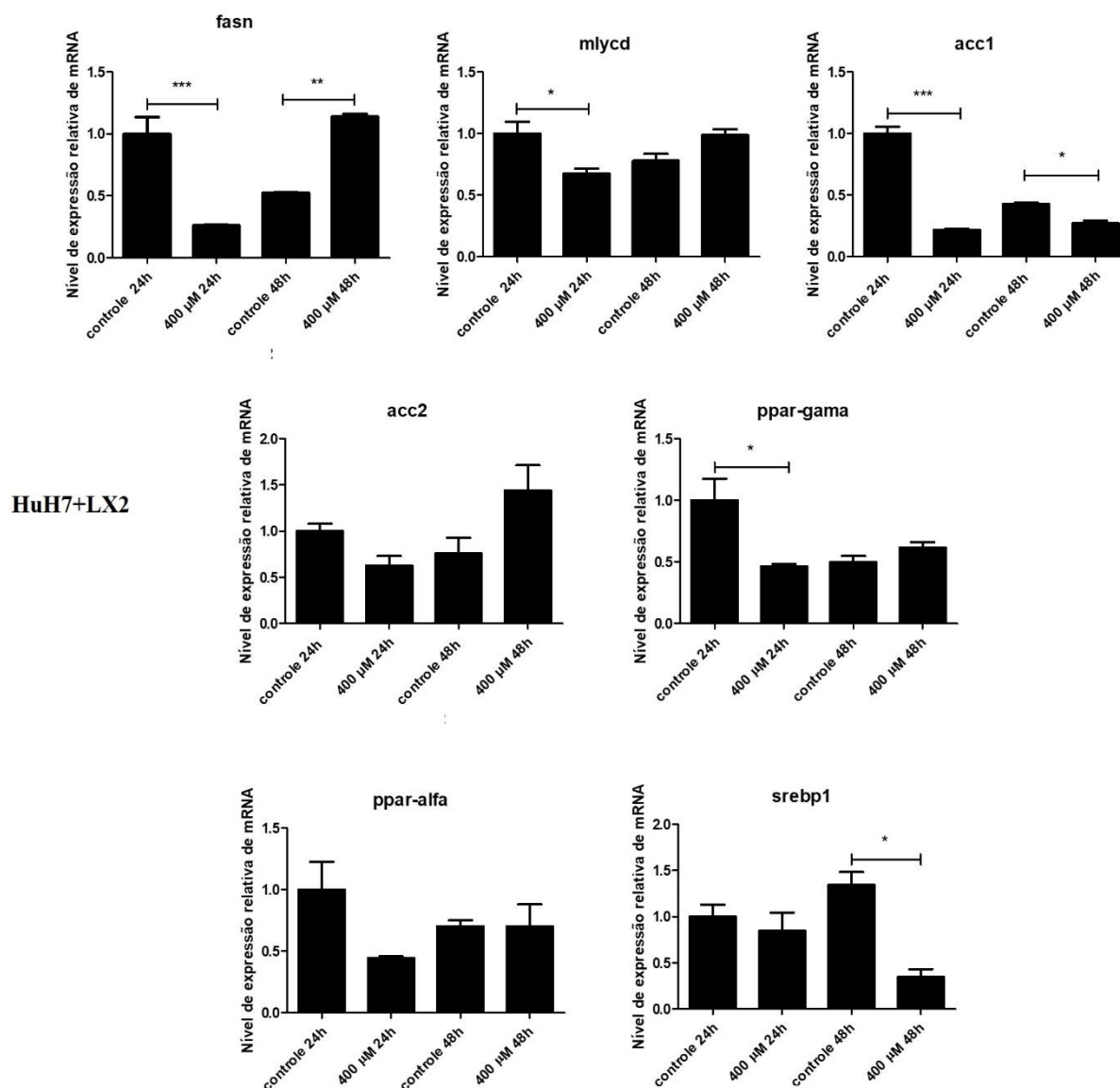


Figura 10. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *ppary*, *ppar α* e *srebp1*. Células HuH7+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle) e a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs. Todas as condições foram realizadas seguindo o modelo experimental 1.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



Ao comparar a modulação do nível transcricional de *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *ppary*, *ppar α* e *srebp1* entre os dois cocultivos em 24 h e 48 h, é possível observar que as culturas de HepG2+LX2 apresentaram respostas mais acentuadas na expressão dos fatores de transcrição, *ppary*, *ppar α* e *srebp1*, o que poderia sugerir uma melhor resposta metabólica ao quadro pró-esteatótico. Comparando-se o conjunto dos resultados são observadas particularidades metabólicas nas diferentes linhagens e concordam com resultados apresentados em Gunn *et al.*

(2017). As duas linhagens, HepG2 e HuH7 são frequentemente usadas em estudos relacionados à metabolismo (GUO *et al.*, 2010; GREEN *et al.*, 2015) e são células que se assemelham a hepatócitos fetais, sendo consideradas pouco diferenciadas (GUNN *et al.*, 2017) o que favorece seu uso em modelos *in vitro* para o estudo de metabolismo hepático (MEEX *et al.*, 2010; GREEN *et al.*, 2015). Em nosso estudo, buscamos um modelo que metabolize gorduras e que viabilize o estudo funcional da atuação do miRNA-1914-5p. Além disso, também demonstrado por Gunn e colaboradores (2017), a linhagem HepG2 possui uma mutação no gene *pnpla3* (fosfolipase patatina-como proteína contendo o domínio 3), resultando na proteína I148M PNPLA3, a qual possui uma modificação em sua função. Dessa forma, essa linhagem celular está mais suscetível ao acúmulo de ácidos graxos poliinsaturados e a menor secreção de apolipoproteína B (ApoB) (GUNN *et al.*, 2017). Considerando que a linhagem HepG2 é uma célula em plena utilização em estudos em nosso laboratório, apresenta vantagens igualitárias as da outra linhagem celular e aceita de maneira satisfatória as condições de cultivo propostas, ela foi escolhida como o hepatócito utilizado no modelo pró-esteatótico.

4.4 Padronização das concentrações de moléculas mímicas e inibidoras do miRNA-1914-5p no modelo experimental.

Após a escolha da célula que seria utilizada em nosso modelo experimental, foi necessária a padronização da concentração de microRNA a ser utilizada nos ensaios subsequentes. Para isso, as células foram cultivadas seguindo a metodologia proposta no modelo experimental 1 (Figura 4). Elas foram transfectadas com diferentes concentrações de moléculas mímicas e inibidoras do microRNA-1914-5p (10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM e 50 nM) e, em seguida, submetidas à condição de pró-esteatose pela incubação com os AGs. Posteriormente, as células foram coletadas, processadas e utilizadas em análises de mensuração de expressão do nível transcricional através de ensaios de qPCR. Os resultados seguem nas Figuras 11 e 12.

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

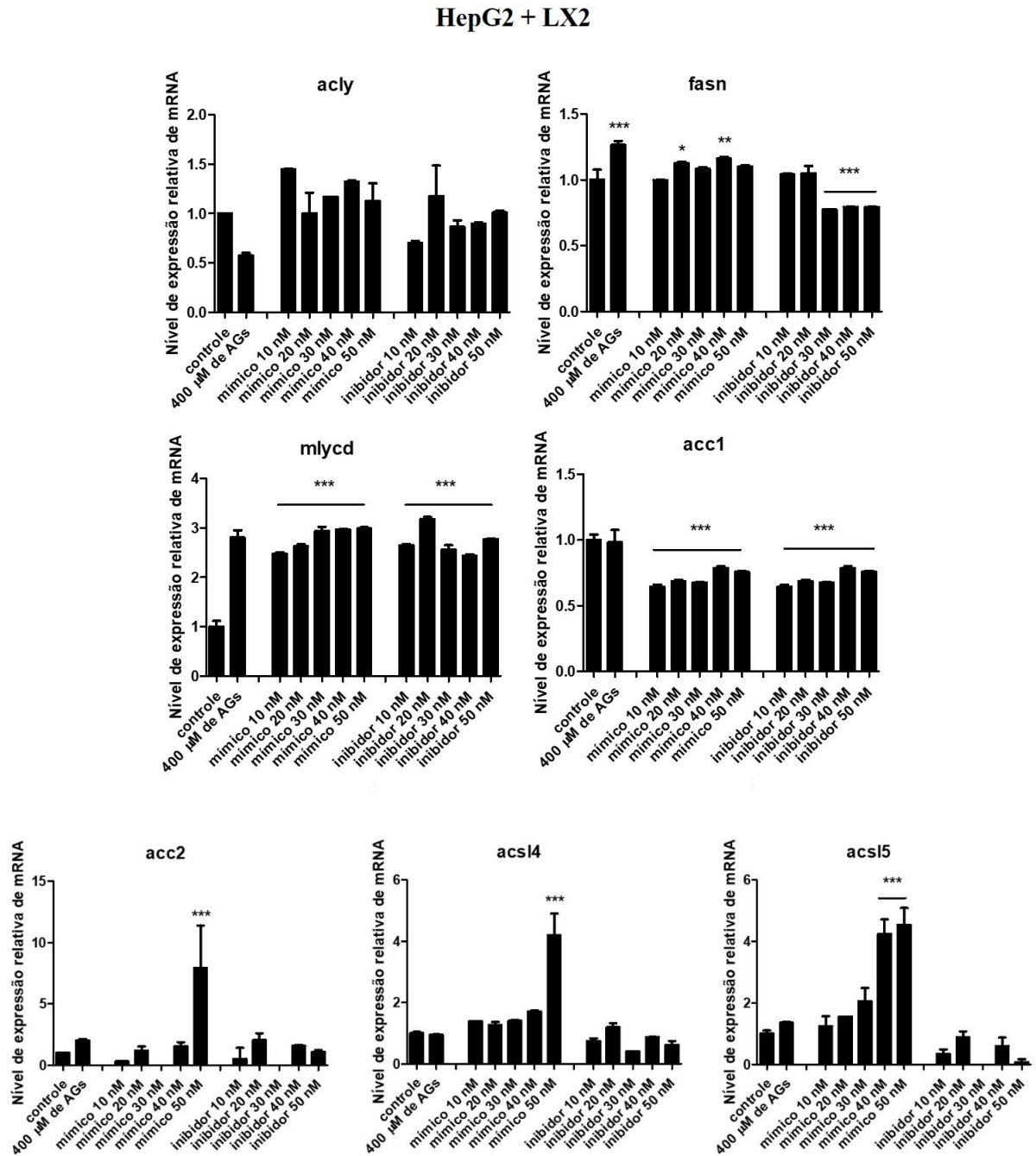
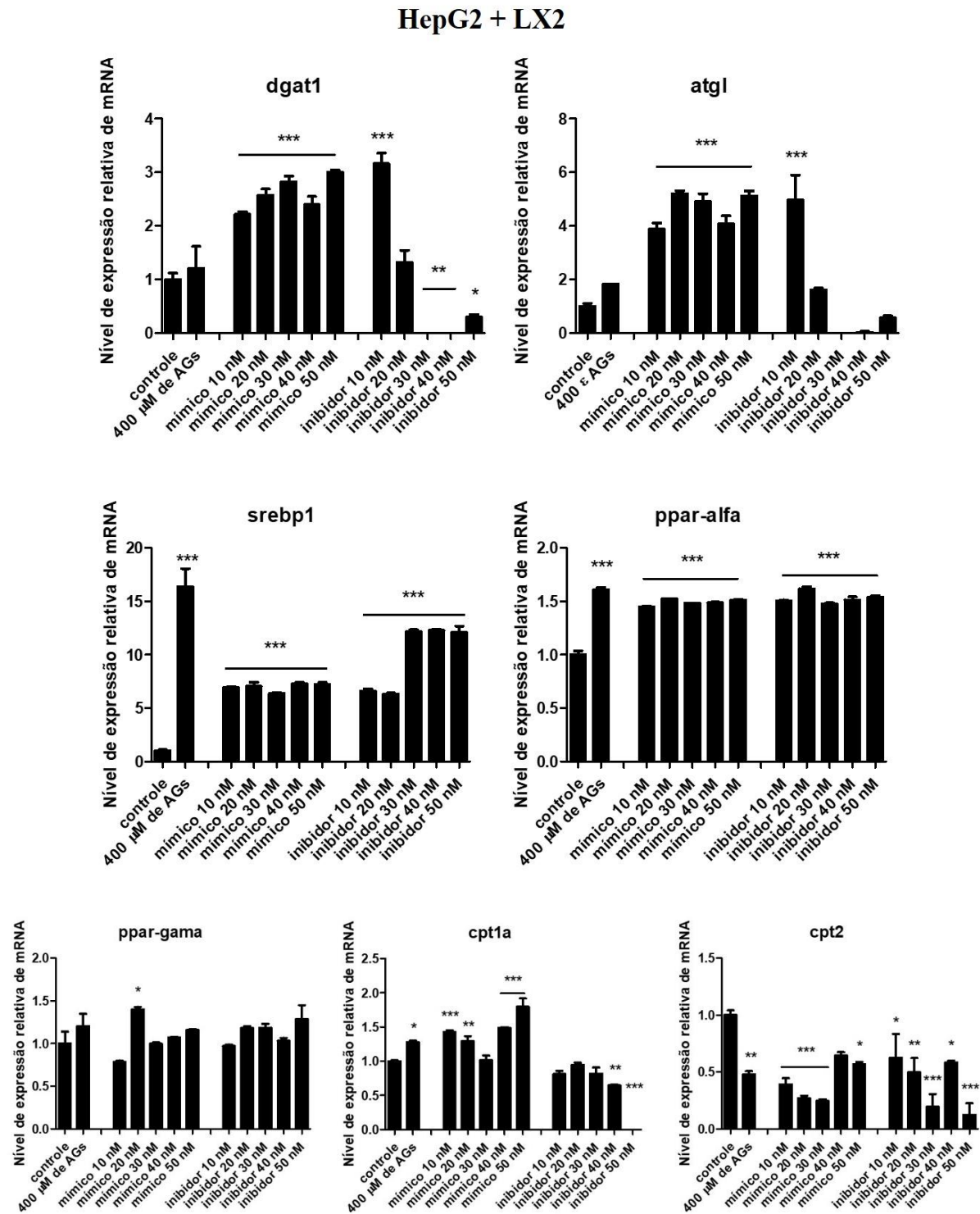


Figura 12. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1*, *atgl*, *srebp1*, *ppar α* , *ppar γ* , *cpt1a* e *cpt2*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a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



A análise dos resultados demonstra que os níveis transcricionais dos genes apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de moléculas mímicas e inibidoras utilizadas nas transfecções e o controle celular (10% SBF na legenda). Ao compararem-se os resultados é possível identificar que genes principais do metabolismo lipídico não apresentaram diferenças estatísticas entre si nas condições investigadas, o que gerou questionamentos sobre o delineamento do modelo experimental utilizado. A transfecção realizada no modelo experimental 1 ocorreu após a adição da mistura de AGs nas células, assim sendo, os lipossomos contendo as moléculas mímicas e inibidoras poderiam estar sendo sequestrados pela alta concentração de AGs presentes no meio celular.

Assim, baseado nos resultados não satisfatórios obtidos com o modelo experimental 1, o modelo experimental 2 passou a ser investigado (Figura 5). Nesse modelo, a transfecção é realizada antes da adição da mistura de AGs, o que favorece a transfecção e possibilita o estudo funcional do microRNA. A utilização desse modelo experimental é corroborada por Ding e colaboradores (2015), pois nesse estudo foi analisada a funcionalidade do miRNA-34a na regulação da esteatose e a metodologia utilizada foi a transfecção antes da adição de AGs. Nas Figuras 13, 14, 15 e 16 é possível observar os níveis transcricionais dos genes no modelo experimental 2.

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

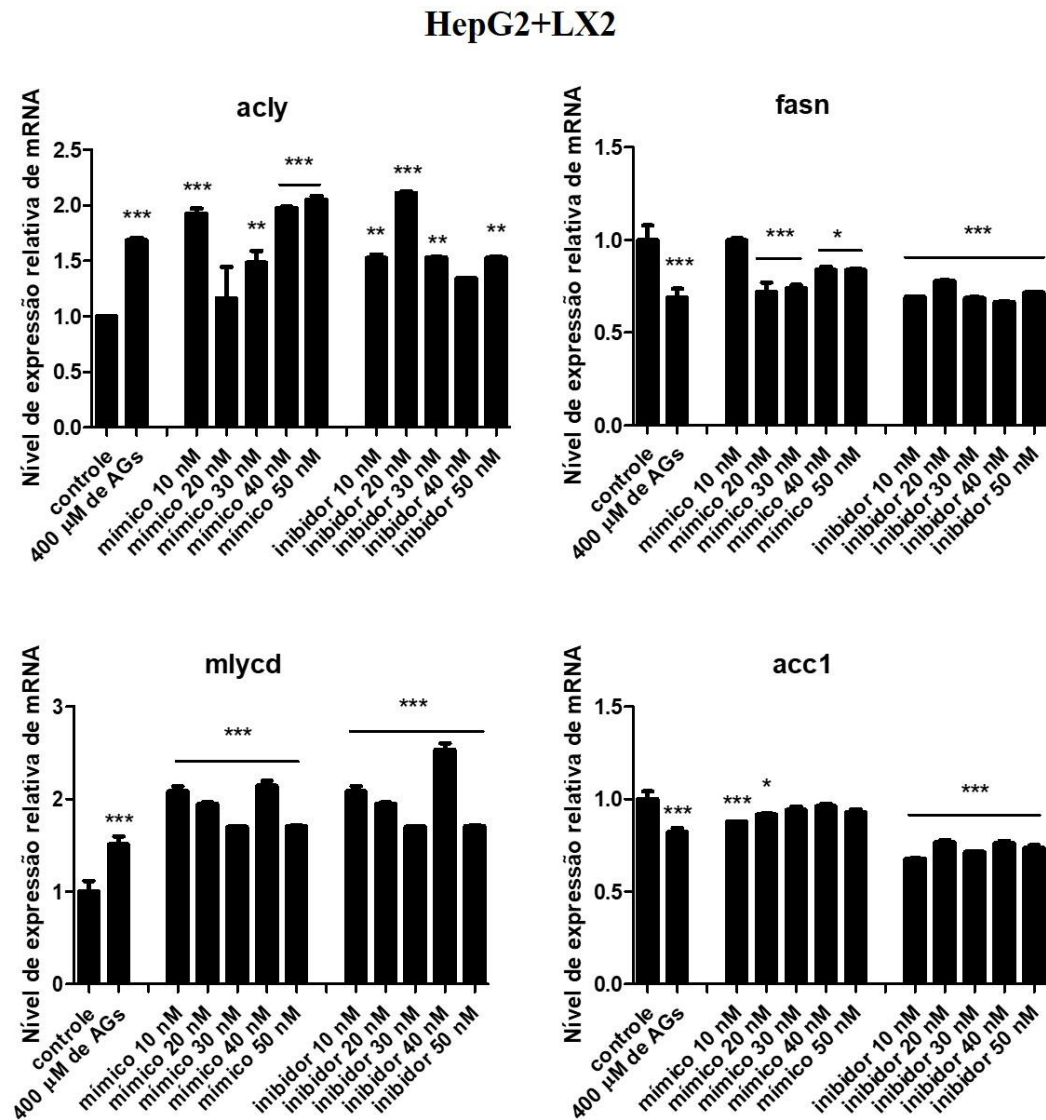
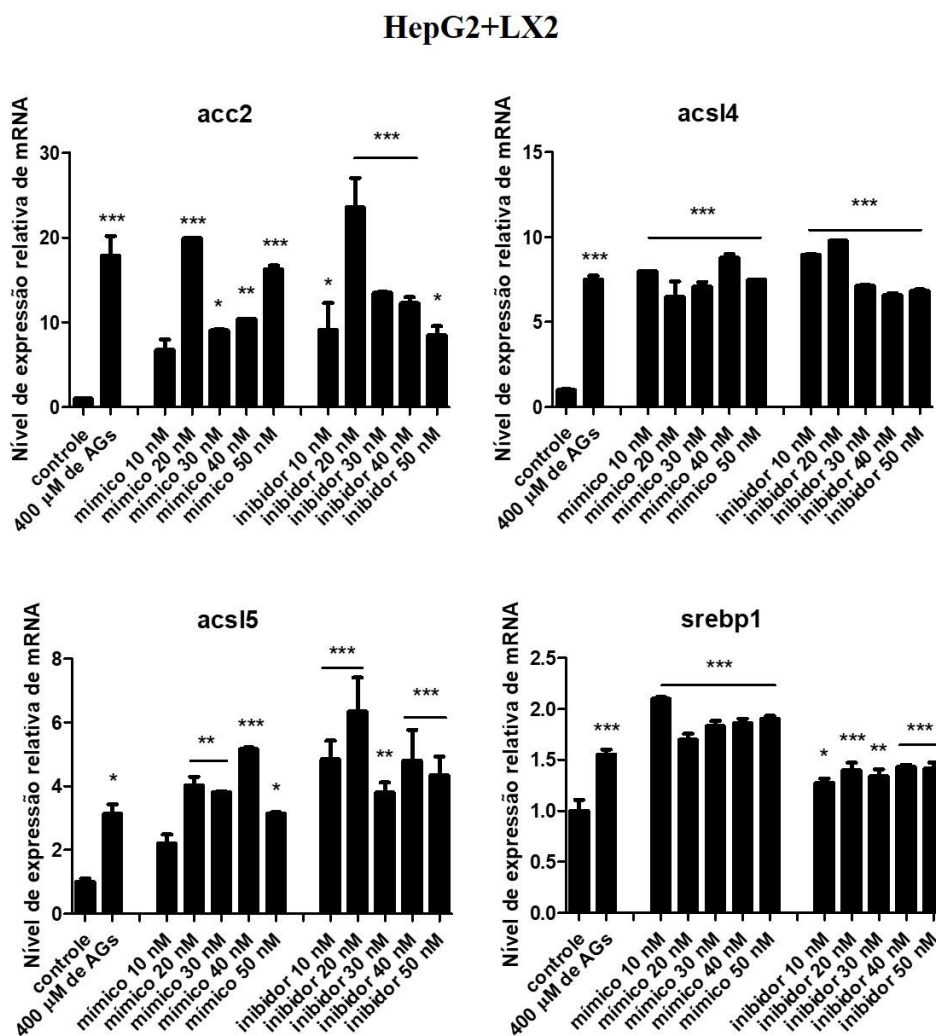


Figura 14. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acc2*, *acsl4*, *acsl5* e *srebp1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo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



Como é possível observar no gráfico, *acly* apresenta uma modulação diferenciada entre as concentrações de microRNA utilizadas, sendo que apenas as condições de mímico 20 nM e inibidor 40 nM não apresentaram diferenças significativas em comparação com o controle. *ACLY* é uma enzima responsável pela conexão entre o metabolismo de ácidos graxos e o de carboidratos, assim sendo, é uma enzima chave neste estudo (FENG *et al.*, 2019). Em seguida, vemos que *fasn* tem uma diminuição no seu nível de expressão em comparação com o controle. Essa diminuição não ocorre apenas nas células transfectadas com 10 nM de mímico. Por sua vez, *mlycd*, responsável pela conversão de malonil-CoA em acetil-CoA se apresenta com um

aumento significativo em todas as condições em comparação com o controle. Seguindo a via metabólica, temos *acc1* e *acc2*, responsáveis pela transformação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, no gráfico de *acc1* é possível observar que houve uma diminuição significativamente estatística em algumas condições de cultivo, sendo que as condições de mímico 20 nM, 30 nM e 40 nM não apresentaram diferenças em relação ao controle. No gráfico de *acc2* é possível observar que os níveis de expressão transcricional também são regulados de maneira diferente entre todas as condições de cultivo. Indicando, nesse caso, uma possível regulação diferencial da β -oxidação. Em seguida, se observa um aumento significativamente estatístico nos níveis transcripcionais de *acsl4* em todas as condições de cultivo, assim como em *acsl5*. Por sua vez, é possível observar no gráfico de *srebp1* o aumento significativo das condições de cultivo em relação com o controle, porém, esse aumento é diferencial em algumas condições.

Além da via metabólica da síntese *de novo* apresentada acima, também foram analisados a expressão transcricional de alguns genes envolvidos no empacotamento de gotículas lipídicas (*dgat1* e *dgat2*), na degradação dessas gotículas (*atgl* – lipase triglicerídica adiposa), outros fatores de transcrição importantes no metabolismo lipídico (*ppara* e *ppar γ*), um gene responsável pela dessaturação dos ácidos graxos (*scd1*) e genes da β -oxidação (*cpt1a* e *cpt2*).

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

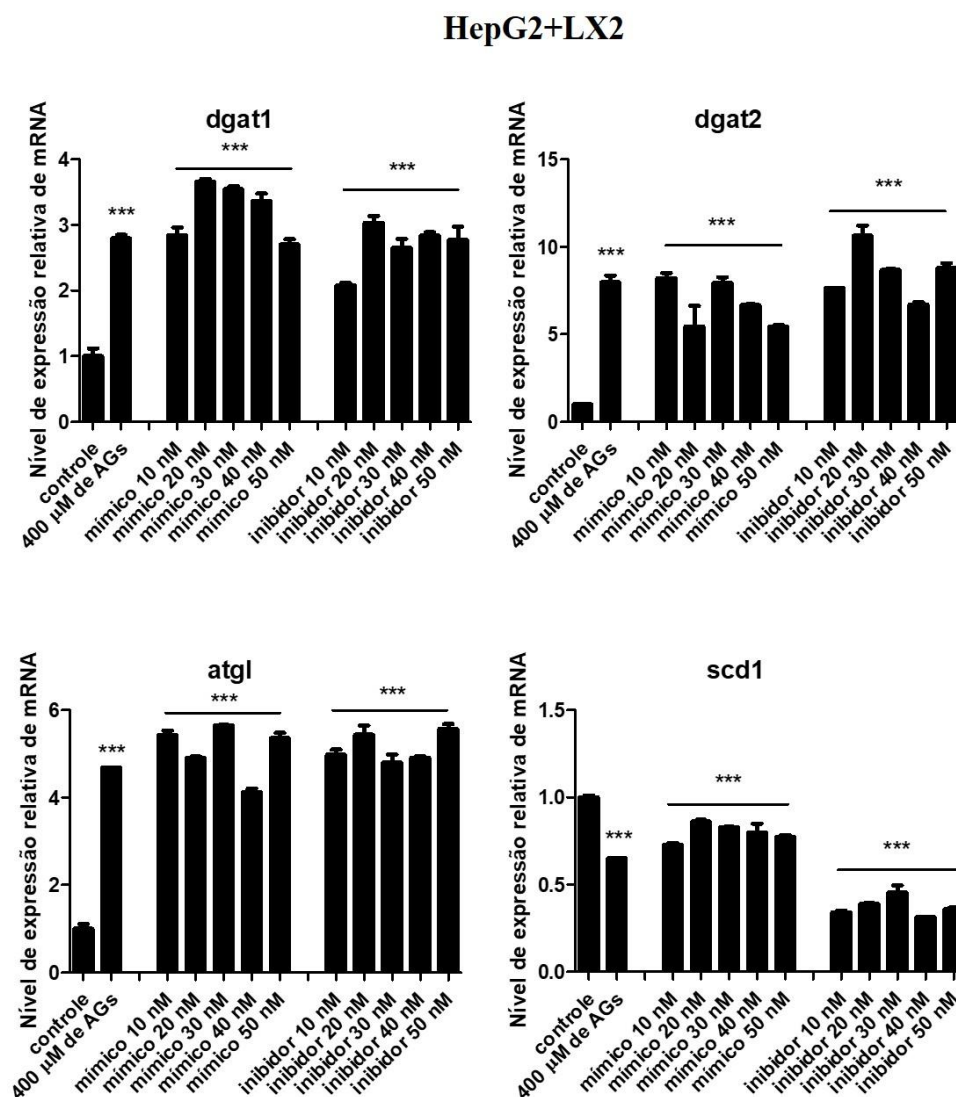
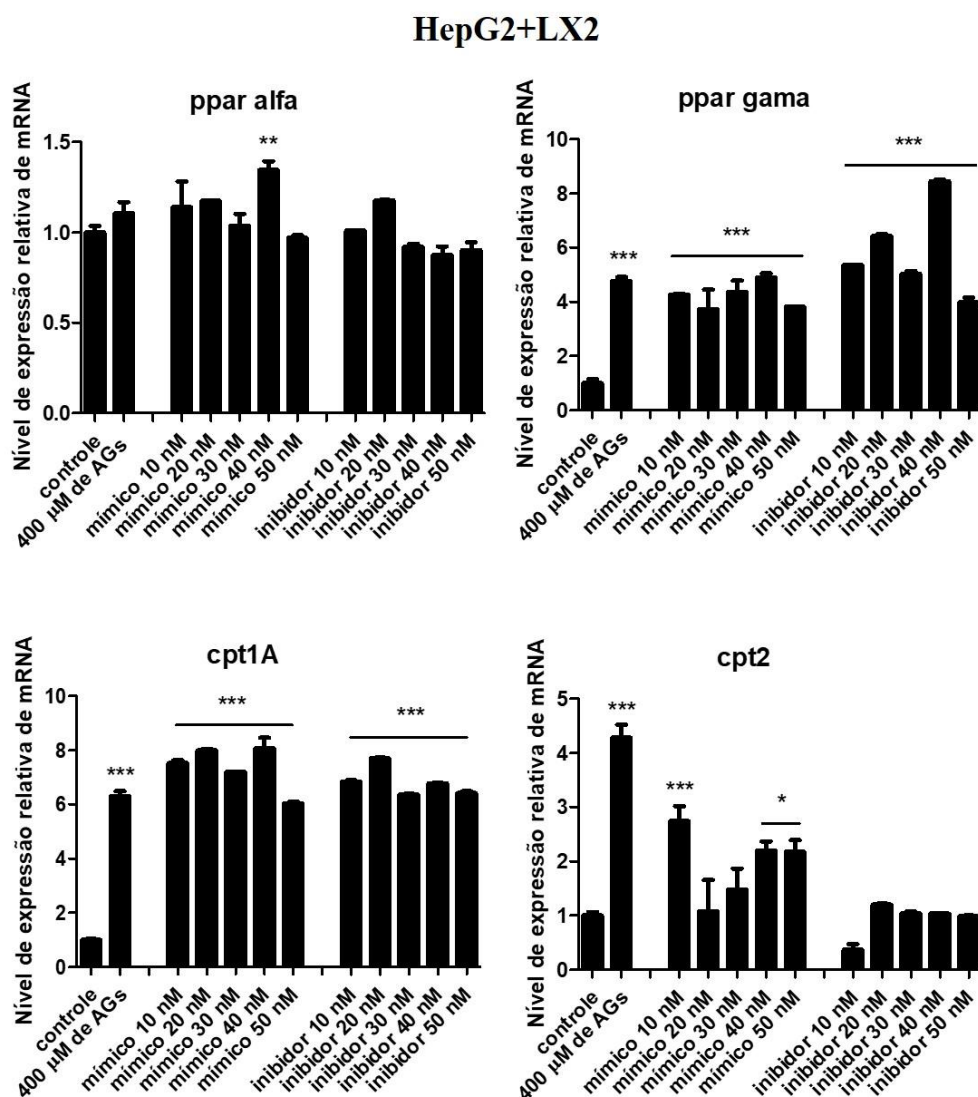


Figura 16. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *ppar α* , *ppar γ* , *cpt1a* e *cpt2*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico (10 a 50 nM) e com o inibidor (10 a 50 nM) do miRNA-1914-5p seguindo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

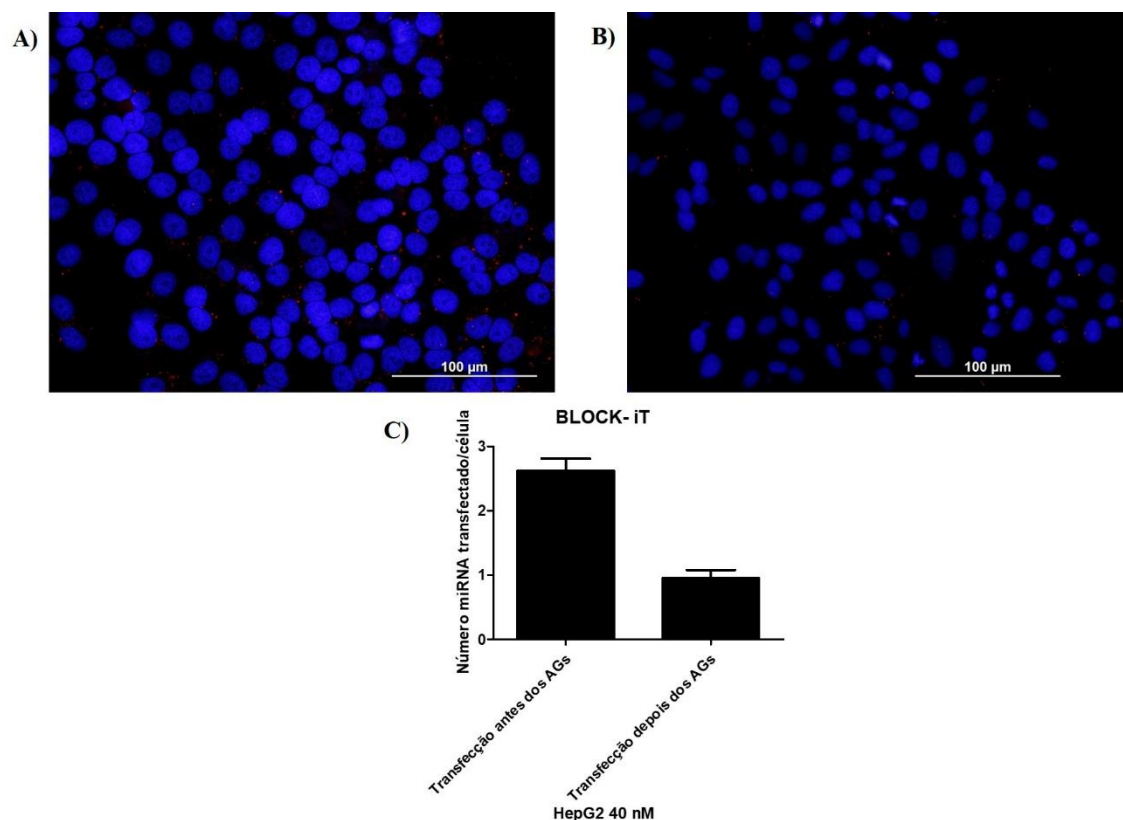


Os genes relacionados com o empacotamento de gotículas lipídicas (*dgat1* e *dgat2*), apresentam níveis transcricionais elevados em comparação com o controle em todas as outras condições de cultivo. De mesma forma, os níveis transcricionais também se apresentam de maneira elevada em *atgl*, sugerindo que a célula possa estar tentando atingir a homeostase celular. O mesmo padrão de gráfico é observado com os níveis transcricionais de *scd1* e *ppar γ* . Por sua vez, *ppar α* apresenta uma diferença estatisticamente significativa apenas na condição

de cultivo com o mímico de 40 nM em comparação com o controle. O gráfico de *cpt1a*, um dos genes relacionados com a β -oxidação, apresenta níveis transcricionais elevados em todas as condições de cultivo em comparação com o controle. Por sua vez, *cpt2* apresenta um aumento dos níveis transcricionais apenas nas células cultivadas com a mistura de AGs, mímico 10 nM, mímico 40 nM e 50 nM.

Para confirmar a eficiência da transfecção nos dois modelos experimentais delineados foram realizadas microscopia de fluorescência com a utilização do *BLOCK-iT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Control*. Além disso, esse ensaio ajudou a elucidar se o modelo experimental estava correspondendo aos resultados esperados. Por ser um RNA duplex ligado ao fluoróforo *Alexa Fluor®555*, é possível observar em microscopia de fluorescência a eficiência da transfecção celular. Os resultados dessa análise (Figura 17) mostraram que as células transfectadas antes da adição da mistura de AGs (modelo experimental 2) tiveram uma eficiência de transfecção aproximadamente 2,76 vezes maior em comparação com as células transfectadas após a adição da mistura de AGs (modelo experimental 1). Esse resultado indica que a presença da mistura de ácidos oleico e palmítico em meio de cultivo realmente pode estar dificultando a entrada do microRNA na célula pelo excesso lipídico. Assim sendo, a escolha do modelo experimental 2 se mostrou correta para a análise funcional do miRNA. Após a modificação no modelo experimental, as análises lipídicas foram realizadas novamente pela aluna Thaís Porto Barbosa e os resultados não são mostrados, pois se encontram no trabalho da mesma aluna.

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



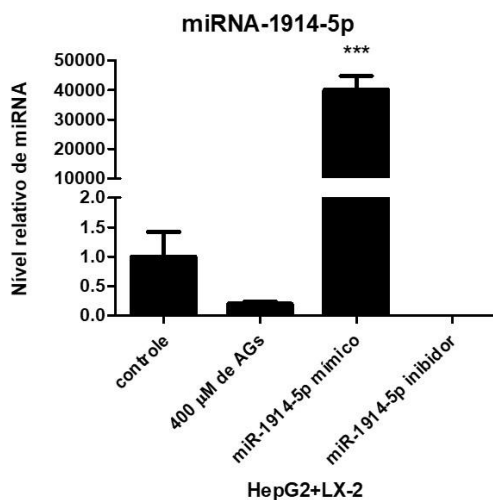
Após a confirmação da eficiência do modelo experimental, os resultados das análises de expressão dos níveis transcricionais do modelo experimental 2 foram investigados de forma mais detalhada. Além das análises realizadas com *post-test* de Dunnett em comparação com o controle experimental, também foram realizadas análises com *post-test* de Tukey, para se comparar as diversas condições de cultivo entre si. As análises comparativas dos resultados das culturas transfectadas e incubadas com AG subsequentemente, com as culturas não transfectadas e também incubadas com a mistura de AGs foi realizada para desconsiderarmos os efeitos dos AGs na expressão dos genes. Além disso, análises estatísticas mais específicas foram realizadas separando-se todas as condições em blocos de concentração. Por exemplo, o mímico 10 nM e o inibidor 10 nM foram analisados separadamente em comparação com o controle e as células cultivadas com a mistura de AGs e assim sucessivamente para todas as

condições. Isso foi realizado para que as diferenças estatísticas não fossem mascaradas pelos níveis transcricionais de outras concentrações. Essas análises resultaram em apenas duas concentrações de miRNA finais: mímico e inibidor 30 nM e 40 nM. Em seguida, uma análise mais detalhada dos resultados dessas duas concentrações apontou que as células transfectadas com 30 nM de mímico e inibidor apresentaram diferenças estatísticas significativas apenas em 7 dos 16 genes em comparação com as células cultivadas com a adição dos AGs. Por sua vez, as células transfectadas com 40 nM de mímico e de inibidor apresentam uma diferença estatística com as células cultivadas com AGs em 9 dos 16 genes analisados. Essas diferenças de modulação nos níveis de expressão dos genes investigados frente as transfecções com as diferentes concentrações de miRNA, nos apontaram como promissora a utilização da concentração de 40 nM do mímico e de inibidor do miRNA-1914-5p em nossos ensaios. Reforçando essas análises, a concentração de 40 nM das moléculas mímicas e de inibidoras do microRNA-1914-5p é também utilizada em nosso laboratório em outro modelo experimental (SILVEIRA, 2019), o que corroborou a escolha dessa concentração.

4.5 Análise da atuação funcional do miRNA-1914-5p no modelo celular.

Após o estabelecimento do melhor modelo celular e da melhor concentração de microRNA utilizada, validamos os níveis dos efeitos das moléculas mímicas e inibidoras nas culturas celulares transfectadas através da mensuração dos níveis do miRNA-1914-5p (Figura 18).

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



Na Figura 18 é possível observar a confirmação dos níveis do miRNA-1914-5p nos diferentes grupos celulares. As células cultivadas em meio com 10% de SBF e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p obtiveram um nível relativo bem superior às células controle e cultivadas com a adição de AGs. Por sua vez, as células transfectadas com o inibidor do miRNA-1914-5p apresentaram um nível relativo do miRNA-1914-5p bem inferior às células controle e cultivadas com a adição de AGs.

As Figuras 19, 20 e 21 apresentam as análises mais detalhadas das células cultivadas utilizando-se o modelo experimental 2 e a concentração de 40 nM de moléculas mímicas e inibidoras do microRNA-1914-5p.

Figura 19. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2* e *acs14*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

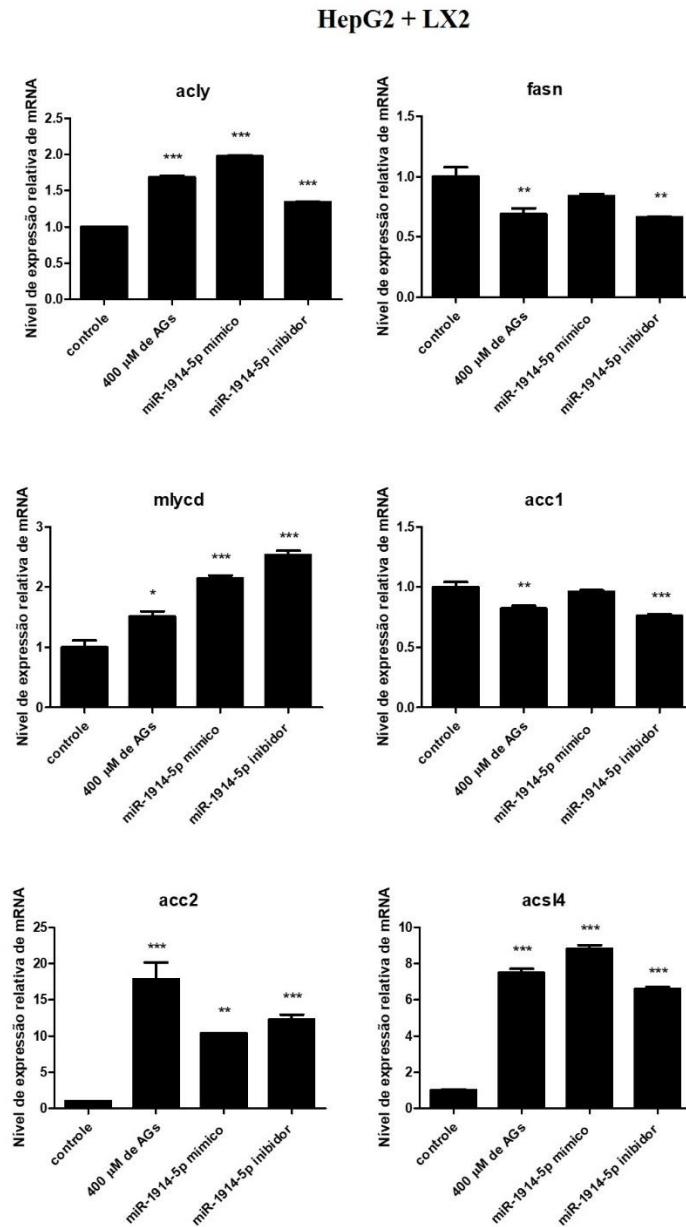


Figura 20. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *dgat1*, *atgl*, *gpat1* e *scd1*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo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

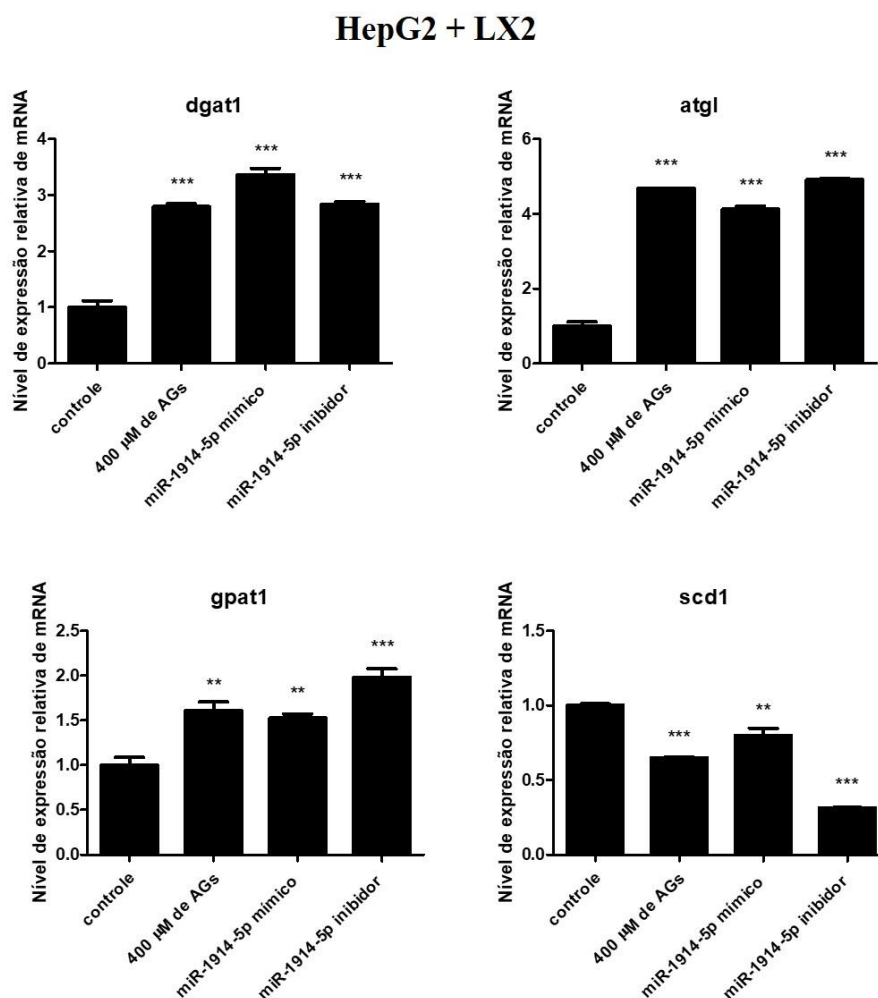
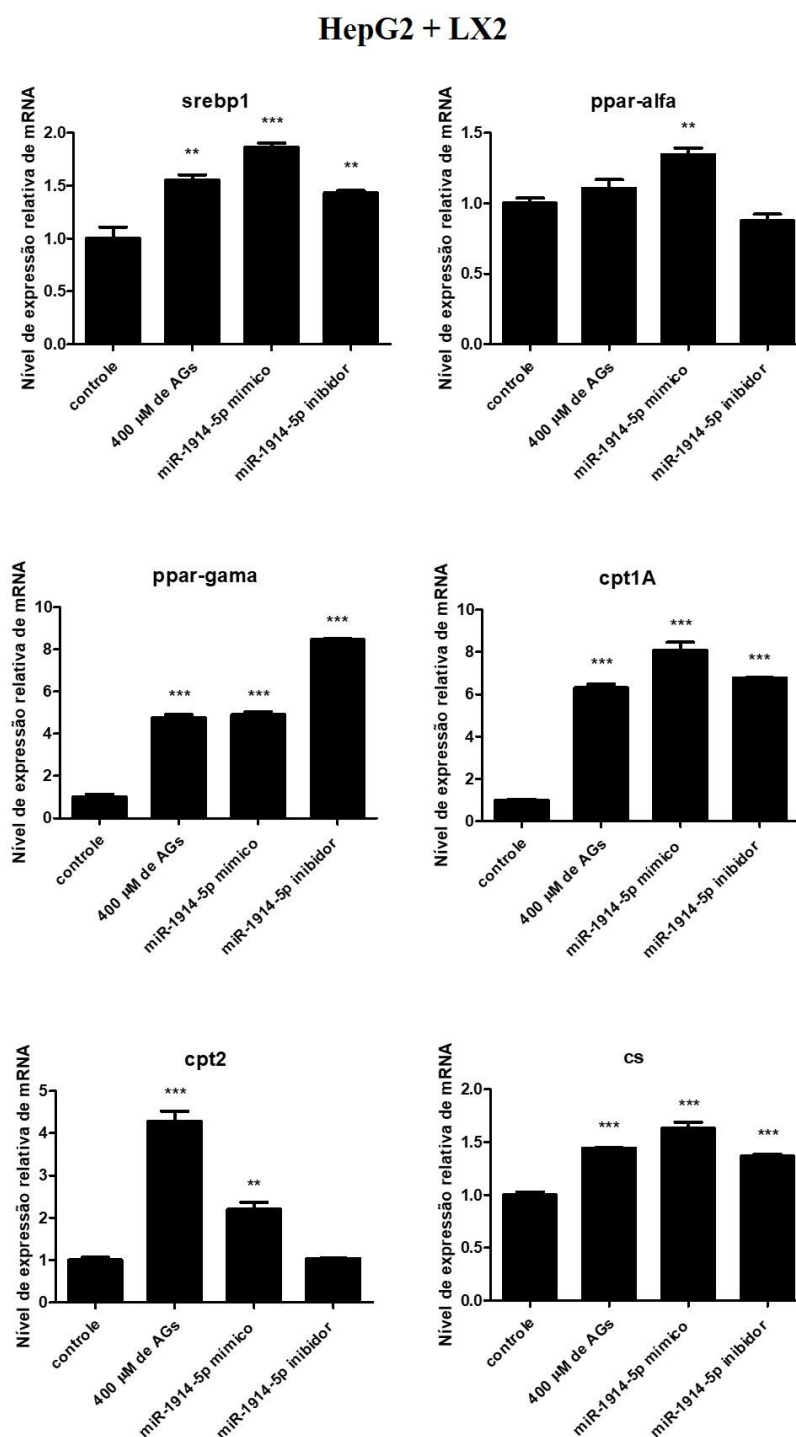


Figura 21. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *srebp1*, *ppara*, *ppary*, *cpt1a*, *cpt2* e *cs*. Células HepG2+LX2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



Os resultados apresentados nas Figuras 19, 20 e 21 apontam que as moléculas mímicas e inibidoras modulam a expressão dos genes, alterando seus níveis transcricionais. Esses genes

foram estudados por apresentarem funções importantes no metabolismo lipídico. Entre eles temos genes envolvidos no início da síntese *de novo* (*acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2* e *acsl4*), genes envolvidos na formação de gotículas lipídicas (*gpat1* e *dgat1*), genes envolvidos na dessaturação de ácidos graxos (*scd1*), genes que atuam como importantes fatores de transcrição lipídicos (*srebp1*, *ppara* e *ppary*) e genes envolvidos com a degradação de lipídeos, sendo a degradação de gotículas lipídicas (*atgl*) e a β -oxidação (*cpt1a*, *cpt2* e *cs*). Assim sendo, o aumento da expressão de *acly* nas células cultivadas com a mistura de AGs e nas células transfectadas com o mímico do miRNA em estudo, pode indicar uma alta atividade mitocondrial, sugerindo que uma alta quantidade de citrato está presente no citoplasma. Isso é observado também no nível de expressão de *cs*, que indica um alto número mitocondrial nessas duas condições de cultivo. Entretanto, a diminuição de *acly* na condição de transfecção com o inibidor, pode indicar que a célula está tentando diminuir seu metabolismo lipídico para encontrar a homeostase celular. Como descrito por Feng e colaboradores (2019), pacientes obesos com resistência à insulina, apresentam altos níveis de expressão gênica de *acly* e *srebp1c* em seu jejuno. Nesse caso, a diminuição de *acly* poderia estar sendo benéfica ao metabolismo celular como um todo. A diminuição de *fasn* nesse modelo experimental é esperada em metabolismos normais, pois a célula pode estar obtendo os ácidos graxos necessários direto do meio de cultivo. O aumento do nível de expressão de *mlycd* nas células transfectadas com o inibidor do miRNA, sugere que a célula está diminuindo a quantidade de malonil-CoA e sugerindo um aumento na quantidade de acetil-CoA. Essa observação é reforçada pela diminuição do nível de expressão de *acc1* na mesma condição de cultivo. O acetil-CoA é uma molécula importante pois pode promover reações bioquímicas chaves como a síntese de ácidos graxos, a síntese de colesterol e acetilcolina e a acetilação de proteínas como as histonas (FENG *et al.*, 2019). Nesse caso, o provável aumento de acetil-CoA pode estar sendo utilizado em outra via metabólica, considerando que a célula já está com alta presença de AGs no meio celular.

Em relação a análise dos genes empacotadores de lipídeos, os níveis de *gpat1* apresentaram aumento em seus níveis transcricionais nas células transfectadas com o inibidor do miRNA. Por sua vez, outros genes que atuam na regulação do metabolismo de lipídeos apresentados nas Figuras 20 e 21 (*scd1*, *srebp1* e *ppara*) são modulados pela presença das

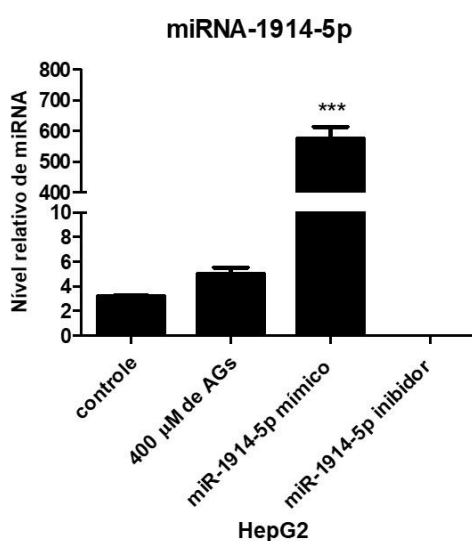
moléculas mímicas e inibidoras do miRNA em estudo ou por atuação sistêmica dessas moléculas, ou por mecanismos de RNA de interferência, considerando-se que vários dos mRNAs das moléculas investigadas possuem putativos sítios de interação ao miRNA-1914-5p. Assim sendo, o modelo pró-esteatótico foi estabelecido e os ensaios subsequentes de análise funcional foram realizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO II – Análises celulares e moleculares da pró-esteatose na linhagem celular HepG2.

5.1 Análises preliminares dos efeitos funcionais do miRNA: mensuração dos níveis do miRNA-1914-5p em células HepG2.

Após a padronização do modelo pró-esteatótico a ser utilizado nas análises subsequentes [modelo experimental 2 (Figura 5)], seguiram-se com as análises funcionais do microRNA-1914-5p na linhagem celular HepG2. Assim as transfecções foram realizadas se utilizando 40 nM de moléculas mímicas e inibidoras do microRNA antes da adição da mistura de AGs, na concentração de 400 μ M (ácido oleico + ácido palmítico - 2:1). A primeira análise realizada foi a de mensuração dos níveis do miRNA-1914-5p nos diferentes grupos celulares investigados para confirmação que as moléculas mímicas e inibidoras entraram corretamente no meio celular e realizaram suas funções esperadas de, respectivamente, aumentar a quantidade de miRNA disponível e diminuir a quantidade de miRNA endógeno (Figura 22).

Figura 22. Níveis relativos do miRNA-1914-5p em células HepG2 cultivadas com 10% SBF (controle), cultivadas em 400 μ M de AGs e transfectadas com 40 nM de moléculas mímicas do miRNA-1914-5p e 40 nM de moléculas inibidoras do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



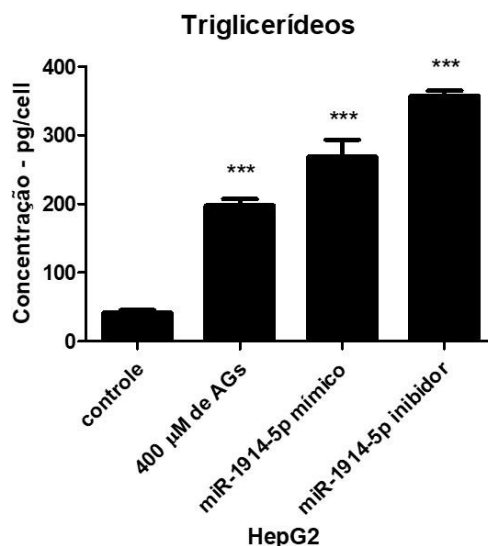
De acordo com a Figura 22 é possível observar que com a transfecção, o aumento dos níveis relativos do miRNA e a inibição do mesmo foram validadas.

5.2 Análise do perfil lipídico.

5.2.1 Análise do perfil lipídico: mensuração de triacilgliceróis e colesterol total.

Um fator importante no desenvolvimento da esteatose hepática é a dislipidemia, que surge como um aumento de triglicérides e colesterol total (CHEN *et al.*, 2019a). Essa dislipidemia pode ser classificada em três tipos: uma hipertrigliceridemia isolada, uma hipercolesterolemia isolada e uma hiperlipidemia combinada (CSONKA *et al.*, 2017). Dentro do hepatócito, os ácidos graxos são esterificados em glicerol-3-fosfato e colesterol para originarem, respectivamente, os triacilgliceróis ou ésteres de colesterol. Esses lipídeos neutros podem ser armazenados no fígado na forma de gotículas lipídicas ou podem ser secretados por partículas VLDL. Em fígados saudáveis, o armazenamento ocupa menos que 5% do total de ácidos graxos presentes no órgão. Isso deve-se ao equilíbrio entre as taxas de absorção e de oxidação de ácidos graxos (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2017). Dessa forma, a análise de triacilgliceróis (Figura 23) demonstra que nas células onde ocorre a indução do processo pró-esteatótico com a mistura de AGs, há um aumento significativo ($***p < 0,0005$) de triacilgliceróis disponíveis no ambiente celular em comparação com o controle, indicando um aumento nas taxas de absorção de ácidos graxos e um desequilíbrio no metabolismo lipídico. Nas células cultivadas com a presença da mistura de AGs e transfectadas com o mímico ou com o inibidor do miRNA-1914-5p, houve aumento estatisticamente significativo ($***p < 0,0005$) em ambas as condições em comparação ao controle. Nesse caso, as células transfectadas com o mímico tiveram um aumento de aproximadamente 6,55 vezes, enquanto as células transfectadas com o inibidor apresentaram um aumento de 8,71 vezes aproximadamente em comparação estatística com o controle. Entretanto, ao comparar as três condições celulares cultivadas com o acréscimo dos AGs (*post-test* Tukey), observa-se que a condição de inibição do miRNA-1914-5p é a que apresenta o maior aumento significativo, de aproximadamente 1,81 vezes.

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

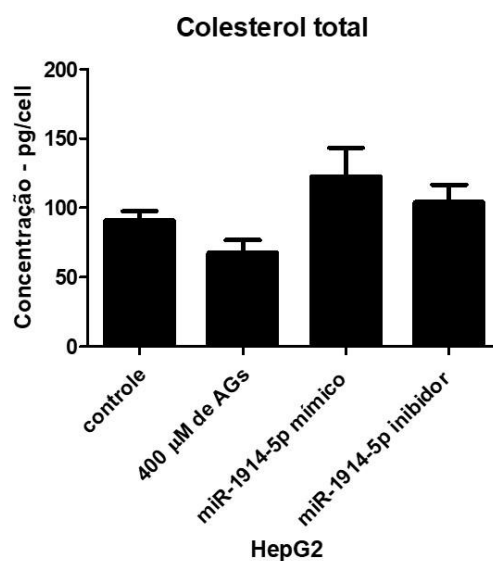


Para os vertebrados, o colesterol é um componente essencial da membrana plasmática celular, pois confere fluidez e permeabilidade para a célula. O colesterol entra na circulação através da absorção intestinal ou através da síntese *de novo* realizada pelo fígado. Os colesterolis livres podem ser armazenados no fígado na forma de éster de colesterol ou podem ser secretados pela circulação sanguínea através de moléculas de VLDL (SOZEN; OZER, 2017). O acúmulo de colesterol, também conhecido como hipercolesterolemia ou colesterol alto, acomete um grande número de adultos em países em desenvolvimento. Todavia, é uma das dislipidemias menos pesquisadas nos estudos clínicos (CSONKA *et al.*, 2017; SOZEN; OZER, 2017). Além de ser um fator chave para o desencadeamento da esteatose hepática, esse acúmulo também pode comprometer as funções cardíacas e outras vias metabólicas (SOZEN; OZER, 2017).

Na Figura 24, é possível observar os resultados obtidos com a mensuração do colesterol total em células controle, cultivadas com a mistura de AGs e transfectadas com o mímico e com o inibidor do microRNA-1914-5p. Todas as condições citadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Isso sugere que o quadro pró-esteatótico estabelecido na linhagem HepG2 possivelmente corresponda apenas a um quadro de hipertrigliceridemia. Segundo Ioannou (2016), a esteatose simples se desenvolve em resposta ao armazenamento de lipídeos que não causam lipotoxicidade, como os triglicerídeos. Entretanto, a piora do quadro

esteatótico pode ocorrer em resposta a moléculas lipotóxicas, como os ácidos graxos livres e o colesterol. Isso corrobora os resultados obtidos com as análises de colesterol total.

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

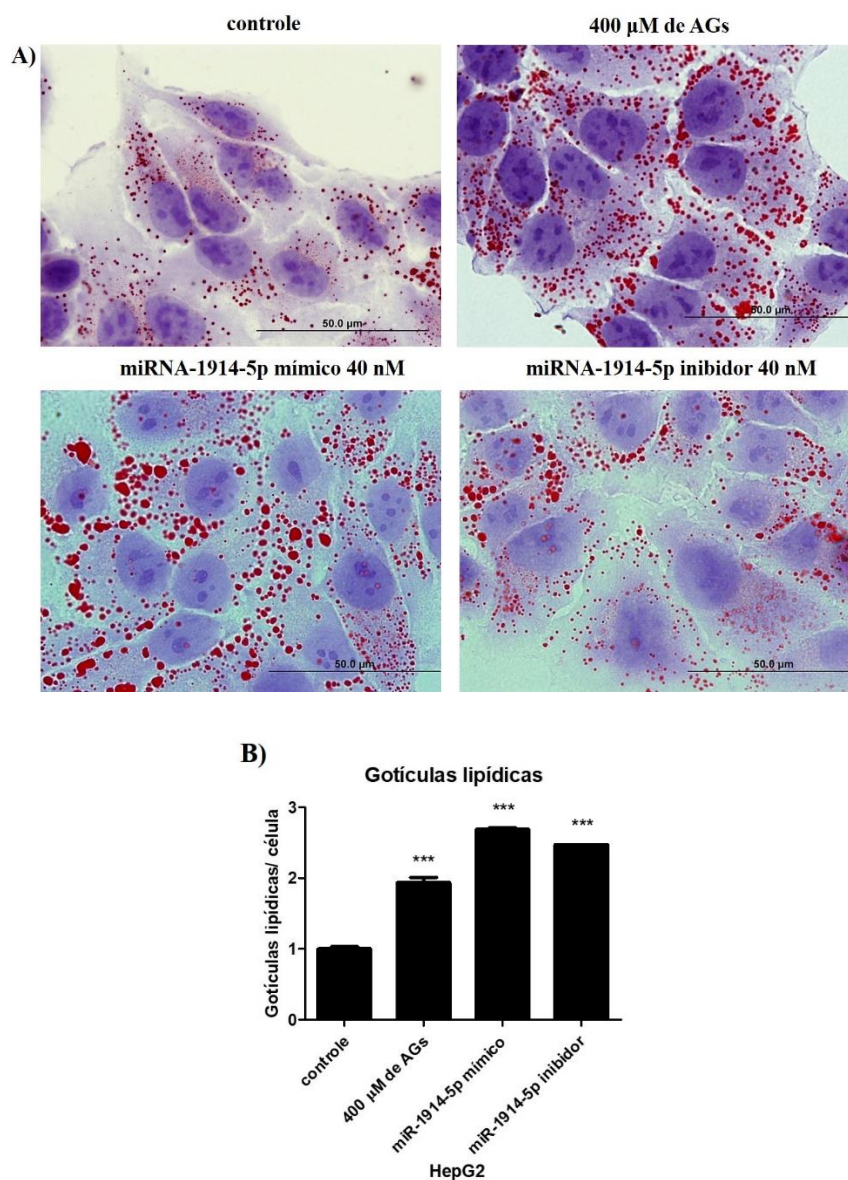


5.2.2 Análise do perfil lipídico: microscopia de campo claro com marcação de gotículas lipídicas por *Oil Red O*.

Como já descrito anteriormente, os triacilgliceróis e os ésteres de colesterol podem sofrer armazenamento em gotículas lipídicas dentro dos hepatócitos. Para analisar esse armazenamento, as gotículas lipídicas foram marcadas com *Oil Red O*, um corante lisocrômico, específico para lipídeos neutros. Na Figura 25 A é possível observar as gotículas lipídicas em vermelho e os núcleos celulares contra-corados com hematoxilina de Harris em roxo. Por sua vez, na Figura 25 B se observa a quantificação de gotículas lipídicas presentes nos hepatócitos. As três condições celulares cultivadas com a mistura de AGs na presença e/ ou ausência do mímico e do inibidor apresentaram um aumento significativo (** $p < 0,0005$) na quantidade de gotículas lipídicas em relação à condição controle. O aumento das gotículas lipídicas era esperado nas células cultivadas com a adição de AGs pela alta disponibilidade de ácido oleico e ácido palmítico no meio, o que poderia aumentar o armazenamento lipídico. Todavia, as

células cultivadas com a mistura de AGs e com a transfecção da molécula mimica do miRNA apresentaram uma diferença mais acentuada. Enquanto as células cultivadas com AGs apresentaram um aumento de aproximadamente 1,94 vezes em relação às células não incubadas com os AGs, as células transfectadas com o mimico aumentaram em aproximadamente 2,68 vezes em comparação com as células controle. Ao compararmos a condição de inibição do miRNA, é possível verificar que, apesar de também ter uma alta quantidade de gotículas lipídicas em comparação com o controle, as gotículas diminuem de quantidade quando comparadas com o mimico do miRNA (* $p < 0,05$ – *post-test* Tukey). Rohwedder *et al.* (2014) e Nakajima *et al.* (2019) demonstraram que a presença de ácido oleico e ácido palmítico tem um potencial indutor na acumulação de gotículas lipídicas em células de fibroblasto, linhagens celulares de hepatoma e astrócitos. Os resultados obtidos corroboram com esses estudos, também indicando que a presença de moléculas mímicas do miRNA-1914-5p poderiam levar a uma piora do quadro patológico com o acúmulo de triacilgliceróis (Figura 23) e consequentemente o aumento das gotículas lipídicas (Figura 25).

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



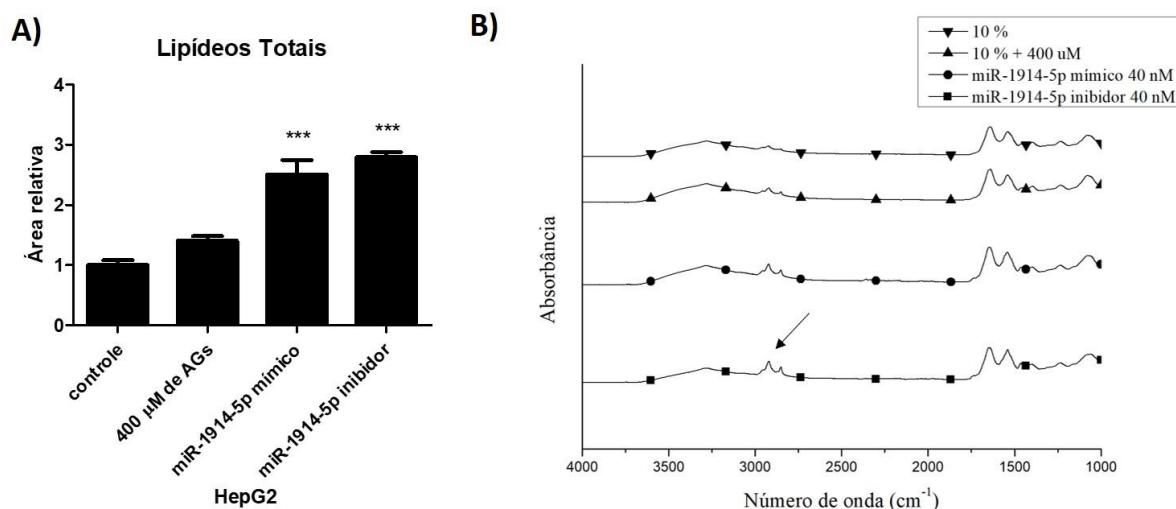
5.2.3 Análise de lipídeos totais através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Apesar da grande importância dos triglicerídeos e do colesterol como determinantes do desenvolvimento da esteatose hepática, estudos de lipidômica revelaram mudanças importantes

na variedade de outros tipos de lipídeos, incluindo os ácidos graxos, diacilgliceróis, ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico, fosfolipídeos e ceramidas (EISINGER *et al.*, 2014; SANYAL; PACANA, 2015; ALVES-BEZERRA; COHEN, 2017). Dessa forma, para complementar a análise lipídica, também foram realizados ensaios de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Essa técnica é baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Ao passar a radiação infravermelha pela amostra, é possível determinar qual fração da radiação é absorvida em uma energia particular, resultando em um espectro de absorbância. A energia na qual um pico de absorção aparece no espectro, corresponde à frequência de vibração de uma parte da amostra (STUART, 2004; SAKANE *et al.*, 2013). Desta forma, com a soma da área dos quatro picos de lipídeos, é possível observar qualitativamente a presença dos mesmos, em relação ao pico da amida II. Na Figura 26 A, observa-se que as células cultivadas com a presença de AGs não apresentaram uma diferença significativamente estatística de lipídeos totais em comparação com o controle. Entretanto, as condições com a presença de mímico e inibidor indicam um aumento significativo ($***p<0,0005$) de lipídeos totais em relação ao controle. As células transfectadas com o mímico do miRNA apresentaram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes e as células transfectadas com o inibidor do miRNA apresentaram um aumento de 2,8 vezes, aproximadamente, em relação ao cultivo controle.

Segundo Gorden e colaboradores (2015), a esteatohepatite apresenta aumento em 20 espécies lipídicas em comparação com a esteatose simples. Entre eles estão as fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, lisofosfatidilinositol, ceramidas e esfingosinas (GORDEN *et al.*, 2015). Assim sendo, o aumento de lipídeos totais observado nas células transfectadas pode ser indicativo de piora do quadro esteatótico. Entretanto, o aumento de alguns desses lipídeos também pode ocorrer pelo aumento na quantidade de células presentes. Dessa forma, para melhor elucidação da relação entre o aumento de lipídeos totais e o quadro esteatótico, análises de proliferação celular devem também ser realizadas.

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



5.2.4 Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

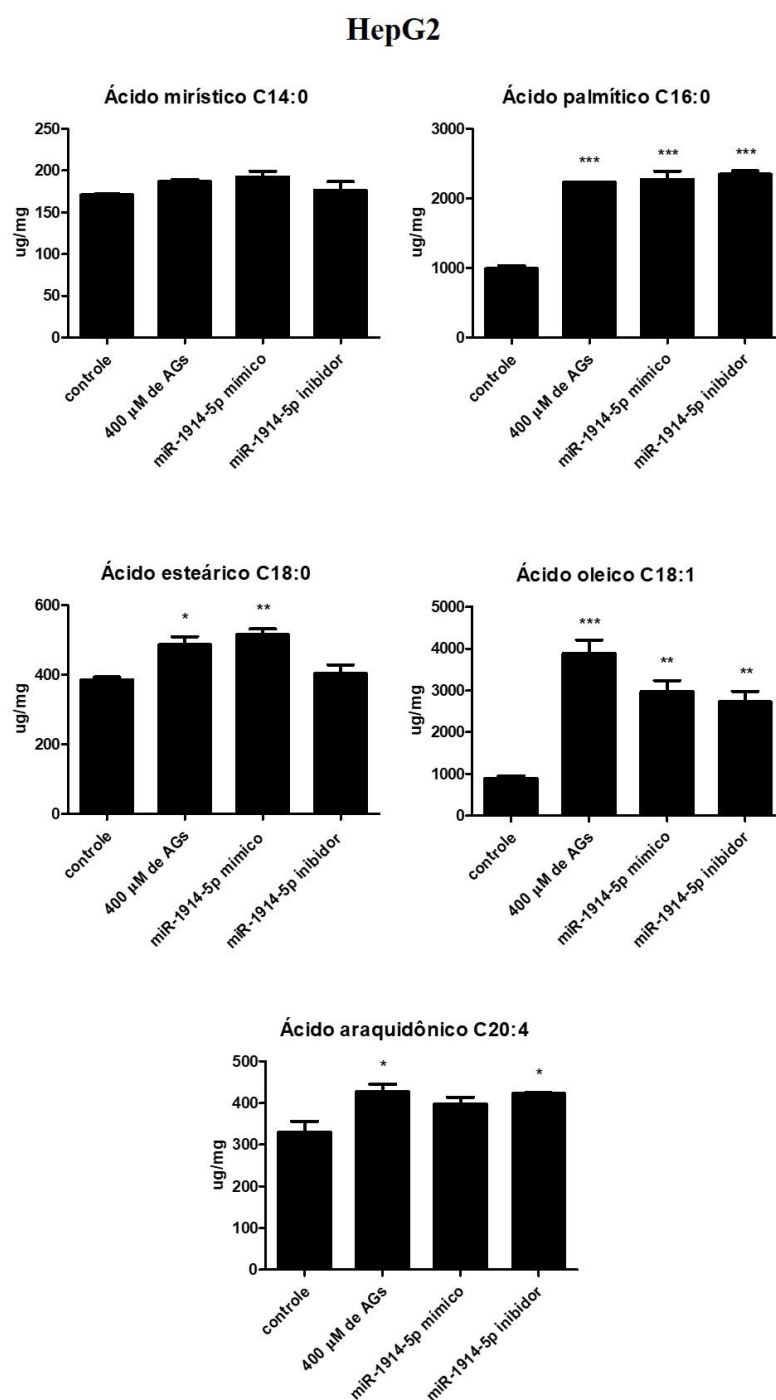
Além das análises de lipídeos totais com o ensaio de FT-IR, também foram realizadas análises de alguns ácidos graxos específicos com GC-MS. Essa técnica é muito utilizada para a quantificação de ácidos graxos por ser altamente sensível, eficiente e reprodutível (JAYASINGHE; DIAS, 2013). Na Figura 27 é possível observar os gráficos dos ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e araquidônico (C20:4). O ácido mirístico não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as condições de cultivo. Por sua vez, o ácido palmítico apresentou um aumento significativo (** $p < 0,0005$) em todas as condições cultivadas com a adição da mistura de AGs em relação ao controle celular. Esse resultado indica que a adição dos AGs no meio de cultivo, pode auxiliar na absorção de tais ácidos graxos pela célula. O ácido esteárico apresenta um aumento significativo apenas nas células cultivadas com a mistura de AGs (* $p < 0,05$) e nas células transfectadas com o mimico do miRNA (** $p < 0,005$) em comparação com o controle (10% SBF). De maneira

similar, o ácido oleico apresenta um aumento significativo nas culturas com a adição dos AGs (** $p < 0,0005$) e com a transfecção do có-mico ou do inibidor do miRNA (** $p < 0,005$) em relação ao controle celular. Segundo Killion e colaboradores (2018) o ácido oleico pode servir como substrato para a enzima ACSL5 na produção de acil-CoA graxo. Além disso, outras enzimas elongases podem utilizar esse ácido graxo para a produção de outros tipos lipídicos (PARK *et al.*, 2018). Dessa forma, a diminuição nos níveis de ácido oleico pode sugerir uma utilização do mesmo para a síntese de triglicerídeos ou para a produção de outros lipídeos. Os níveis de ácido araquidônico, por sua vez, apresentam um aumento significativo (* $p < 0,05$) nas células cultivadas com a adição da mistura de AGs e nas células transfectadas com o inibidor do miRNA-1914-5p. O ácido esteárico foi o único que apresentou diferença significativa entre as duas condições celulares transfectadas. Neste caso, a diminuição dos seus níveis nas células com a inibição do miRNA poderia indicar uma tentativa de homeostase lipídica. Entretanto, os resultados obtidos com a análise dos ácidos graxos pela cromatografia gasosa indicam que o aumento dos lipídeos totais e dos triglicerídeos apresentados nas células transfectadas com o có-mico e com o inibidor do miRNA podem não ser provenientes do aumento desses ácidos graxos analisados em específico.

Tabela 1. Quantificação de AGs. Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de mímico do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Valores representados em μ g de AG por mg de células e sua porcentagem correspondente nos AG totais. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

Ácido graxo	controle		400 μ M		mímico		inibidor	
	μ g/mg	%	μ g/mg	%	μ g/mg	%	μ g/mg	%
Ác. Mirístico	170,86	6,1	186,98	2,6	192,12	3	176,38	2,9
Ác. Palmítico	991,45	35,7	2.234,98	31	2.273,40	35,8	2.345,34	38,6
Ác. Esteárico	385,65	14	486,23	6,7	515,80	8,2	403,50	6,6
Ác. Oleico	893,46	32,2	3.879,82	53,7	2.972,45	46,8	2.724,67	44,9
Ác. Araquidônico	330,57	12	426,73	6	397,41	6,2	422,83	7
Total	2.771,99	100	7.214,74	100	6.351,18	100	6.072,72	100
			(***)		(***)		(***)	

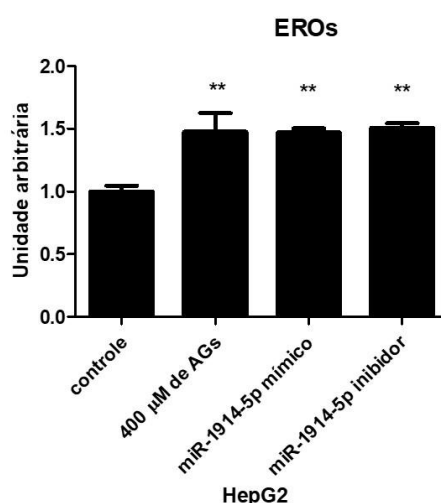
Figura 27. Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF (controle), 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de mimico do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor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



5.3 Análises de estresse oxidativo e de disfunção mitocondrial.

O acúmulo lipídico nas células pode ocasionar lipotoxicidade e levar a falência de algumas organelas importantes, ocasionando disfunção mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático (ASHRAF; SHEIKH, 2015; SPAHIS *et al.*, 2017; COBBINA; AKHLAGHI, 2017). A disfunção mitocondrial é responsável pela oxidação de ácidos graxos e consequentemente, pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O desbalanço entre a presença de EROs e de moléculas antioxidantes no ambiente celular pode levar ao estresse oxidativo (SPAHIS *et al.*, 2017; COBBINA; AKHLAGHI, 2017). Diversos estudos demonstraram a presença de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com NAFLD (NOBILI *et al.*, 2010; IRIE *et al.*, 2012; PIRGON *et al.*, 2013; ORE; AKINLOYE, 2019). Dessa forma, a análise de espécies reativas de oxigênio se mostrou importante no modelo experimental e os resultados são apresentados na Figura 28.

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

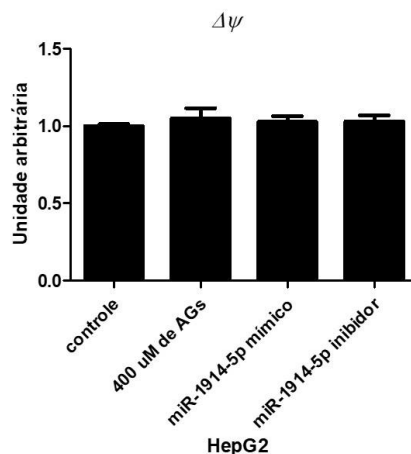


Na Figura 28, é possível observar que as células cultivadas com a adição da mistura de AGs e as células transfectadas com o mimico e com o inibidor do miRNA-1914-5p apresentaram um aumento significativo (** $p < 0,005$) em comparação com o controle celular.

Esse aumento é sugerido pela presença de ácidos graxos no meio de cultivo, os quais podem estar ocasionando uma moderada lipotoxicidade. Ao realizar a comparação entre as diversas condições de cultivo (*post-test* Tukey) é possível observar que não há diferenças estatísticas significativas, sugerindo que o miRNA-1914-5p pode não estar atuando de maneira direta no aumento ou redução do estresse oxidativo.

A principal fonte responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio é a mitocôndria. Entretanto, algumas reações enzimáticas ou não-enzimáticas que ocorrem no citoplasma também podem gerar EROs em menor quantidade (PARADIES *et al.*, 2014; LEE; PARK; ROH, 2019). Na maioria das vezes, a presença de EROs resulta na disfunção mitocondrial que inclui a indução de permeabilidade mitocondrial, modificando o potencial de membrana da organela. Um fosfolipídio encontrado na membrana mitocondrial interna, nomeado de cardiolipina, é sensível ao estresse oxidativo. A liberação de cardiolipina em conjunto com citocromo c para o citoplasma, pode desencadear a via de apoptose mediada por caspases (LEE; PARK; ROH, 2019). Dessa forma, a análise do potencial de membrana mitocondrial, possibilitou um melhor entendimento da produção de EROs e do desencadeamento de apoptose celular. Como é possível observar na Figura 29, as diferentes condições de cultivo não induziram alterações no potencial de membrana, entre si e entre o controle experimental - células cultivadas sem a presença da mistura de AGs. Esse resultado pode ser explicado pelo pouco tempo de cultivo celular, sendo que 72 h em cultura e 24 h na presença de AGs poderia não ser suficiente para um alto desequilíbrio mitocondrial. Dessa forma, sugere-se que as condições de cultivo não acarretam maiores danos à mitocôndria.

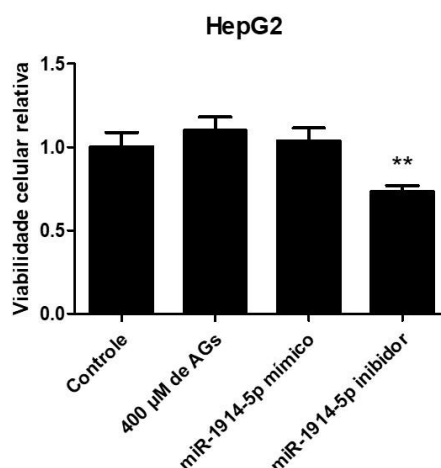
Figura 29. Análise de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). Células HepG2 cultivadas nas condições 10% de SBF, 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfecção com 40 nM de mimico do miRNA-1914-5p e transfecção com 40 nM de inibidor do miRNA-1914-5p. Os resultados foram submetidos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



5.4 Análise de viabilidade celular.

Considerando os resultados obtidos com as análises lipídicas, a viabilidade celular foi realizada para confirmarmos se a célula cultivada com aumento ou diminuição do miRNA-1914-5p apresentaria uma maior proliferação. Na Figura 30 observa-se que as células transfectadas com o inibidor do miRNA apresentaram uma diminuição na viabilidade celular em comparação com o controle experimental. De acordo com Han e Kaufman (2016) e Marra e Svegliati-Baroni (2017), a presença de lipídeos tóxicos, principalmente o palmitato, podem atuar na promoção de inflamação e principalmente no estresse do retículo endoplasmático. Esses dois mecanismos podem atuar ativando a apoptose celular (HAN; KAUFMAN, 2016; MARRA; SVEGLIATI-BARONI, 2017). Sendo assim, a inibição total do miRNA-1914-5p sugere que a célula fique mais suscetível a alterações inflamatórias podendo ser considerado maléfico para a célula pró-esteatótica, pois a mesma apresenta viabilidade celular reduzida.

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

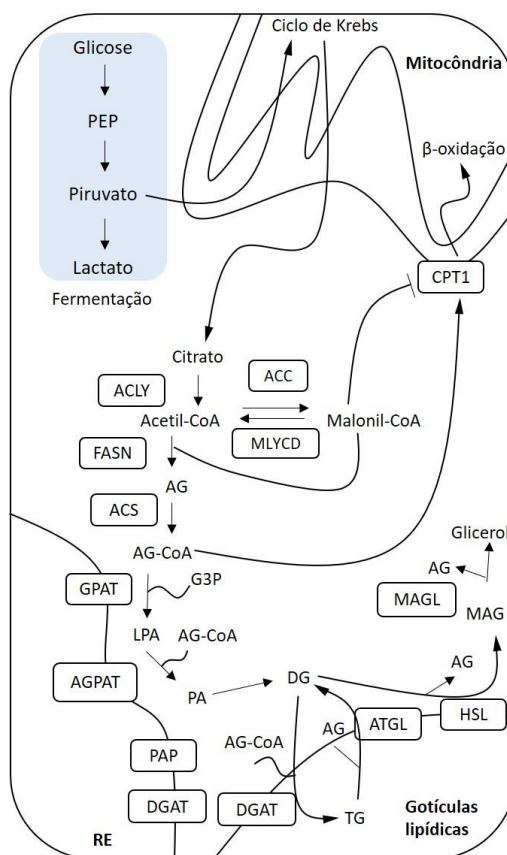


5.5 Análise dos níveis transcricionais de genes correlatos ao metabolismo lipídico.

Como já descrito anteriormente, o fígado obtém os ácidos graxos livres de três diferentes fontes: a absorção de ácidos graxos livres do sangue, a absorção de remanescentes de quilomícrons e/ ou da lipogênese *de novo* (CANBAY; BECHMANN; GERKEN, 2007; MASHEK, 2013; NASSIR *et al.*, 2015; PERLA *et al.*, 2017). O acúmulo de lipídeos no fígado ocorre pelo desequilíbrio entre a aquisição e a liberação lipídica, processos que são regulados pela absorção de lipídeos circulantes, lipogênese *de novo*, oxidação de ácidos graxos e a exportação de lipídeos em forma de VLDL (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Dessa forma, a seguir serão apresentados e discutidos os níveis transcricionais de genes responsáveis por diversas vias no metabolismo lipídico.

5.5.1 Síntese de novo e formação de triacilglicerol.

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



Fonte: Adaptado pela autora, 2020.

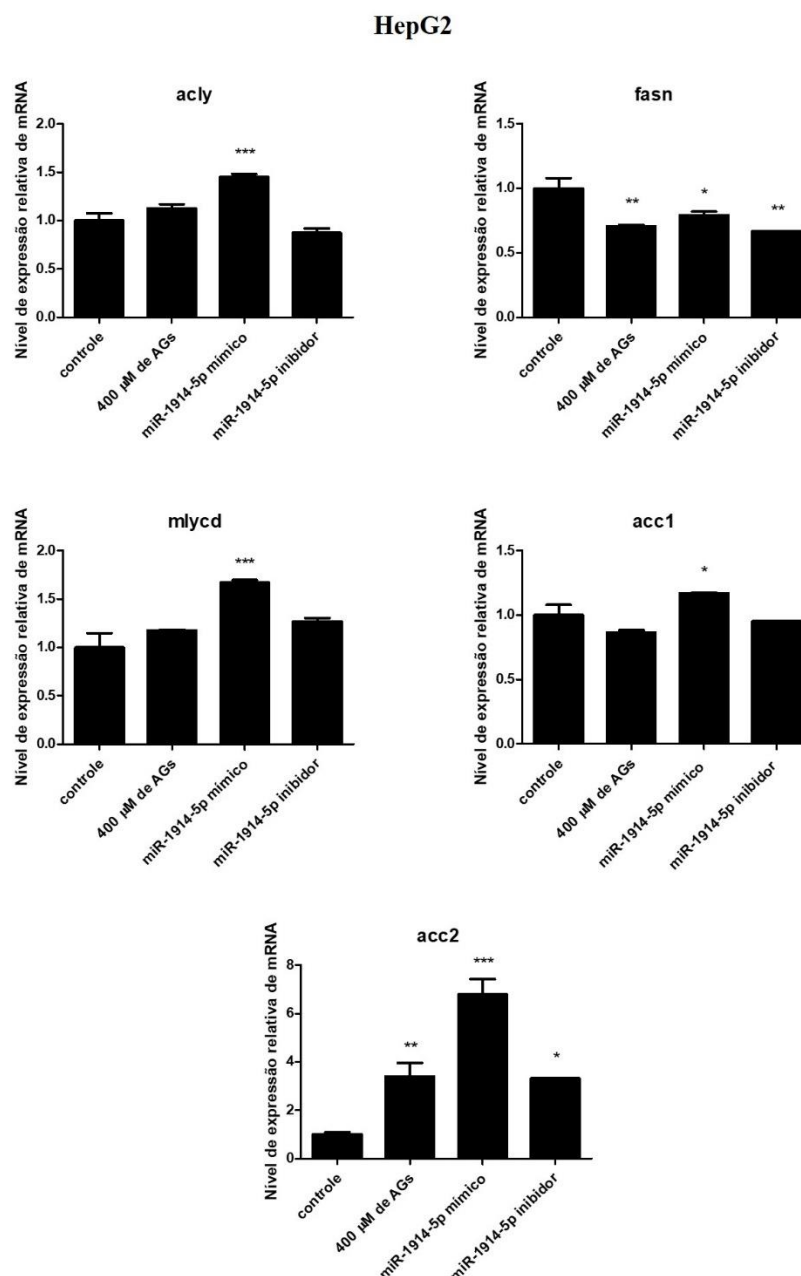
Os genes analisados na lipogênese *de novo* foram *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *acsl4* e *acsl5*. Por sua vez, os genes analisados na formação de triacilgliceróis foram *gpat1*, *gpat3*, *agpat1*, *agpat2*, *agpat3*, *lpin1*, *lpin2*, *lpin3*, *dgat1* e *dgat2* (Figuras 32, 33, 34 e 35).

A Figura 32 apresenta os gráficos dos níveis transcricionais dos genes *acly*, *fasn*, *mlycd*, *acc1* e *acc2*. A análise de *acly* apresenta um aumento significativo ($***p < 0,0005$) nos seus níveis transcricionais nas células transfectadas com o a molécula mímica do miRNA-1914-5p, em comparação aos níveis de expressão encontrados nas células utilizadas como controle experimental. As células cultivadas com a adição de AGs e transfectadas com a molécula inibidora do miRNA-1914-5p não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle experimental. Entretanto, ao realizar o *post-test* de Tukey para comparação entre essas condições celulares, também se observa que as células transfectadas com o inibidor do miRNA apresentam uma diminuição significativa ($*p < 0,05$) em relação às células cultivadas com AGs.

A enzima ATP citrato liase é crucial para a geração de acetil-CoA a partir do citrato citoplasmático. O aumento da expressão de ACLY é encontrada em fígados de ratos com obesidade mórbida, gordura hepática e diabetes tipo 2 (GUO *et al.*, 2019), e o nocaute fígado-específico desta proteína resulta numa melhora da esteatose hepática, pela inibição da lipogênese (MA *et al.*, 2018). Assim sendo, o aumento dos níveis transcricionais nas células transfectadas com o có-mimo do miRNA pode sugerir uma piora do quadro pró-esteatótico, o que vai ao encontro com a diminuição dos níveis transcricionais nas células transfectadas com o inibidor do miRNA.

Os níveis transcricionais de *fasn* apresentaram uma diminuição significativa nas células cultivadas com a mistura de AGs e com as células transfectadas com a molécula có-mica e com a inibidora do miRNA em estudo. FASN é a enzima responsável pela formação de ácidos graxos de 16 carbonos a partir de acetil-CoA (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Considerando que o meio de cultivo está com abundância de ácido palmítico (C16:0), a diminuição dos níveis transcricionais de *fasn* é esperada. Por sua vez, os níveis transcricionais de *mlycd* apresentam um aumento estatisticamente significativo ($***p < 0,0005$) nas células transfectadas com a molécula có-mica do miRNA-1914-5p em comparação com o controle. O miRNA-1914-5p possui um alvo de ligação com a região 3' não traduzida do mRNA de *mlycd*. A interação entre ambos foi comprovada por De Oliveira da Silva *et al.* (2018) em células estreladas hepáticas humanas. O aumento no nível transcricional sugere também um possível aumento na quantidade de acetil-CoA disponível.

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



A enzima acetil-CoA carboxilase possui duas isoformas, conhecidas como ACC1 e ACC2. Ambas se diferenciam pela localização, ACC1 é comumente encontrada no citosol, enquanto ACC2 é encontrada na membrana mitocondrial. A presença de ACC2 na membrana

mitocondrial é importante, pois a produção de malonil-CoA especificamente desta enzima inibe CPT1 (BOONE *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2017; GOEDEKE *et al.*, 2018). O nocaute específico de ACC1 no tecido hepático, leva a uma diminuição nos níveis de esteatose em ratos e uma diminuição na síntese *de novo* em hepatócitos (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). A ação enzimática de ACC é um fator chave na regulação da síntese lipídica endógena. Nesse sentido, fatores alostéricos são importantes, como a ativação de ACC por citrato ou a sua inibição pela alta concentração de palmitato (BOONE *et al.*, 2006; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). Nos gráficos de *acc1* e *acc2* (Figura 32) é possível observar que há um aumento significativo (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0005$, respectivamente) no nível transcricional das células transfectadas com a molécula mímica do miRNA. Esse aumento pode ser resultado da inibição enzimática de ACC pela presença de palmitato no meio celular. Nesse caso, se a atividade enzimática de ACC estivesse comprometida, a presença do mímico de microRNA-1914-5p poderia estar aumentando os níveis transcricionais para uma maior produção proteica. Entretanto, os níveis transcricionais controlados de *acc1* e *acc2* nas células transfectadas com a molécula inibidora do miRNA em estudo sugere que esta condição pode ser benéfica para a regulação da lipogênese *de novo* em um quadro pró-esteatótico.

Na Figura 33 são apresentados os resultados da análise transcricionais dos genes *acsl4*, *acsl5*, *gpat1* e *gpat3*.

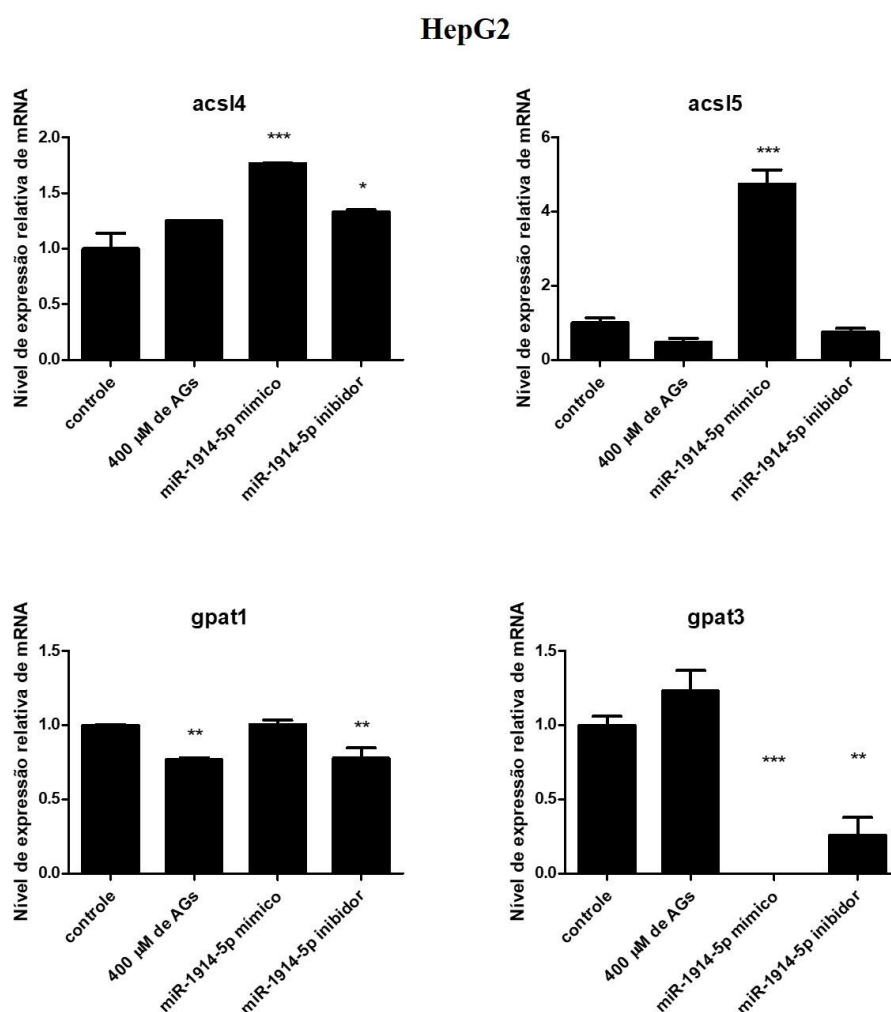
As acil-CoAs sintetases (ACSSs) podem ser divididas de acordo com o tamanho de cadeia carbônica em que apresentam função enzimática. São responsáveis pela ativação dos ácidos graxos resultando na ligação destes com a coenzima A, transformando-os em acil-CoA graxo. Essa ativação é essencial para os ácidos graxos provenientes do meio extracelular e para os produzidos pela síntese *de novo* (KWAK *et al.*, 2019; SEBASTIANO; KONSTANTINIDOU, 2019). As acil-CoAs sintetases de cadeia longa (ACSLs) catalisam reações em cadeias de até 12 a 22 carbonos, entretanto, apresenta isoenzimas de acordo com a preferência de substrato e localização celular. A ACSL4 está presente nos endossomos, peroxissomos, na membrana plasmática e em regiões do retículo endoplasmático ligado à mitocôndria, possui como preferência de substrato o ácido araquidônico e o ácido eicosapentanoico. Por sua vez, ACSL5 se localiza na membrana externa mitocondrial, sendo altamente expressa em fígado, pulmão,

rim e tecido adiposo. ACSL5 atua na formação de acil-CoA graxo principalmente tendo como substrato o ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido oleico e ácido linoleico (KILLION *et al.*, 2018; KWAK *et al.*, 2019; SEBASTIANO; KONSTANTINIDOU, 2019). Nos resultados apresentados para *acsl4* é possível observar que as células transfectadas com o có-mimo e com o inibidor do miRNA apresentam aumento significativo em relação ao controle celular. Entretanto, ao se comparar os níveis transcricionais de *acsl4* com os níveis encontrados nas células cultivadas com 400 µM da mistura de AGs, diferenças estatísticas entre os grupos investigados só são identificadas nas células transfectadas com a molécula có-mima do miRNA-1914-5p. Isso poderia indicar que o aumento de *acsl4* nas células transfectadas com o inibidor do miRNA é proveniente da presença de AGs e não de sua atuação funcional. Por sua vez, os gráficos de ACSL5 apresentam um aumento considerável (**p<0,0005) nos níveis transcricionais das células transfectadas com o có-mimo do miRNA em comparação com o controle experimental. Segundo Mashek, *et al.* (2005), hepatócitos de linhagem McArdle incubados com ácidos graxos exógenos, tiveram um aumento na expressão de *acsl5*, acúmulo de triglicérides e absorção de ácidos graxos. Bowman e colaboradores (2016) também observaram uma diminuição nos triglicérides circulantes com a diminuição de *acsl5* em ratos. Assim sendo, o aumento de *acsl5* nas células transfectadas com o có-mimo do miRNA pode indicar uma piora do quadro pró-esteatótico.

Em seguida, na via bioquímica, a síntese de triacilgliceróis é iniciada pela acilação de glicerol-3-fosfato por uma das isoformas de GPAT. GPAT1 está localizada na membrana mitocondrial externa e pode competir por acil-CoAs com a enzima CPT1. Por sua vez, GPAT3 e GPAT4 se apresentam na membrana do retículo endoplasmático e possuem identidade de aproximadamente 80%. GPAT1 é responsável por 30 a 50% da atividade enzimática de aciltransferase no fígado (COLEMAN; MASHEK, 2011; CAO *et al.*, 2014). Na Figura 33 é possível observar que os níveis transcricionais de *gpat1* apresentam uma diminuição significativa (**p<0,005) nas células cultivadas com os AGs e nas células transfectadas com o inibidor do miRNA. Por sua vez, *gpat3* apresenta uma diminuição expressiva nas células transfectadas com o có-mimo e com o inibidor do miRNA. Essa diminuição poderia ser resultado

da ativação de outras isoformas que apresentam a atividade de aciltransferases ou uma meia vida proteica alta.

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



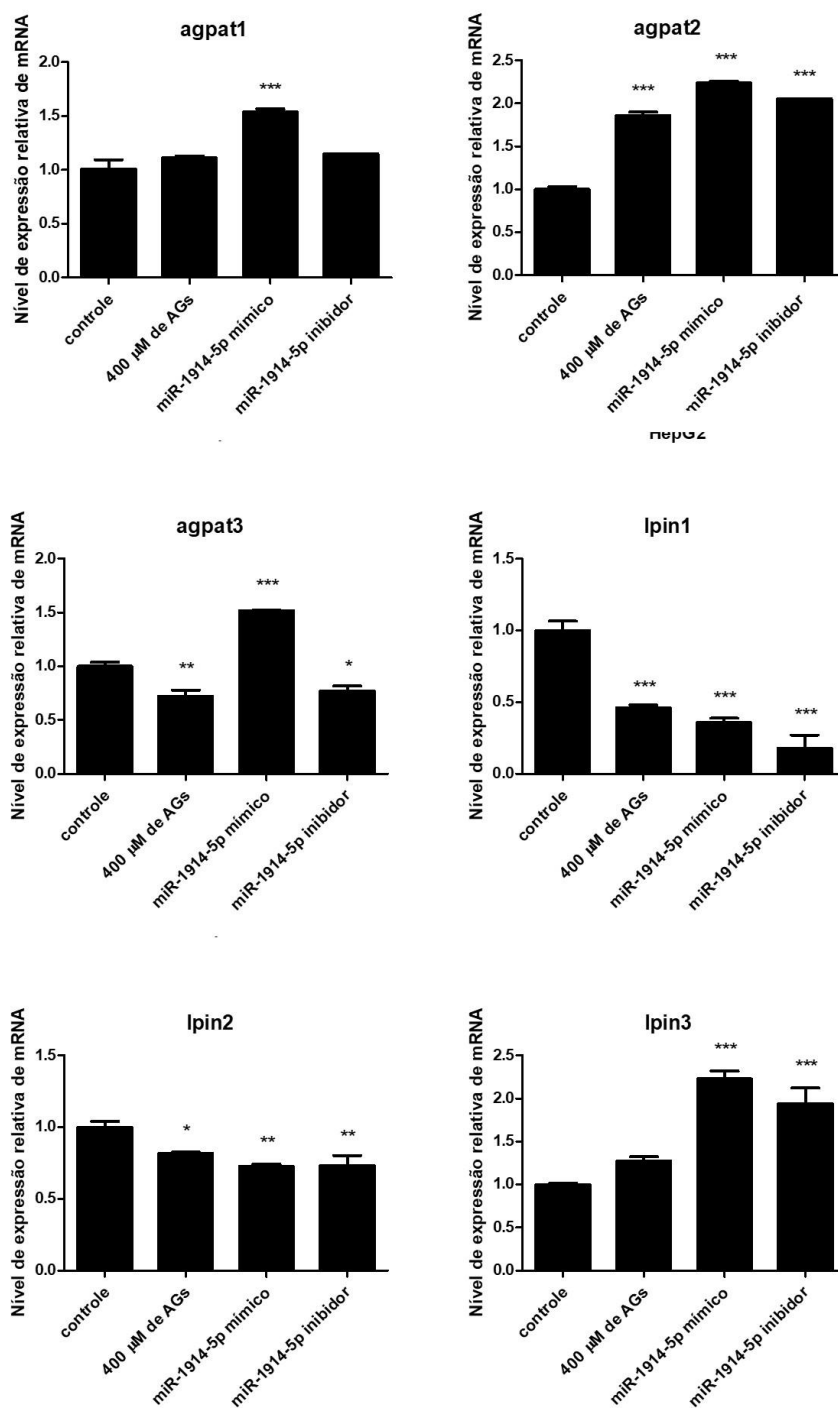
Após a formação de LPA pela ação das GPATs, a via metabólica continua com a atuação das AGPATs ao catalisar a síntese de PA a partir de acil-CoA e LPA. As AGPATs podem ser encontradas na membrana do retículo endoplasmático ou na membrana mitocondrial, porém, apenas as isoformas -1, -2 e -3 catalisam comprovadamente a esterificação que forma PA (COLEMAN; MASHEK, 2011; WANG; AIROLA; REUE, 2017). Na Figura 34 são

apresentados os resultados obtidos para *agpat1*, *agpat2* e *agpat3*. Os resultados mais expressivos são os de *agpat1* e *agpat3*, ambos apresentam um aumento considerável do nível transcricional nas células transfectadas com o cópico do miRNA. Um padrão diferente é observado para as células transfectadas com o inibidor do miRNA, essa condição se equivale ao controle celular ou às células cultivadas com AGs, sugerindo que a inibição do miRNA-1914-5p não leva à piora do quadro.

Após a formação de PA, a enzima LPIN é responsável pela produção de diacilglicerol. Esse diacilglicerol pode ser utilizado para diversas vias como a síntese de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e triacilglicerol. A enzima LPIN também apresenta três isoformas: LPIN1, LPIN2 e LPIN3 (COLEMAN; MASHEK, 2011; WANG; AIROLA; REUE, 2017). Na Figura 34 são apresentados os resultados dos níveis transcricionais das três isoformas de lipina. *Lpin2* apresenta uma diminuição significativa entre os três cultivos com adição de AGs em comparação com o controle, mas as alterações transcricionais apresentadas em relação ao controle, não são observadas entre os outros grupos celulares, indicando que o miRNA não atua direta ou indiretamente nessa isoforma. Por sua vez, os resultados para *lpin1* e *lpin3* se apresentam de maneira oposta. Enquanto os níveis transcricionais de *lpin1* diminuem consideravelmente entre as três células cultivadas com os AGs, os níveis transcricionais de *lpin3* aumentam consideravelmente entre as células transfectadas com o cópico e com o inibidor do miRNA. Entretanto, ao comparar estatisticamente o cópico e o inibidor do miRNA, é possível verificar que tanto *lpin1* quanto *lpin3* não apresentam diferença entre essas condições.

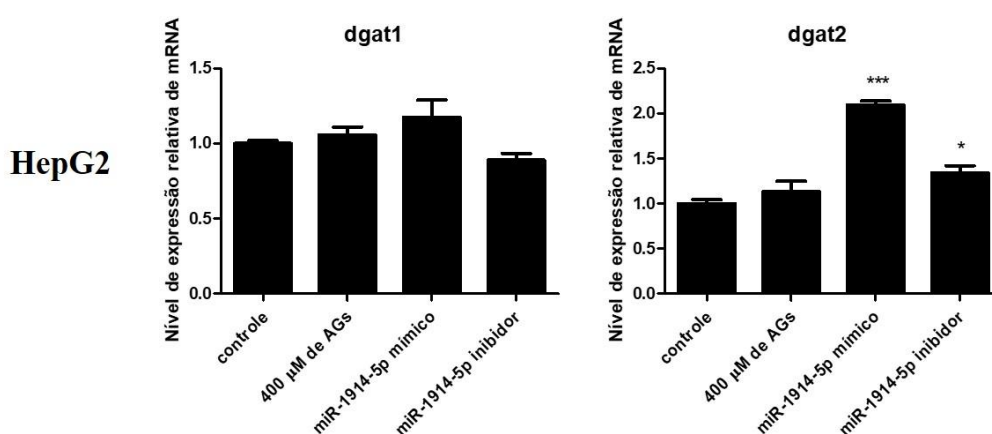
Figura 34. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *agpat1*, *agpat2*, *agpat3*, *lpin1*, *lpin2* e *lpin3*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p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

HepG2



Com a produção de diacilglicerol, as enzimas DGAT1 e DGAT2 realizam o último passo da síntese de triacilglicerol. Na Figura 35 é possível verificar que os níveis transcricionais de *dgat1* não apresentaram diferenças significativas entre as condições de cultivo. Por sua vez, os níveis de *dgat2* apresentaram um aumento significativo ($***p<0,0005$) nas células transfectadas com o cópia do miRNA em comparação com o controle. O aumento significativo indicado nas células transfectadas com o inibidor do miRNA, em comparação com a condição controle, pode ser ocasionado pela presença de AGs, já que essa condição celular não apresentou diferença estatística com as células cultivadas apenas com 400 μM de AGs.

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

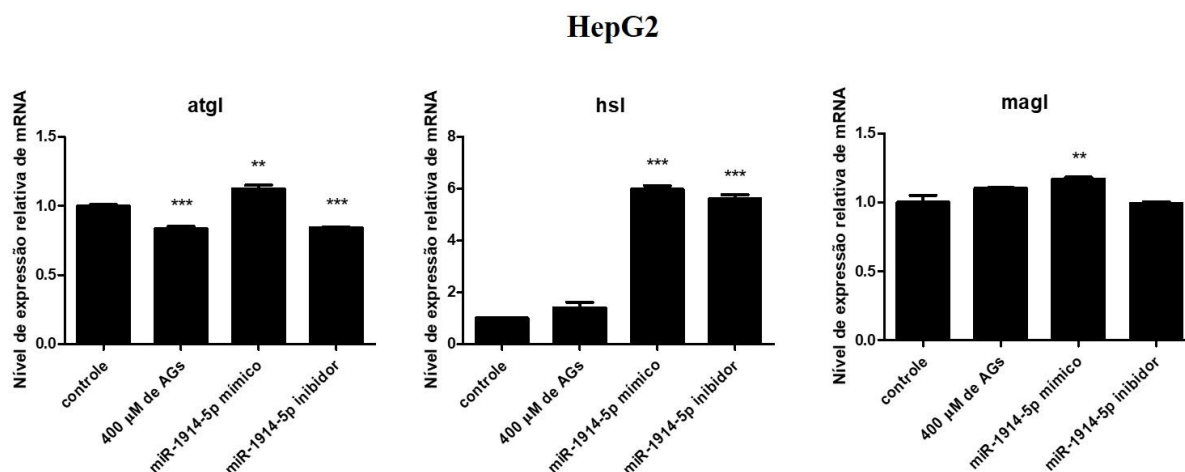


Com os resultados apresentados é possível verificar que as células transfectadas com o cópia do miRNA-1914-5p apresentaram um aumento considerável em genes chaves para a síntese *de novo* e na formação de triacilglicerol (*acly*, *mlycd*, *acc1*, *acc2*, *acsl4*, *acsl5*, *agpat1*, *agpat2*, *agpat3* e *dgat2*), enquanto as células transfectadas com o inibidor do miRNA não apresentam essas modulações. Isso sugere que o aumento da quantidade de miRNA na célula pode estar atuando na piora do quadro pró-esteatótico através da síntese *de novo* e que a inibição do miRNA pode estar agindo como uma forma de encontrar a homeostase, controlando a síntese *de novo* de ácidos graxos.

5.5.2 Degradação de ácidos graxos por lipases e pela β -oxidação.

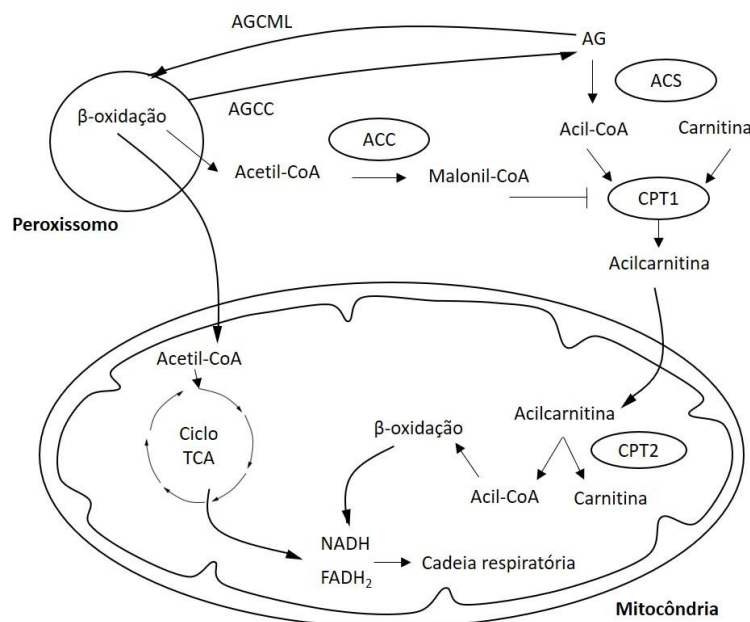
Uma das formas de degradação de triacilgliceróis é através da atividade das lipases. A lipase triglicerídica adiposa (ATGL) é responsável pela formação de diacilglicerol a partir dos triacilgliceróis armazenados nas gotículas lipídicas. Por sua vez, a lipase sensível ao hormônio (HSL) catalisa a formação de monoacilgliceróis a partir de diacilglicerol. Esses monoacilgliceróis podem sofrer catálise pela lipase de monoacilglicerol (MAGL) e serem transformados em glicerol e ácidos graxos (CURRIE *et al.*, 2013; FUCHS; CLAUDEL; TRAUNER, 2014). Os níveis transcricionais de *atgl* (Figura 36) apresentam um aumento significativo (** $p < 0,005$) nas células transfectadas com o cópico do miRNA, assim como uma diminuição nos níveis das células cultivadas com os AGs e transfectadas com o inibidor do miRNA em comparação com o controle celular. Por sua vez, os níveis transcricionais de *hsl* se apresentam altos apenas nas células transfectadas com o cópico ou com o inibidor do miRNA em comparação com as células controle (10% SBF). *Magl* apresenta diferença significativa em seus níveis transcricionais apenas nas células transfectadas com o cópico do miRNA em relação ao controle celular. Entretanto, ao se comparar os resultados com as células cultivadas com a mistura de AGs, as alterações transcricionais apresentadas para *magl* nas células transfectadas com a molécula cópica do miRNA não são observadas diferenças significativas entre os outros grupos celulares em análise, indicando que a alteração apresentada pode ser proveniente da adição de AGs ao meio celular.

Figura 36. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *atgl*, *hsl* e *magl*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



Além da ação das lipases, a degradação de ácidos graxos também pode ser realizada pela β -oxidação (Figura 37). A enzima carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) é responsável pela produção de acilcarnitina (acil-CoA + carnitina) para o transporte do acil-CoA para o interior da mitocôndria. Uma vez dentro da mitocôndria, a enzima CPT2 é a responsável pela dissociação de acilcarnitina em acil-CoA e carnitina para que ocorra o início da β -oxidação (CURRIE *et al.*, 2013; RÖHRIG; SCHULZE, 2016).

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

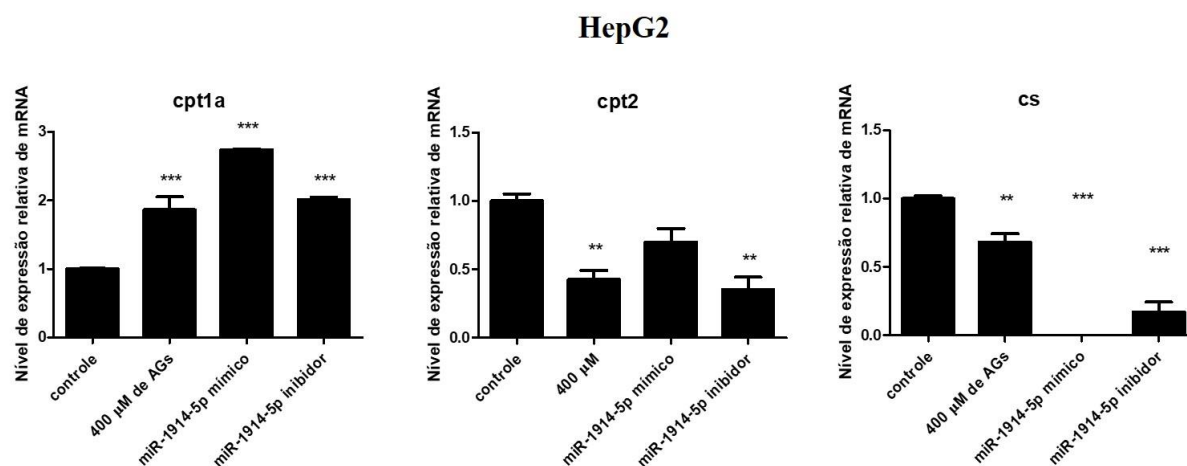


Fonte: Adaptado pela autora, 2020.

A Figura 38 apresenta os níveis transcricionais desses dois genes. Cpt1a apresenta um aumento significativo nos seus níveis transcricionais nas três condições de células cultivadas com a presença dos AGs. Entretanto, o aumento é mais considerável nas células transfectadas com o mímico do miRNA em relação ao controle e às células cultivadas apenas com os AGs. Segundo Currie e colaboradores (2013), CPT1 pode ser regulada negativamente pela alta presença de malonil-CoA proveniente de ACC2. Na Figura 32, é possível verificar que os níveis de acc2 também se apresentam elevados nessa condição de cultivo. Se a produção de malonil-CoA por acc2 está alta e a proteína CPT1A está sendo inibida, a célula pode estar tentando controlar os níveis proteicos com uma maior produção de mRNAs. Cpt2 apresenta uma diminuição em seus níveis transcricionais nas células cultivadas com a mistura de AGs e nas células transfectadas com o inibidor do miRNA em relação ao controle. Por sua vez, as células transfectadas com o mímico do miRNA não apresentam diferenças significativas em comparação com o controle. Os altos níveis de acc2 em conjunto com os baixos níveis de cpt2 e cs, podem sugerir que nessas condições há baixa atividade mitocondrial e não há inferência de β -oxidação.

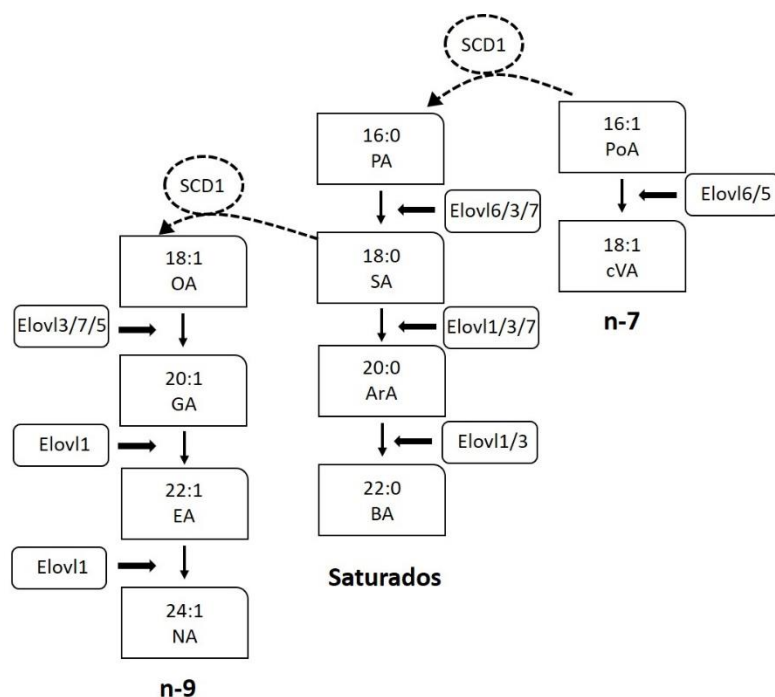
Com os resultados apresentados é possível observar que as células transfectadas com o mimico do miRNA-1914-5p apresentam um aumento considerável nos níveis de hsl e atgl (Figura 36), o que poderia indicar a lipólise. O mesmo caso ocorre com os níveis de cpt1a. Entretanto, se essa condição estivesse modulando a degradação de ácidos graxos, a célula poderia estar em um ciclo fútil, aumentando a síntese *de novo* ao mesmo tempo em que aumenta a lipólise e a β -oxidação. Levando isso em consideração, é possível que o aumento nos níveis transcricionais de hsl e atgl podem ser ocasionados por alguma modificação pós-transcricional proteica. Nas células transfectadas com o inibidor do miRNA, não há indicação de ocorrência de β -oxidação.

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



5.5.3 Dessaturação de ácidos graxos e mobilização lipídica.

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



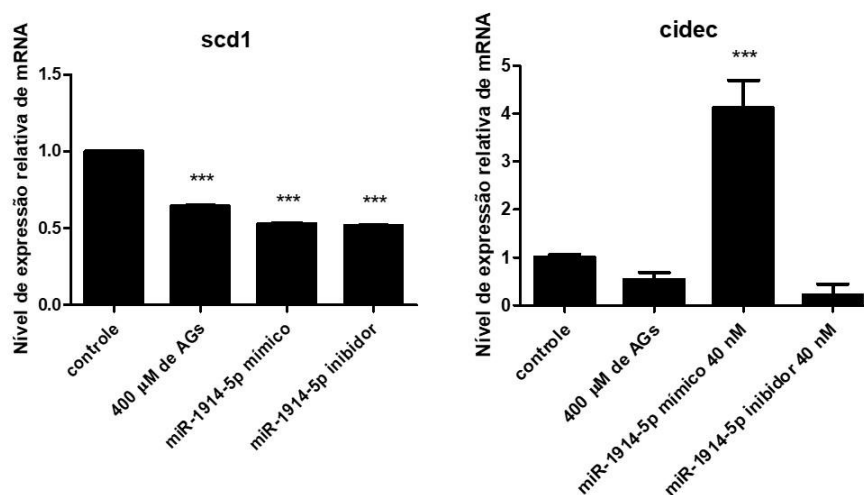
Fonte: Adaptado pela autora, 2020.

A enzima SCD1 é responsável pela introdução de ligações duplas em ácidos graxos, principalmente no carbono 9. A partir disso, pode converter ácido palmítico e esteárico em ácido palmitoleico e ácido oleico (CURRIE *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2018). Na Figura 40 é possível verificar que os níveis transcricionais de *scd1* diminuem consideravelmente nas três condições de cultivo em que há a presença da mistura de AGs, indicando que nessas condições pode não haver a produção de ácidos monoinsaturados através da ação dessa enzima. Sendo de conhecimento que a principal conversão realizada por SCD1 é resultante em ácido palmitoleico e em ácido oleico, a diminuição em seus níveis transcricionais nessas condições pode ser explicada pela alta quantidade de ácido oleico já presente no meio celular.

Outra importante proteína relacionada com o metabolismo lipídico é o efector C indutor de morte celular semelhante à DFFA (CIDEA). No início, essa proteína era relacionada com a apoptose celular. Porém, após alguns anos de pesquisas, novos estudos indicaram a relação dessa proteína com as gotículas lipídicas. Ela está localizada na superfície das gotículas

lipídicas e se relaciona com outra proteína nomeada de perilipina. Alguns estudos indicam que o aumento de CIDEC está relacionado com o aumento das gotículas lipídicas, principalmente em dietas com alto teor lipídico (LI *et al.*, 2018; SLAYTON *et al.*, 2019). Considerando os resultados da Figura 25, observa-se que as células transfectadas com o mímico e inibidor do miRNA-1914-5p apresentam aumento nas gotículas lipídicas em comparação com o controle. Entretanto, a quantificação considera a área das gotículas e visualmente as células transfectadas com o inibidor do miRNA as apresentam menores. Os resultados de cidec são apresentados na Figura 40. É possível observar que as células transfectadas com o mímico do miRNA apresentam um aumento considerável ($***p<0,0005$) na expressão de cidec, o que corrobora com o aumento das gotículas lipídicas nessa condição, em conjunto com o aumento de triglicérides. Por sua vez, as células transfectadas com o inibidor do miRNA apresentam uma diminuição de cidec, se igualando ao controle celular. Esse resultado sugere que a inibição do microRNA diminui o tamanho das gotículas lipídicas.

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

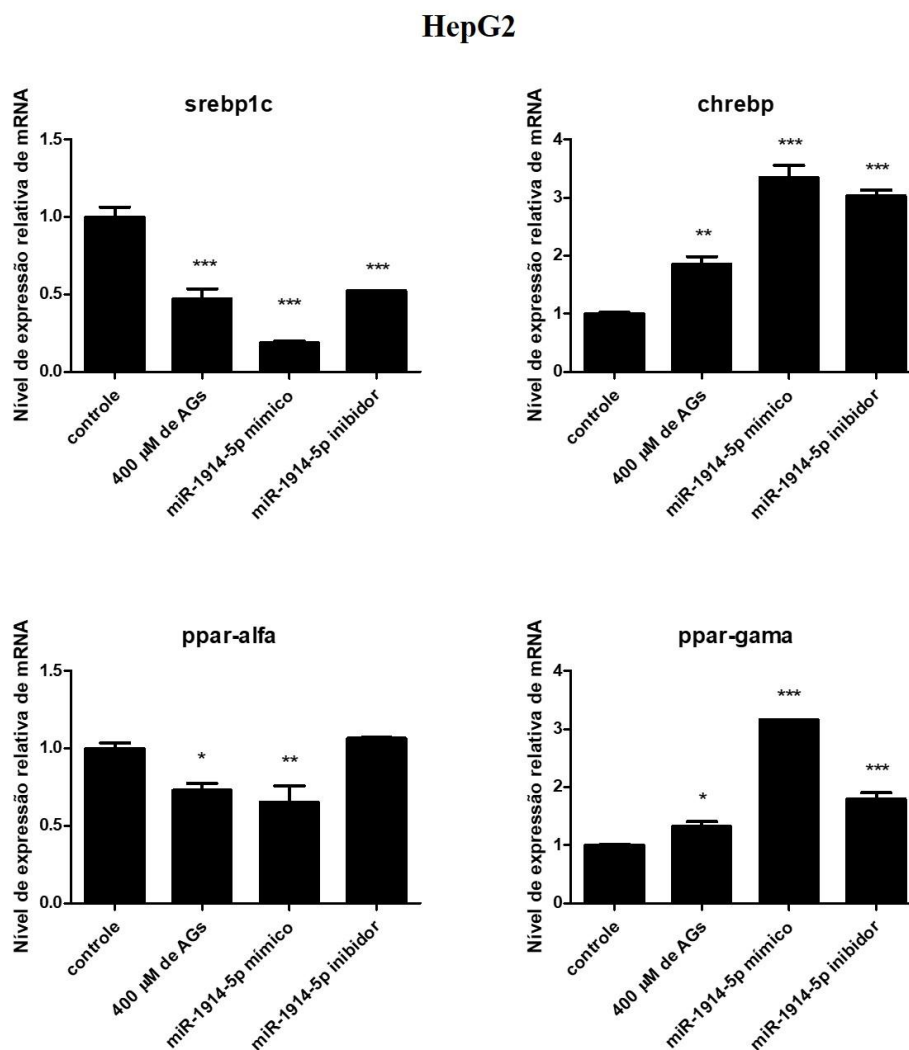


5.5.4 Fatores de transcrição e receptores nucleares.

Além dos genes responsáveis pelas reações enzimáticas da via lipídica, alguns fatores de transcrição são importantes pela regulação que realizam nessas enzimas. A família de proteínas SREBP são grandes reguladores do metabolismo lipídico. SREBP1c especificamente regula diversas enzimas como ACLY, ACC1, FASN, entre outras. Em pacientes com NAFLD, a expressão de SREBP1c se encontra elevada. Ademais, camundongos que apresentam a superexpressão de SREBP1c registram altos níveis de triglicerídeos hepáticos (COLEMAN; MASHEK, 2011; CURRIE *et al.*, 2013; RUI, 2014; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Na Figura 41 estão apresentados os níveis transcripcionais de *srebp1c*. Há uma diminuição nos níveis relativos nas três condições cultivadas com a mistura de AGs em comparação com o controle experimental. Essa diminuição nos níveis transcripcionais de *srebp1c* sugere que a modulação lipídica do miRNA em células HepG2 não esteja ocorrendo por esse caminho metabólico. Outro fator de transcrição importante é ChREBP (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). ChREBP regula diversos genes em resposta a mudanças na concentração celular de glicose nas doenças metabólicas do fígado (JOIS *et al.*, 2017). Em nosso modelo experimental, os níveis transcripcionais de *chrebp* (Figura 41) se apresentam elevados especialmente nas células transfectadas com o có-mimico e com o inibidor do miRNA em comparação com o controle experimental. Entretanto, ao se comparar os níveis transcripcionais desses genes entre as células transfectadas com as moléculas có-mimicas e inibidoras não são observadas diferenças estatísticas, sugerindo que o miRNA não está atuando nesta regulação hepática. Segundo Ipsen, Lykkesfeldt e Tveden-Nyborg (2018), a regulação por ChREBP não é induzida por dietas hiperlipídicas. Porém, Bai e colaboradores (2019) demonstraram que ao cultivar células HepG2 na presença de ácidos graxos livres por 24 horas, houve um aumento na produção de glicose. Além disso, ao realizarem a inibição de *srebp1c*, os níveis de mRNA de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase subunidade catalítica (G6PC) aumentaram. Assim sendo, a diminuição dos níveis transcripcionais de *srebp1c* e o aumento de *chrebp* nas condições estudadas poderiam indicar um aumento na produção de glicose. Entretanto, para confirmar esse aumento na produção de glicose, ensaios específicos precisam ser realizados.

Outra classe de proteínas que podem atuar na regulação do metabolismo lipídico são os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs). Eles se apresentam em diversas isoformas que se expressam de maneira diferente de acordo com o órgão (RUI, 2014). PPAR α é comumente expresso no fígado, enquanto PPAR γ geralmente é encontrado em adipócitos. PPAR α atua na β -oxidação, enquanto PPAR γ hepático está relacionado com o controle da absorção de ácidos graxos, transporte e biossíntese de triacilgliceróis (RUI, 2014). Entretanto, a expressão hepática de PPAR γ está vinculada à indução do quadro patológico de NAFLD. Nesse sentido, hepatócitos de camundongos com deleção de PPAR γ apresentam efeito protetor contra o desenvolvimento de esteatose (LISS; FINCK, 2017; TANAKA *et al.*, 2017). Os níveis transcricionais de ppar α mostrados na Figura 41 não apresentam grandes alterações que indicariam uma modulação deste fator pelo miRNA-1914-5p. Por sua vez, os níveis transcricionais de ppar γ se mostram interessantes. O aumento dos níveis relativos nas células transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p, em relação às células cultivadas apenas com AGs, pode sugerir um favorecimento no desenvolvimento do quadro esteatótico.

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



Os níveis transcricionais de outros receptores nucleares foram também investigados como *lxr α* , *lxr β* , *rxr α* e *cd36*. Os receptores de retinoide X (RXRs) podem atuar como homodímeros, mas também se apresentam em heterodímeros com diferentes tipos de receptores nucleares. Dentre esses receptores nucleares estão incluídos os receptores de tireoide, os receptores de vitamina D, os PPARs, os LXRs e receptores de farnesoides (KREZEL; RÜHL; LERA, 2019). Assim sendo, os RXRs podem atuar na modulação da absorção de ácidos graxos,

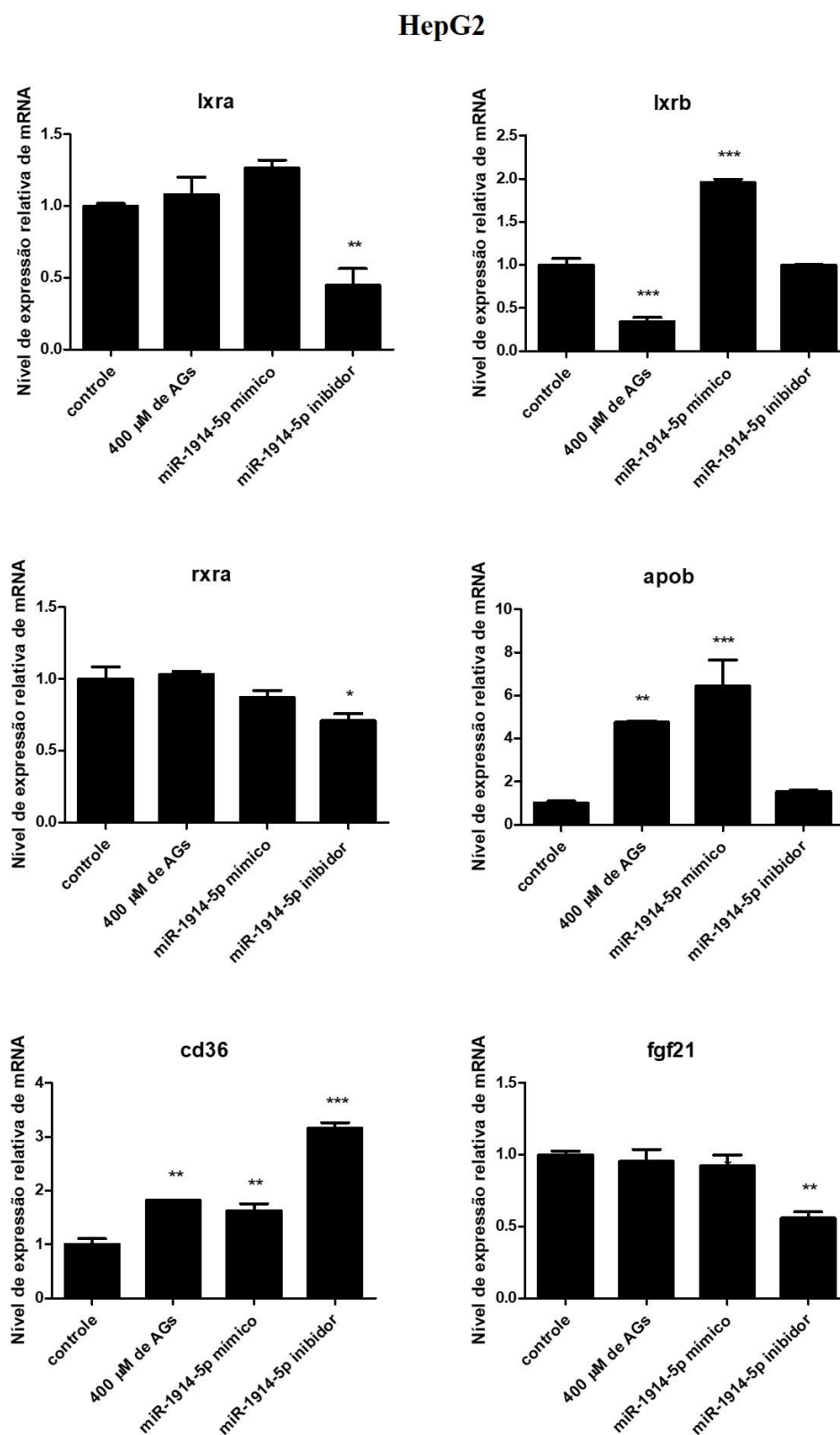
adipogênese e β -oxidação (LISS; FINCK, 2017). Os resultados obtidos dos níveis transcricionais de *rxra* não apresentam modulações muito significativas pelo miRNA-1914-5p.

LXR é conhecido pela ativação da síntese de triglicerídeos, pelo seu transporte para tecidos periféricos e pelo controle da toxicidade do colesterol em tecido extra-hepáticos. Os genes alvos de LXR são *fasn*, *acc* e *srebp1c* por regularem especificamente o metabolismo lipídico. A ativação de LXR é comumente associada com o acúmulo de triglicerídeos hepáticos e a piora de quadros de obesidade e esteatose (CAVE *et al.*, 2016; TANAKA *et al.*, 2017; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Os resultados obtidos dos níveis transcricionais de *lxa* e *lxb* são apresentados na Figura 42. *Lxa* apresenta uma diminuição significativa (** $p < 0,005$) nas células transfectadas com o inibidor do miRNA em comparação com o controle celular. Por sua vez, *lxb* apresenta uma diminuição significativa dos níveis relativos nas células cultivadas com a presença dos AGs. Entretanto, o mesmo padrão não se observa em *lxa*, o que poderia sugerir que a diminuição em *lxb* pode estar sendo compensada pela outra isoforma. O aumento significativo de *lxb* nas células transfectadas com o mímico do inibidor em comparação com o controle pode sugerir uma piora no quadro pró-esteatótico.

Além dessas análises, também foram investigados alguns genes responsáveis pelo transporte de lipídeos no meio celular. No fígado a secreção de triacilgliceróis é geralmente realizada pela formação de VLDL e uma das proteínas responsáveis pela sua montagem é a apolipoproteína B (ApoB). As principais funções de ApoB consistem na manutenção da estrutura do complexo lipoproteico e a sua atuação como ligante para receptores na superfície das células específicos (CONTOIS *et al.*, 2009; KOO, 2013; DETTLAFF-POKORA; SLEDZINSKI; SWIERCZYNSKI, 2015). A absorção de ácidos graxos, entretanto, é realizada por um conjunto de moléculas como as FATPs e a CD36. CD36 é um receptor de membrana que reconhece variados tipos lipídicos e não lipídicos como ácidos graxos, lipoproteínas, colágeno, entre outros. (RUI, 2014; SAMOVSKI; ABUMRAD, 2019). A Figura 42 apresenta os resultados obtidos dos níveis transcricionais para tais genes. *Apob* apresenta um aumento significativo para as células cultivadas com a mistura de AGs e para as células transfectadas com o mímico do miRNA, em relação às células do controle experimental. Por sua vez, *cd36* apresenta um aumento mais significativo (** $p < 0,0005$) nas células transfectadas com o inibidor do miRNA em relação ao controle celular. Segundo Samovski e Abumrad (2019),

células HepG2 que apresentam um aumento na expressão de cd36 tiveram uma diminuição na autofagia e um aumento nas gotículas lipídicas. Sabe-se que pacientes com desordens lipídicas como obesidade, diabetes tipo 2 e doenças da artéria coronária apresentam um aumento significativo na presença do fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21). No tecido hepático, a expressão de FGF21 pode ser regulada por PPAR α e LXR (BARB *et al.*, 2019; SU; KONG; PENG, 2019). Assim sendo, é possível correlacionar o baixo nível transcricional de fgf21 nas células transfectadas com o inibidor do miRNA, com o baixo nível transcricional observado em lxr α na mesma condição de cultivo (Figura 42).

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

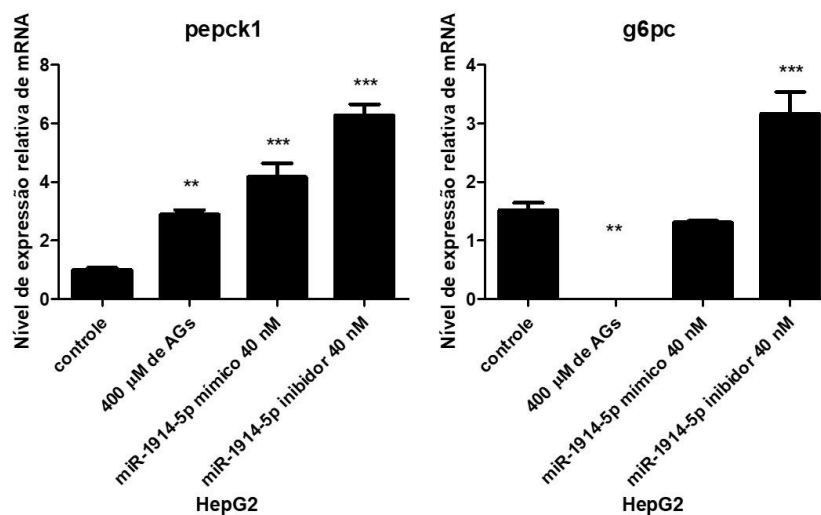


5.5.5 Gliconeogênese.

Como mencionado acima, Bai e colaboradores (2019) demonstraram que o cultivo de HepG2 na presença de ácidos graxos livres apresenta um aumento de PEPCCK e G6PC. Dessa forma, os níveis transcricionais desses genes foram analisados. Na Figura 43, observa-se que tanto *pepck1* e *g6pc* apresentam um aumento significativo ($***p < 0,0005$) nas células com o miRNA inibido. PEPCCK1 tem como principal função a conversão de oxalacetato em fosfoenolpiruvato e pode ser utilizada como um marcador para a avaliação de diabetes do tipo 2, por sua vez, G6PC converte glicose-6-fosfato em glicose (ZHANG *et al.*, 2017; KALEMBA *et al.*, 2019). Em hepatócitos primários, a presença de ácidos graxos livres pode aumentar a produção de glicose pela alta formação de acetil-CoA, regulador de PEPCCK1 (KALEMBA, 2019). Dessa forma, o aumento de *pepck1* em todas as condições cultivadas com a mistura de AGs é esperada.

A resistência à insulina no fígado pode ser definida pela supressão de insulina mediada pela produção de glicose, o que pode resultar no aumento da gliconeogênese. Evidências indicam que produção ineficiente de insulina reduz a ativação de RAC α serina/treonina quinase (AKT1) e forkhead box protein O1 (FOXO1) e pode levar a gliconeogênese (TILG; MOSCHEN; RODEN, 2016). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a inibição do miRNA pode atuar na piora do quadro de resistência à insulina.

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

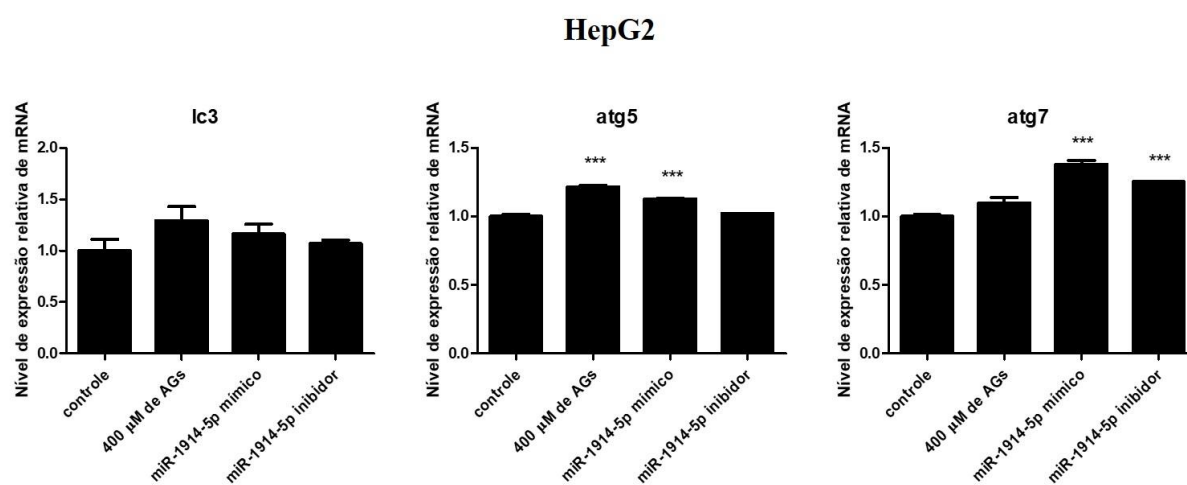


5.5.6 Autofagia.

Considerando-se que o tratamento de hepatócitos com ácido palmítico e ácido oleico estimulam a autofagia *in vivo* e *in vitro* (NISO-SANTANO *et al.*, 2015; SAMOVSKI; ABUMRAD, 2019) buscou-se avaliar a expressão de alguns genes importantes nesse processo. A autofagia tem um papel importante na rotatividade das gotículas lipídicas e os principais genes envolvidos nessa via são a proteína relacionada à autofagia LC3 A (LC3), proteína relacionada à autofagia 5 (ATG5) e a proteína relacionada à autofagia 7 (ATG7). Estudos indicam que camundongos sem o gene *atg7* apresentam um aumento nos triglicérides hepático e uma redução nas taxas de secreção de VLDL e oxidação de ácidos graxos (SINGH *et al.*, 2009; WU; ZHANG; CHAN, 2018; SAMOVSKI; ABUMRAD, 2019). Como é possível observar na Figura 44, os níveis transcricionais de *lc3* não apresentaram diferenças significativas. Por sua vez, *atg5* e *atg7* apresentam um aumento significativo nos níveis transcricionais nas células transfectadas com o mímico do miRNA em relação ao controle celular. Entretanto, nas células transfectadas com a molécula inibidora do miRNA-1914-5p, os níveis de expressão do gene se encontram mais baixos, que os níveis expressos nas células

transfectadas com a molécula mímica. A análise desses três genes no geral, não apresentaram indicativos de ocorrência de autofagia nas condições celulares.

Figura 44. Análise de expressão dos níveis transcricionais de *lc3*, *atg5* e *atg7*. Células HepG2 cultivadas a 10% de SBF (controle), a 10% de SBF com adição de 400 μ M da mistura de AGs e transfectadas com o mímico do miRNA-1914-5p a 40 nM e com o inibidor do miRNA-1914-5p a 40 nM seguindo o modelo experimental 2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Dunnett, onde *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ em comparação com o controle.



6 RESULTADOS E DISCUSSÃO: CAPÍTULO III – Análise proteômica da linhagem HepG2.

Após as análises lipídicas e as análises de expressão gênica da linhagem HepG2, foram realizadas as análises proteômicas para melhor entendimento da relação entre miRNA-mRNA-proteína. Dessas análises resultaram um total de 295 proteínas. As proteínas correspondentes às condições de células cultivadas com DMSO e com a lipofectamina RNAiMAX foram utilizadas para normalização dos cultivos em que eles estavam presentes. A análise realizada foi qualitativa, dessa forma, foram considerados apenas a presença ou ausência da proteína em determinada condição de cultivo e os níveis de expressão diferenciais das proteínas entre as condições não foi considerado. Assim sendo, as proteínas analisadas se referem às proteínas não compartilhadas entre as condições de cultivo (Quadro 2).

Quadro 2. Quantidade de proteínas presentes isoladamente em cada condição de cultivo.

Condição de cultivo	Quantidade de proteínas
Controle	162
400 µM de AGs	18
MiR-1914-5p mimico 40 nM	21
MiR-1914-5p inibidor 40 nM	31
Proteínas em comum	63

Todas as proteínas foram analisadas e classificadas de acordo com o *Gene Ontology* – GO que considera três aspectos importantes na descrição das funções gênicas: a função molecular, o componente celular e o processo biológico. Dessa forma, entende-se que o gene possui uma atividade em nível molecular (função molecular) em uma localização celular específica (componente celular) que contribui para o objetivo biológico (processo biológico) (THOMAS, 2016). A seguir são apresentadas as proteínas presentes nas condições de aumento do miRNA-1914-5p com suas descrições de funções gênicas. Considerando que o foco do estudo é a análise funcional do microRNA-1914-5p, a lista de proteínas presentes apenas no controle celular e nas células cultivadas com 400 µM de AGs são apresentadas no Apêndice.

Quadro 3. Agrupamento das proteínas presentes nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p. No quadro foram consideradas proteínas pertencentes a espécie *Homo sapiens* e ortólogos de proteínas encontradas em *Homo sapiens* obtidas através da busca no banco de dados *liver Homo sapiens*. MM: Massa molecular. PIP: Probabilidade de identificação da proteína.

Proteínas presentes nas células transfectadas com 40 nM do mímico do miR-1914-5p					
Nome da proteína	Código de acesso	MM (kDa)	PIP (%)	Função molecular	Processo biológico
ATP synthase subunit beta	A0A478FR01	-	100	Protein binding; ATP binding.	Angiogenesis; osteoblast differentiation.
ATPase family AAA domain-containing protein 2B	Q9ULI0	165	95	Chromatin binding; ATP binding.	Negative regulation of chromatin silencing; positive regulation of transcription by RNA polymerase II.
Chitinase	A0A331LCR9	46	94	Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; chitinase activity.	Polysaccharide catabolic process; immune system process.
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	54	100	Dihydrolipoyl dehydrogenase activity; protein binding.	Pyruvate metabolic process; tricarboxylic acid cycle.
EF-hand domain Family member A1 isoform 1	A0A0S2Z6V5	50	97	Protein heterodimerization activity; calcium ion binding.	Positive regulation of mitochondrial calcium ion concentration; mitochondrial calcium ion transmembrane transport.
Elongation factor Tu	A6TEX7	43	100	RNA binding; translation elongation factor activity.	Translational elongation; response to ethanol.

Fumarate hydratase, mitochondrial	P07954	50	100	Fumarate hydratase activity; protein binding.	Urea cycle; negative regulation of histone H3-K36.
Golgin subfamily B member 1	A0A3L7HRL5	454	99	-	-
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2	Q3MIP1	58	96	-	-
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Q01650	55	100	Protein binding; amino acid transmembrane transporter activity.	Amino acid transmembrane transport; branched-chain amino acid transport.
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	P11279	45	100	Virus receptor activity; protein binding.	Granzyme-mediated apoptotic signaling; neutrophil degranulation.
Mannose-P-dolichol utilization defect 1 isoform 1	A0A0S2Z4W8	27	94	-	-
Nuclear receptor corepressor 2	Q9Y618	274	99	Protein binding; transcription corepressor activity.	Negative regulation of transcription, DNA-templated; negative regulation of androgen receptor signaling pathway.
Proteasome subunit beta type-3	P49720	23	100	Endopeptidase activity; threonine-type endopeptidase activity.	Mitotic S phase; mitotic anaphase; MAPK cascade.
Protein unc-80 homolog	Q8N2C7	-	98	Cation channel activity.	Ion transmembrane transport; cation homeostasis.

Superoxide dismutase, mitochondrial isoform B	P04179	21	100	Superoxide dismutase activity; manganese ion binding.	Response to superoxide; age-dependent response to reactive oxygen species.
Tumor protein D53	Q16890	22	94	Protein binding; identical protein binding.	G2/M transition of mitotic cell cycle; positive regulation of MAP kinase activity.
Uncharacterized protein similar to ZNF366	A0A1A6HGJ5	84	94	DNA binding; transcription corepressor activity.	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II; response to estrogen.
Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	Q9BRG1	21	95	Structural molecule activity; protein binding.	Negative regulation of epidermal growth; endosomal transport.
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P49748	70	100	Fatty-acyl-CoA binding; acyl-CoA dehydrogenase activity.	Temperature homeostasis; fatty acid beta-oxidation.
Vitronectin	A0A212D931	55	100	Scavenger receptor activity; integrin binding.	Endocytosis; immune response; cell adhesion.

Com as análises realizadas no GO, é possível observar nas Figuras 45 e 46 as principais funções moleculares e processos biológicos obtidos, respectivamente.

Figura 45. Distribuição das proteínas identificadas em funções moleculares nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.

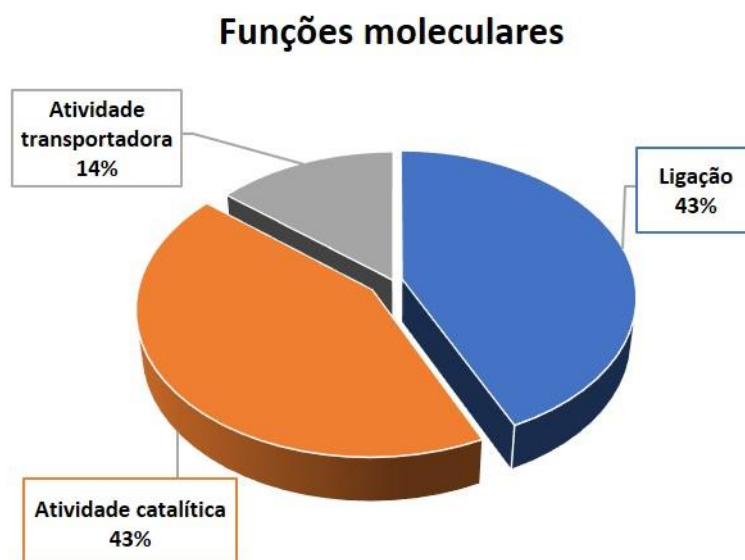
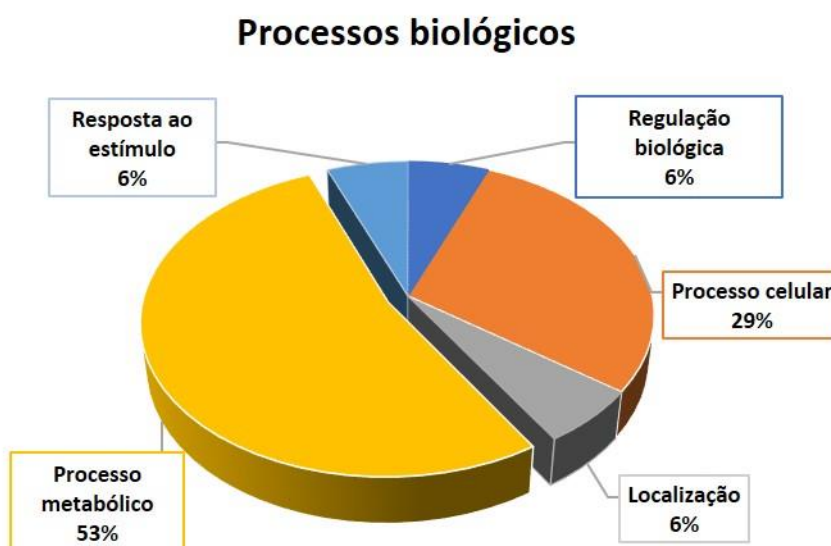
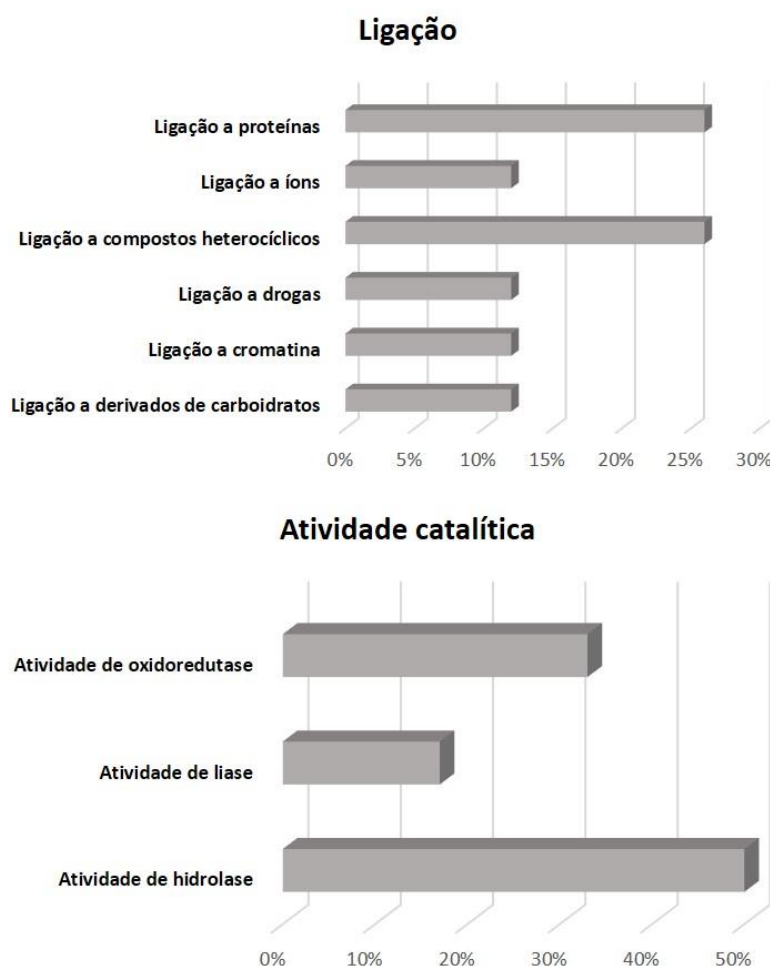


Figura 46. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.



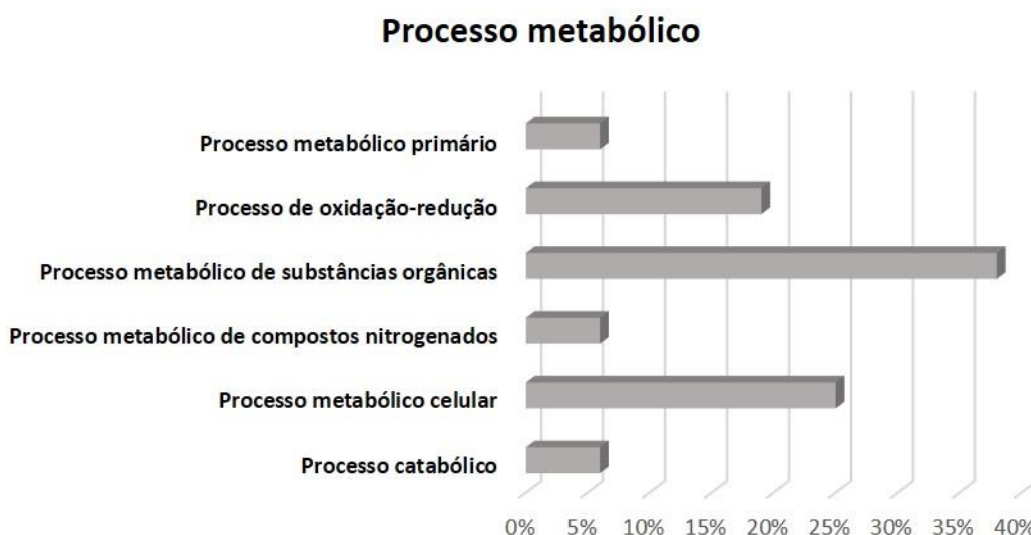
Entre as funções moleculares, a maioria das proteínas (43%) apresentam função primária de ligação (GO:0005488) e de atividade catalítica (GO:0003824). Dentro da função primária de ligação, as atuações secundárias correspondem à ligação a derivados de carboidratos (GO:0097367); ligação a cromatina (GO:0003682); ligação a drogas (GO:0008144); ligação a compostos heterocíclicos (GO:1901363), ligação a íons (GO:0043167) e ligação a proteínas (GO:0005515) (Figura 45). Por sua vez, a atuação de atividade catalítica apresenta atuações secundárias como atividade de hidrolase (GO:0016787), atividade de liase (GO:0016829) e atividade de oxidoreductase (GO:0016491) (Figura 47).

Figura 47. Distribuição das proteínas identificadas nas funções moleculares de ligação e atividade catalítica encontradas nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.



Entre os processos biológicos, as proteínas se encontram majoritariamente com atuação no processo metabólico (53%). Dessa atuação primária, as funções secundárias são referentes ao processo catabólico (GO:0009056), processo metabólico celular (GO:0044237), processo metabólico de compostos nitrogenados (GO:0006807), processos metabólicos de substâncias orgânicas (GO:0071704), processo de oxidação-redução (GO:0055114) e processo metabólico primário (GO:0044238) (Figura 48).

Figura 48. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico de processo metabólico encontrado nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do mímico do miRNA-1914-5p.



Analisando detalhadamente algumas proteínas encontradas nessa condição de cultivo, observamos possíveis atuações importantes no processo pró-esteatótico estudado, como a maior presença de vias energéticas como o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e vias de regulação transcricional por epigenética.

A proteína *ATP synthase subunit beta* (ATP5B) é uma subunidade da ATP sintase mitocondrial, responsável por catalisar a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa. Sua expressão alterada pode ser encontrada em algumas células de glioma neoplásico e glioblastoma, além de também apresentar RNAm alto em ratos obesos (MOTA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019a). Outras proteínas envolvidas com as vias energéticas também foram encontradas como a proteína *dihydrolipoamide dehydrogenase* (DLD). Ela é uma oxidoreductase que atua como o terceiro componente de alguns complexos enzimáticos como piruvato desidrogenase e

α -cetoglutarato desidrogenase. Tem como principal função catalisar a regeneração da forma oxidada através da reação com NAD⁺ para a formação de NADH (MAYR *et al.*, 2014; SZABO *et al.*, 2019). A *fumarate hydrogenase* (FH) é uma das enzimas do TCA. Sua principal função consiste na adição irreversível de uma molécula de água na molécula de fumarato para a produção de malato. O malato pode continuar no ciclo para a obtenção de energia através da fosforilação oxidativa ou pode ser transportado para o citosol para a gliconeogênese. FH pode ser considerado como um supressor tumoral e sua ausência resulta no acúmulo de fumarato, que pode agir como um promotor cancerígeno (HE *et al.*, 2016; SAJNANI *et al.*, 2017).

Além disso, proteínas atuantes na via oxidativa também se apresentam como a *very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD). Ela é uma das primeiras enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa. Está localizada na membrana mitocondrial interna e catalisa a desidrogenação de ésteres acil-CoA de cadeia longa de 12 a 18 carbonos (LI *et al.*, 2018; YAMADA; TAKETANI, 2018; LI *et al.*, 2019b). As funções proteicas descritas indicam que esteja ocorrendo na célula uma ativação de vias energéticas, seja a via do TCA ou a gliconeogênese. O ciclo do ácido tricarboxílico é responsável pela ligação entre a oxidação de lipídeos e a respiração celular. Sua atividade é altamente regulada pela produção de NADH (SATAPATI *et al.*, 2012; ANDERSON *et al.*, 2018). Por sua vez, a gliconeogênese ocorre através da presença de enzimas chaves como a piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), as quais produzem glicose a partir de piruvato. Sunny e colaboradores (2011), Satapati *et al.* (2012) e Patterson *et al.* (2016) demonstraram em seus estudos a alta ativação da via do TCA e da gliconeogênese em quadros de NAFLD, NASH e resistência a insulina, sendo relacionados fortemente com a alta presença de lipídeos. Pacientes com NAFLD e triglicérides intra-hepáticos apresentaram um aumento de aproximadamente 50% na anaplerose mitocondrial (SUNNY *et al.*, 2011), assim como ratos alimentados com uma dieta rica em gordura apresentaram uma elevada presença de vias do ciclo do TCA em resposta à perda de função da insulina (SATAPATI *et al.*, 2012).

Outra via que tem um papel importante na regulação da expressão gênica e consequentemente no estabelecimento de alguns quadros patológicos é a epigenética. A epigenética é conhecida por suas modificações na expressão de genes sem alterações na sequência do DNA. Assim sendo, essas modificações podem ocorrer de acordo com interações

do ambiente. As principais alterações são as modificações nas histonas através de acetilação ou desacetilação, metilações no DNA e a atuação de microRNAs (ESLAM; VALENTI; ROMEO, 2017; DEL CAMPO *et al.*, 2018). A atuação da epigenética na esteatose já foi demonstrada em alguns estudos. A metilação hepática de algumas enzimas envolvidas na biogênese mitocondrial, como o coativador 1 α de PPAR γ (PGC1- α), e na fosforilação oxidativa é correlacionada com a resistência à insulina e a presença de NAFLD. O mesmo resultado é encontrado em estudos em roedores, onde a suscetibilidade ao desenvolvimento de NASH é relacionada com uma diminuição na metilação do DNA e modificações na metilação de histonas (PIROLA *et al.*, 2012; ESLAM; VALENTI; ROMEO, 2017). Nesse sentido, as proteínas encontradas nessa análise podem apresentar grande importância no estabelecimento do quadro pró-esteatótico.

A proteína *ATPase family AAA domain- containing protein 2B* (ATAD2B) é conhecida por conter dois domínios importantes, o domínio AAA e o bromodomínio. O domínio N-terminal AAA é responsável pelo uso da energia de ligação do ATP para a participação em atividades celulares diversas como a transdução de sinais e a regulação da expressão gênica. Por sua vez, o domínio C-terminal bromodomínio é responsável pela ligação a motivos de lisina acetiladas, principalmente em histonas, podendo atuar na regulação do remodelamento da cromatina e no controle transcricional. ATAD2B possui pouco conhecimento sobre a sua função específica, entretanto, seu parálogo ATAD2 é bem estudado pela sua atuação nas histonas e por ter uma alta expressão em diferentes tipos de cânceres (LEACHMAN *et al.*, 2010; NTRANOS; CASACCIA, 2016; LLOYD; GLASS, 2018).

Assim como ATAD2B, a proteína *nuclear receptor corepressor 2* (NCOR2) é bastante estudada pela sua atuação na via transcricional, pela regulação lipídica, inflamatória e de estresse oxidativo. Especificamente, NCOR2 possui um domínio de ligação com enzimas desacetilases e um domínio de ligação com receptores nucleares. Quando os receptores nucleares como receptores do hormônio tireoideano (TRs), LXRs e RXRs se ligam a seus genes alvos, podem recrutar a NCOR2. Esta, por sua vez, pode recrutar desacetilases que atuam na regulação da transcrição gênica (GOODSON *et al.*, 2014; HEYMAN-LINDEN *et al.*, 2015; PRIVALSKI; SNYDER; GOODSON, 2016). Além de NCOR2, a proteína *zinc finger 366* (ZNF366) também já demonstrou atuar como um corepressor pela interação com desacetilases

de histonas (HDACs). Além disso, alguns estudos já demonstraram uma correlação entre a interação de ZNF366 com HDACs e com o receptor de estrógeno (ERs) em células de câncer de mama e com receptor de andrógeno (ARs) em células de câncer de próstata epitelial. Considerando que ZNF366 também possui domínio de ligação com outros receptores nucleares como o receptor retinóide X (RXRs) e os receptores de ativação por proliferação de peroxissomos (PPARs), a interação dos mesmos pode resultar na regulação da transcrição em células hepáticas (LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2006; ANSEMS *et al.*, 2010; SIEUWERTS *et al.*, 2010). Ademais, outra proteína importante encontrada é a vitronectina (VTN). A vitronectina é um fator de adesão celular encontrado na matriz extracelular e na corrente sanguínea como um componente do plasma. Está envolvida em diversos processos biológicos, como na regulação da coagulação, migração e cicatrização de feridas. É altamente expressa em células de hepatocarcinoma infectadas com o vírus da hepatite C e em cirrose hepática, sendo considerado como um importante biomarcador da disfunção hepática (CAO *et al.*, 2018; HAYASHIDA *et al.*, 2019).

Nas análises lipídica e gênica, se observa que o aumento da expressão do microRNA-1914-5p auxilia na piora da lipogênese de novo, consequentemente aumentando o acúmulo lipídico. Apesar desses dados obtidos, a análise proteômica não demonstrou proteínas com envolvimento específico nessas vias, porém, as proteínas indicadas podem regular de maneira indireta o quadro estabelecido.

As proteínas encontradas apenas nas células transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p são demonstradas no Quadro 4.

Quadro 4. Agrupamento das proteínas presentes nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p. No quadro foram consideradas proteínas pertencentes a espécie *Homo sapiens* e ortólogos de proteínas encontradas em *Homo sapiens* obtidas através da busca no banco de dados *liver Homo sapiens*. MM: Massa molecular. PIP: Probabilidade de identificação da proteína.

Proteínas presentes nas células transfectadas com 40 nM do inibidor do miR-1914-5p					
Nome da proteína	Código de acesso	MM (kDa)	PIP (%)	Função molecular	Processo biológico
40S ribosomal protein S3	P23396	27	98	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding; damaged DNA binding.	Nuclear transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay; DNA repair.
60S ribosomal protein L7	P18124	29	100	DNA binding; RNA binding.	Nuclear transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay; maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript.
ABC transporter ATP-binding protein	A0A0W8AIB6	26	94	Lipid transporter activity; ATP binding.	Lipid transport; transmembrane transport.
Acyl-CoA dehydrogenase	H8IP14	42	94	Acyl-CoA dehydrogenase activity; butyryl-CoA dehydrogenase activity.	Fatty acid beta-oxidation; butyrate catabolic process.
AT-hook DNA-binding motif-containing protein 1	Q5TGY3	168	96	DNA binding.	-

Beta-hexosaminidase subunit beta	P07686	63	100	Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; beta-N-acetylhexosaminidase activity.	Skeletal system development; carbohydrate metabolic process.
Cation-ATPase-N domain-containing protein	A0A1A6G085	58	96	-	-
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78527	469	100	Double-stranded DNA binding; RNA binding.	Telomere maintenance; somitogenesis.
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	Q9BQI3	71	94	Protein kinase activity; eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinase activity.	Acute inflammatory response; phagocytosis.
F-actin-uncapping protein LRRC16A	Q5VZK9	152	94	Protein binding; protein-containing complex binding.	Actin filament organization; blood coagulation.
Forkhead box protein J2	Q9P0K8	62	97	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding; protein binding.	Negative regulation of angiogenesis; positive regulation of transcription, DNA-templated.
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P0AC53	56	97	Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity; protein binding.	Glucose metabolic process; pentose-phosphate shunt.
Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 isoform 1	A0A0S2Z4X9	77	94	-	-

Liver carboxylesterase 1	P23141	50	94	Sterol esterase activity; triglyceride lipase activity.	Angiotensin maturation; cholesterol biosynthetic process.
Magnesium-translocating P-type ATPase	-	100	94	-	-
Monocarboxylate transporter 8	P36021	60	96	Transporter activity; monocarboxylic acid transmembrane transporter activity.	Thyroid hormone generation; monocarboxylic acid transport.
Nesprin-1	Q8NF91	-	100	RNA binding; actin binding.	Nucleus organization; Golgi organization.
NLR family member X1	Q86UT6	108	100	Protein binding; ATP binding.	Viral process; negative regulation of type I interferon production.
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	85	95	Protein binding; histone binding.	G1/S transition of mitotic cell cycle; blastocyst development.
Probable cation-transporting ATPase 13A4	Q4VNC1	134	94	ATP binding; ATPase activity; metal ion binding.	Cation transport; cellular calcium ion homeostasis.
Proteasome subunit alpha type-6	P60900	27	100	RNA binding; endopeptidase activity.	Mitotic S phase; mitotic anaphase.
Pyruvate carboxylase	H8ILQ1	121	96	Pyruvate carboxylase activity; protein binding.	Pyruvate metabolic process; gluconeogenesis.

Serine/threonine-protein kinase	Q96Q15	410	100	RNA binding; protein kinase activity.	Nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense mediated decay; DNA repair.
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	28	100	Protein binding; protein C-terminus binding.	Maternal placenta development; apoptotic process.
T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	Q13009	178	98	Guanyl-nucleotide exchange factor activity; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity.	Cardiac muscle hypertrophy; apoptotic process.
Uncharacterized protein similar to CCER2	A0A1A6GW10	35	96	-	-
Uncharacterized protein similar to DLG5	A0A1A6H063	187	96	Protein binding; beta-catenin binding.	Epithelial to mesenchymal transition; signal transduction.
Uncharacterized protein similar to NCOA4	A0A1A6HNF6	70	94	Transcription coactivator activity; androgen receptor binding.	Protein targeting to lysosome; cellular iron ion homeostasis.
Uncharacterized protein similar to NUP50	A0A1A6GF03	46	95	Protein binding.	Regulation of glycolytic process; mRNA export from nucleus.
Uncharacterized protein similar to SEC24B	A0A1A6HCY5	35	94	Protein binding; zinc ion binding.	Neural tube closure.
Zinc finger protein 14	A0A3L7HI42	64	94	DNA binding; metal ion binding.	Regulation of transcription, DNA-templated.

Com as análises realizadas no GO, é possível observar nas Figuras 49 e 50 as principais funções moleculares e processos biológicos obtidos, respectivamente.

Figura 49. Distribuição das proteínas identificadas em funções moleculares nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.

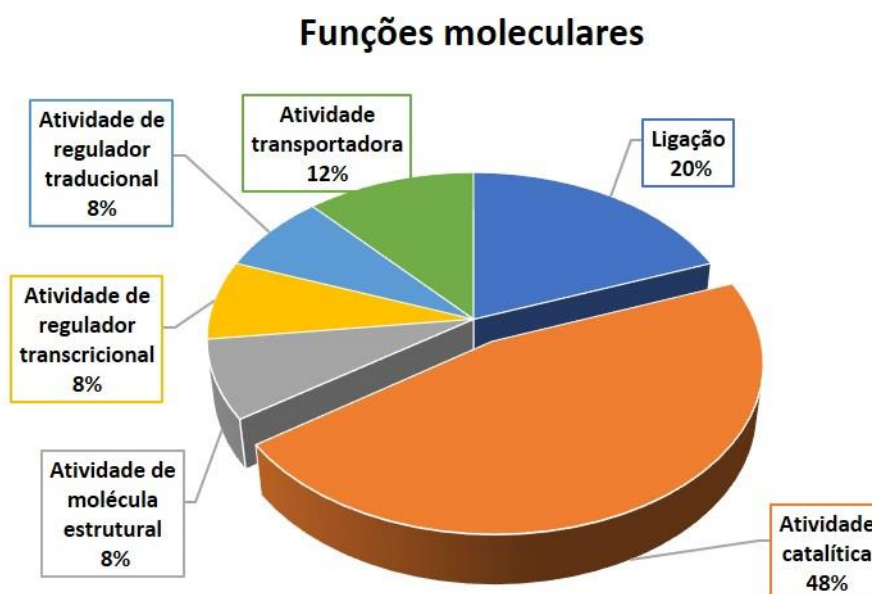
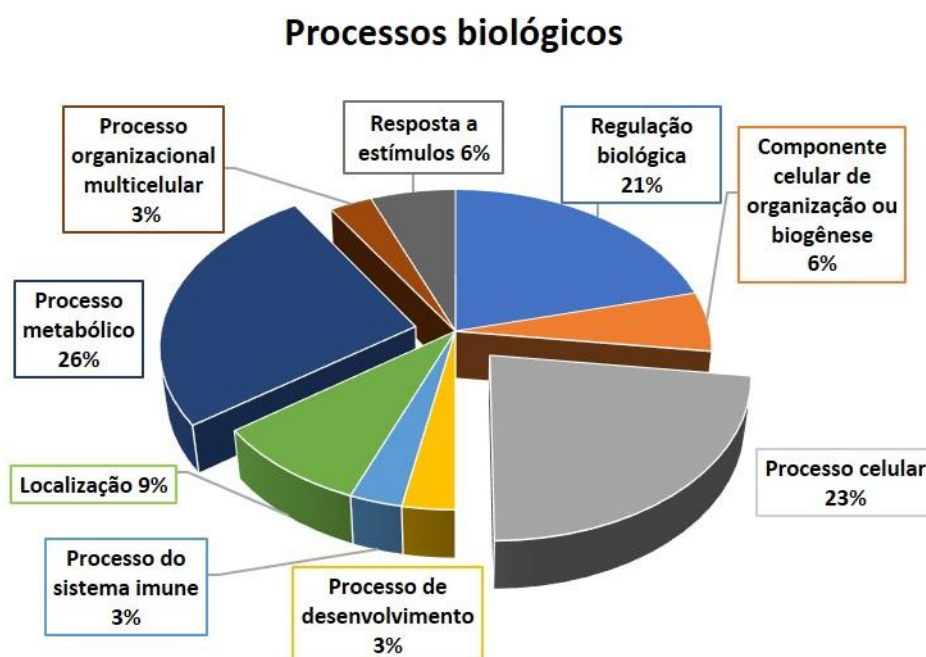
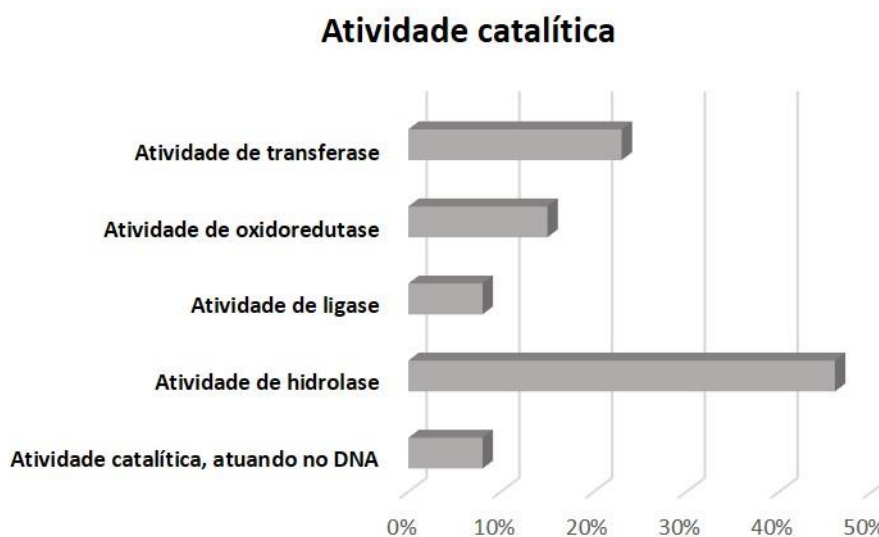


Figura 50. Distribuição das proteínas identificadas em processos biológicos nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.



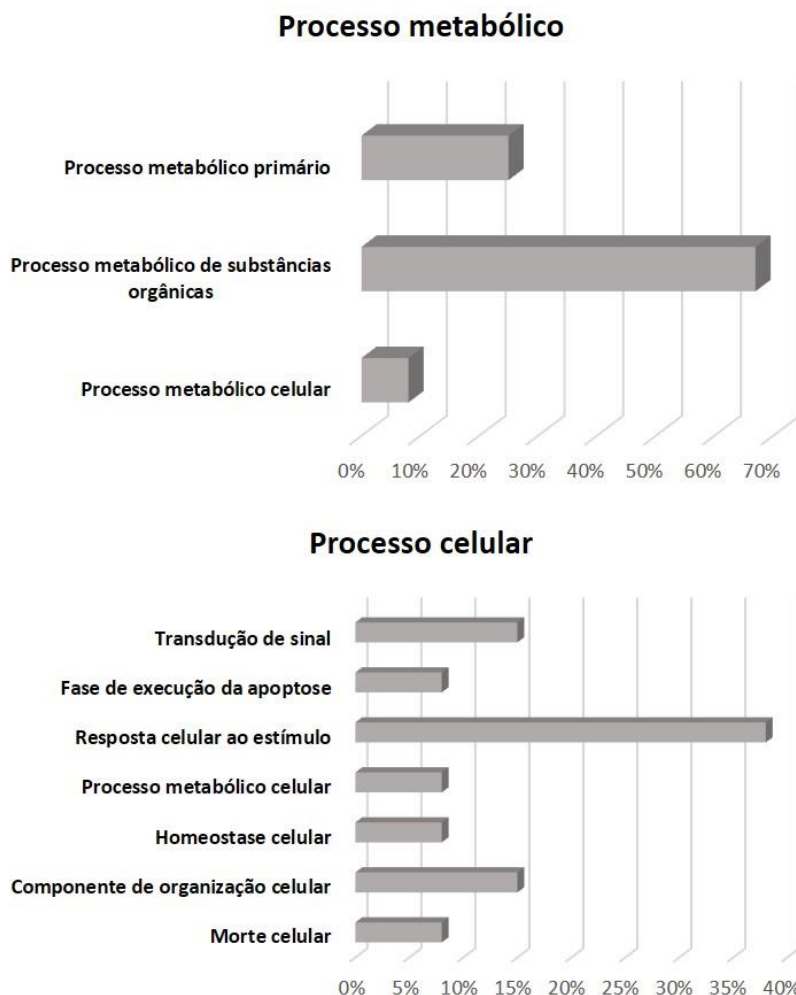
Entre as funções moleculares, a maioria das proteínas (48%) apresentaram função primária de atividade catalítica (GO:0003824). Dentro dessa função molecular, as atuações secundárias correspondem à atividade catalítica, atuando no DNA (GO: 0140097); atividade de hidrolase (GO: 0016787); atividade de ligase (GO: 0016874); atividade de oxidoreductase (GO: 0016491) e atividade de transferase (GO: 0016740) (Figura 51).

Figura 51. Distribuição das proteínas identificadas nas funções moleculares de atividade catalítica encontradas nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.



Entre os processos biológicos, se encontra mais proteínas atuando no processo metabólico (26%) e no processo celular (23%). Dessa atuação primária, as funções secundárias do processo metabólico são referentes ao processo metabólico celular (GO: 0044237); ao processo metabólico de substâncias orgânicas (GO: 0071704) e ao processo metabólico primário (GO: 0044238) (Figura 52). Por sua vez, as proteínas incluídas no processo celular se distribuem entre a morte celular (GO: 0008219); componente de organização celular (GO: 0016043); processo metabólico celular (GO: 0044237); homeostase celular (GO: 0019725); resposta celular ao estímulo (GO: 0051716); fase de execução da apoptose (GO: 0097194) e transdução de sinal (GO: 0007165) (Figura 52).

Figura 52. Distribuição das proteínas identificadas no processo biológico de processo metabólico e processo celular encontrado nas células HepG2 transfectadas com 40 nM do inibidor do miRNA-1914-5p.



Analisando as proteínas encontradas nessa condição de cultivo, se observa novamente algumas proteínas envolvidas em processos energéticos, como a gliconeogênese e a via das pentoses-fosfato e proteínas envolvidas em processos epigenéticos. Porém, há a presença de proteínas positivas e negativas para o quadro patológico, o que indicaria uma possível tentativa de homeostase.

Dentro dos processos energéticos, temos a proteína *pyruvate carboxylase* (PC), uma enzima mitocondrial cuja função principal é a produção de oxalacetato a partir da carboxilação de uma molécula de piruvato. Essa reação permite que o oxalacetato produzido possa ser convertido em outras substâncias que seguirão para o citosol onde poderão participar da síntese de carboidratos, lipídeos ou aminoácidos (MINET; GASTER, 2010; PHANNASIL *et al.*,

2017). Além da PC, a enzima *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) também pode atuar em vias energéticas. Sua função principal é a conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconolactona, acompanhado pela produção de NADPH. A 6-fosfogliconolactona continua na via das pentoses-fosfato, produzindo mais NADPHs sendo essencial para a manutenção do equilíbrio redox no organismo. Além disso, o metabólito final da via das pentoses-fosfato é crucial para a biossíntese de nucleotídeos em células proliferativas (PREUSS *et al.*, 2012; GÓMEZ-MANZO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018). Ademais, há também a presença da *short-chain acyl-CoA dehydrogenase* (ACADS). Essa enzima atua catalizando a etapa inicial da β -oxidação, principalmente tendo como substrato ácidos graxos de 4 carbonos como o butiril-CoA. Chen e colaboradores (2019) demonstraram que ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e que apresentavam deficiência em ACADS, também demonstraram uma diminuição na expressão de SREBP1c, contribuindo para diminuição da lipogênese *de novo* (DESSEIN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019b).

Assim como na condição celular de aumento do miRNA-1914-5p, a inibição do mesmo miRNA apresentou proteínas relacionadas com as vias epigenéticas, como as proteínas *nuclear autoantigenic sperm protein* (NASP) e *nuclear receptor coactivator 4* (NCOA4). NASP tem um papel central na manutenção da estabilidade de histonas H3 e H4 solúveis na cadeia de fornecimento de histonas. Quando ocorre a inibição de NASP há um alto declínio no suprimento de H3/H4 no citoplasma. Considerando que a demanda de histonas varia de acordo com as fases da divisão celular, essa proteína também pode atuar na regulação da progressão do ciclo celular e da proliferação (COOK *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2018). Por sua vez, NCOA4 atua como um coativador transcricional dependente de receptores nucleares. Ele pode interagir com diversos receptores nucleares como receptores de progesterona, de estrogênio, de glicocorticoides e de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) (KOLLARA; BROWN, 2012; BELLELLI *et al.*, 2014). Assim sendo, algumas respostas metabólicas encontradas nessa condição de cultivo, podem ser ocasionadas indiretamente por modulações epigenéticas.

Além dessas duas vias encontradas na condição de cultivo de aumento do miRNA-1914-5p, outras proteínas foram identificadas na inibição do miRNA, que indicam a tentativa de homeostase celular. As proteínas *T cell lymphoma invasion and metastasis 1* (TIAM1), *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (PRKDC), *ribosomal protein S3* (RPS3), *NOD-like*

receptor X1 (NLRX1), *proteasome subunit alpha type-6* (PSMA6) estão presentes na inibição do microRNA e já foram bem estudadas por suas características negativas, no sentido de auxiliar na proliferação, na piora de quadros patológicos e inflamação. A proteína *T cell lymphoma invasion and metastasis 1* (TIAM1) é um importante membro da família das Rho GTPases. Diversos estudos indicam uma associação entre a produção elevada de TIAM1 com processos de progressão tumoral, como adesão célula-célula, migração e transição epitélio-mesenquimal (CHEN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2018; DING; YANG; WU, 2019). Assim como TIAM1, a proteína *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (PRKDC) apresenta uma alta expressão em alguns tipos de cânceres. É uma serina/treonina quinase, componente essencial da maquinaria de reparo do DNA que atua especificamente na resposta a quebras da dupla fita e na manutenção da estabilidade genômica. Além disso, alguns estudos indicam atuação de PRKDC também na coordenação da dinâmica de microtúbulos e na mitose (FANG *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2017; SHIMIZU *et al.*, 2018). A proteína *ribosomal protein S3* (RPS3) é constituinte da subunidade ribossomal pequena 40 S e possui como funções extra-ribossomais importantes o reparo de DNA, apoptose e regulação transcricional. Além disso, RPS3 pode atuar na via do fator nuclear κ B (NF- κ B) em uma variedade de genes de resposta imune e proliferação celular. Sua alta expressão pode ser associada com a presença de células malignas e com a invasão de células tumorais (GRAIFER *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015).

Assim como RPS3, outras proteínas encontradas atuam na via de NF- κ B. *NOD-like receptor X1* (NLRX1) é uma proteína da família das NLRs que contém uma sequência alvo N-terminal mitocondrial. Suas principais funções envolvem a regulação negativa da atividade imune e a inibição da sinalização de NF- κ B, atuando como um ativador pró-inflamatório que estimula a produção de EROs. Kors e colaboradores (2018) demonstraram que a deficiência de NLRX1 tem atuação protetora contra o desenvolvimento da doença gordurosa hepática não-alcoólica, pois promove a oxidação de ácidos graxos (HONG; YOON; WILSON, 2012; KORS *et al.*, 2018). Outra proteína envolvida em vias inflamatórias é a *proteasome subunit alpha type-6* (PSMA6), que possui função importante na formação dos anéis α externos do proteassoma nuclear 20S. Sua alta expressão na célula pode aumentar a inflamação pela ativação de NF- κ B, porém, sua inibição pode induzir um quadro de apoptose celular (BURACZYNSKA *et al.*, 2016; KAKUMU *et al.*, 2017).

Em contrapartida, também se observa a presença de proteínas benéficas para o quadro celular, corroborando os resultados obtidos nas análises lipídicas e gênicas de que a inibição do microRNA-1914-5p pode atuar na homeostase. A proteína *liver carboxylesterase 1* (CES1) é responsável pela hidrólise de ésteres em ácidos carboxílicos e metabólitos alcoólicos que são excretados pelo organismo. Essa reação de detoxificação possibilita a diminuição de toxicidade ocasionada por metabólitos organofosforados. A superexpressão de CES1 em ratos foi responsável pela diminuição de aterosclerose, assim como em células McArdle-RH7777, a alta expressão possibilitou prevenção na acumulação de triglicérides. Corroborando esses resultados, estudos com a inibição de CES1 demonstraram um aumento no desenvolvimento de esteatose hepática e obesidade em ratos. Esses dados indicam que CES1 apresenta uma importante atuação na manutenção da homeostase hepática de triglicérides (ROSS *et al.*, 2012; QUIROGA *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2014; BJERRE; RASMUSSEN; INDICES CONSORTIUM, 2018). A proteína *serine/threonine protein kinase* (SMG-1) faz parte da família das proteínas quinases relacionadas ao fosfatidilinositol 3-quinase (PIKKs). Possui atuação em vias de crescimento celular, resposta ao estresse e proteção contra apoptose dependente do fator de necrose tumoral α (TNF α) indicando um papel na homeostase do organismo. Análises proteicas de tecidos de hepatocarcinoma indicaram uma diminuição na presença de SMG-1, da mesma forma, camundongos nocaute para a proteína apresentaram uma maior predisposição para a formação de tumores. Dessa forma, diversos estudos sugerem SMG-1 pode agir como um supressor tumoral pela inibição da sinalização da proteína alvo da Rapamicina (mTOR) (HAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; RESSEGUIE; BROOKES; O'REILLY, 2017).

Entre as proteínas que apresentam potencial benéfico estão também discs large homolog 5 (DLG5) é um membro da família de adaptadores de guanilato-quinase associados à membrana. É essencial para a manutenção de junções aderentes e da polaridade celular. Além disso, possui envolvimento na regulação de sinais dependentes do receptor do fator transformador do crescimento β (TGF β) e da transição epitélio-mesenquimal. Sua baixa expressão é encontrada em células tumorais agressivas e sua alta expressão é relacionada com a inibição da transição epitélio-mesenquimal e da progressão da fase G1-S através de regulação do homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e TGF β (LIU *et al.*, 2014; SHAFIEYOUN *et al.*, 2015; KE *et al.*, 2017). A proteína forkhead box J2 (FOXJ2) é um membro da família dos

fatores de transcrição Forkhead. FOXJ2 está envolvida na regulação positiva do ciclo celular, na diferenciação, apoptose, proliferação, migração e invasão celular. Wang et al. (2012) demonstraram que FOXJ2 inibe a migração e invasão de células de câncer de mama pela regulação da transição epitélio-mesenquimal. Da mesma forma, células de hepatocarcinoma apresentam uma baixa expressão de FOXJ2, indicando sua importante função na regulação da proliferação celular (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2016; YANG et al., 2016).

As proteínas encontradas nessa condição de cultivo corroboram os resultados obtidos nas análises lipídicas e gênica e fortalece a conclusão de que a inibição do miRNA-1914-5p não atua na piora ou na reversão do quadro pró-esteatótico.

7 CONCLUSÕES

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

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

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

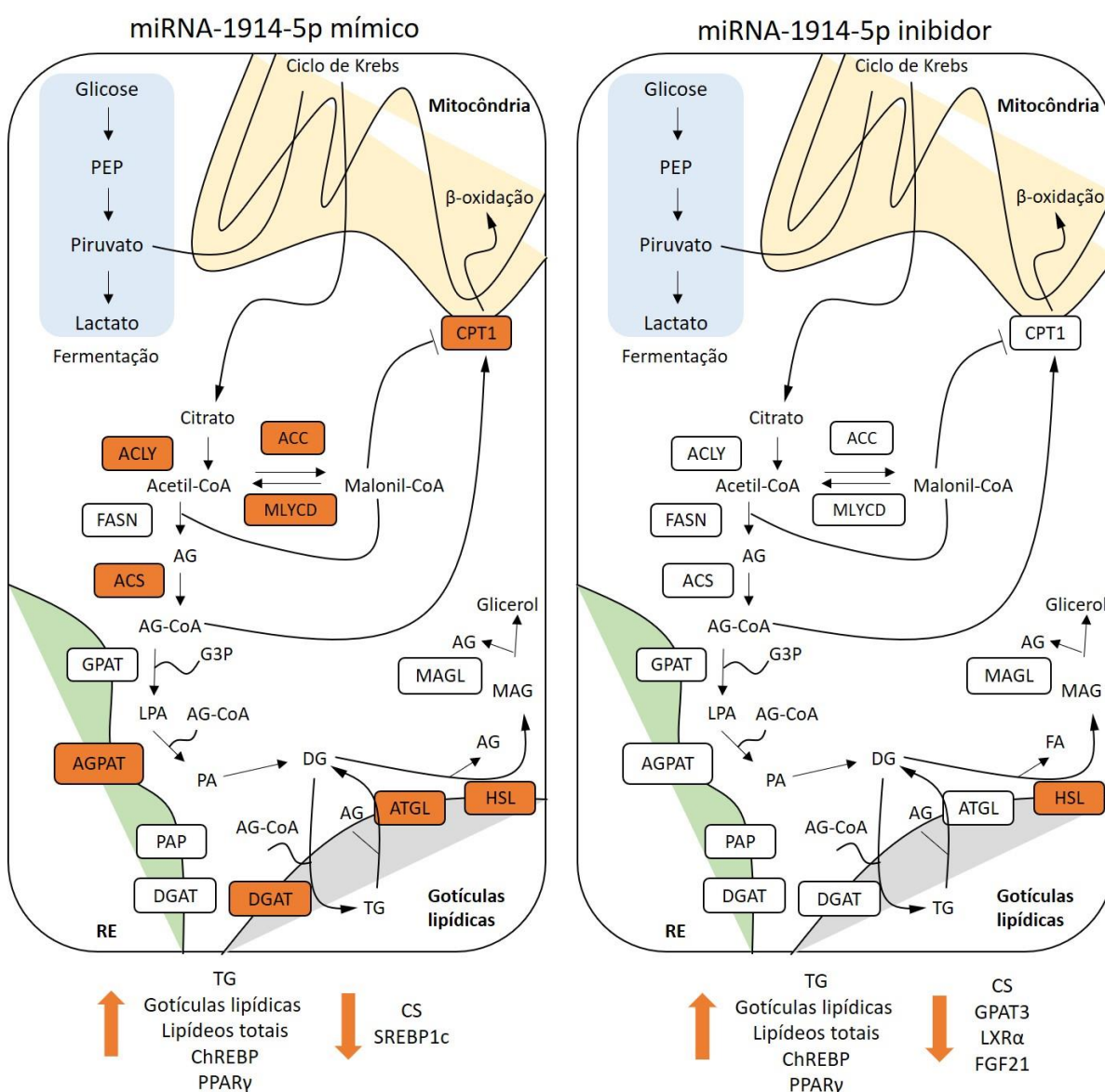
- Apresentaram um aumento nos níveis de triglicerídeos, lipídeos totais e gotículas lipídicas;
- Apresentam modulação de alguns genes importantes no metabolismo lipídico: aumentam os níveis transcricionais de *cd36*, *hsl*, *chrebp*, *ppary* e *atg7*.
- Apresentam modulação de alguns genes importantes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

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

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

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

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



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA-MÉNDEZ, A. *et al.* Hepatic Diseases Related to Triglyceride Metabolism. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1691-1699, set. 2013.
- ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E. Triglyceride Metabolism in the Liver. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, dez. 2017.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, [s.l.], v. 431, n. 7006, p.350-355, set. 2004.
- AMEER, F. *et al.* De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, [s.l.], v. 63, n. 7, p.895-902, jul. 2014.
- ANANIA, C. *et al.* Mediterranean diet and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 24, n. 19, p.2083-2094, mai. 2018.
- ANDERSON, N. M. *et al.* The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. **Protein & Cell**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.216-237, jul. 2018.
- ANSEMS, M. *et al.* Crosstalk and DC-SCRIPT: Expanding nuclear receptor modulation. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1806, n. 2, p.193-199, dez. 2010.
- ARAÚJO, A. *et al.* Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, [s.l.], v. 38, p.47-51, fev. 2018.
- ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 20, n. 44, p.16452-16463, nov. 2014.
- ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 49, n. 12, p.1405-1418, ago. 2015.
- AWASTHI, R. *et al.* Therapeutic prospects of microRNAs in cancer treatment through nanotechnology. **Drug Delivery And Translational Research**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.97-110, nov. 2017.
- BAI, X. *et al.* Influences of sterol regulatory element binding protein-1c silencing on glucose production in HepG2 cells treated with free fatty acid. **Lipids In Health And Disease**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-12, abr. 2019.
- BARB, D. *et al.* Plasma Fibroblast Growth Factor 21 Is Associated With Severity of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients With Obesity and Type 2 Diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 104, n. 8, p.3327-3336, mar. 2019.
- BARBERO-BECERRA, V. J. *et al.* The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1753-1758, out. 2015.

BARROS, B. *et al.* Type 1 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: When Should We Be Concerned? A Nationwide Study in Brazil. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.878-888, ago. 2017.

BATALLER, R.; GAO, B. Liver Fibrosis in Alcoholic Liver Disease. **Seminars In Liver Disease**, [s.l.], v. 35, n. 02, p.146-156, mai. 2015.

BELD, J.; LEE, D. J.; BURKART, M. D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. **Molecular Biosystems**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.38-59, jan. 2015.

BELLELLI, R. *et al.* NCOA4 Transcriptional Coactivator Inhibits Activation of DNA Replication Origins. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.123-137, jul. 2014.

BETTERMANN, K.; HOHENSEE, T.; HAYBAECK, J. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.9924-9944, jun. 2014.

BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs. **Veterinary Pathology**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.759-774, set. 2013.

BJERRE, D.; RASMUSSEN, H. B.; CONSORTIUM, T. I. Novel approach for CES1 genotyping: integrating single nucleotide variants and structural variation. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.349-359, mar. 2018.

BOONE, A. N. *et al.* Regulation of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.223-227, abr. 2006.

BOWMAN, T. A. *et al.* Acyl CoA synthetase 5 (ACSL5) ablation in mice increases energy expenditure and insulin sensitivity and delays fat absorption. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.210-220, mar. 2016.

BURACZYNSKA, M. *et al.* Association between functional variant of inflammatory system gene (PSMA6) and end-stage kidney disease. **International Urology And Nephrology**, [s.l.], v. 48, n. 12, p.2083-2087, set. 2016.

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

CAI, J.; ZHANG, X.; LI, H. Progress and challenges in the prevention and control of nonalcoholic fatty liver disease. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.328-348, mai. 2018.

CANBAY, A.; BECHMANN, L.; GERKEN, G. Lipid Metabolism in the Liver. **Zeitschrift Für Gastroenterologie**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.35-41, jan. 2007.

CAO, J. *et al.* Mice deleted for GPAT3 have reduced GPAT activity in white adipose tissue and altered energy and cholesterol homeostasis in diet-induced obesity. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 306, n. 10, p.1176-1187, mai. 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE

Quadro A1. Agrupamento das proteínas presentes nas células HepG2 controle. No quadro foram consideradas proteínas pertencentes a espécie *Homo sapiens* e ortólogos de proteínas encontradas em *Homo sapiens* obtidas através da busca no banco de dados *liver Homo sapiens*. MM: Massa molecular. PIP: Probabilidade de identificação da proteína.

Proteínas presentes no controle celular			
Nome da proteína	Código de acesso	MM (kDa)	PIP (%)
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	P61604	11	100
14-3-3 domain-containing protein	A0A1A6GSA4	25	100
14-3-3 domain-containing protein	A0A1A6HK93	26	100
14-3-3 protein epsilon	P62258	29	100
14-3-3 protein theta	P27348	28	100
14-3-3 protein zeta/delta	P63104	30	100
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9UNM6	43	100
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	P0A6R0	43	94
40S ribosomal protein	A0A061HTF9	23	100
40S ribosomal protein S16	P62249	16	100
40S ribosomal protein S18	P62269	18	98
40S ribosomal protein S2	P15880	31	100
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195	68	100
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	61	100
60S acidic ribosomal protein P1	G3HSN7	11	100
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	12	100
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	P00350	51	95
ABC transporter ATP-binding protein	A0A132P476	66	94
Abhydrolase_3 domain-containing protein	I2AEL3	33	96
Aconitate hydratase B	P36683	98	97
Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase	F9EKT2	52	94
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2	Q10588	36	94
ADP-ribosylation factor 4	P18085	21	100
Alkaline phosphatase, germ cell type	P10696	57	100
Alpha-enolase	P06733	47	100
Annexin A1	P04083	39	100
Annexin A2	P07355	39	100
Annexin A5	P08758	36	100
Apolipoprotein L2	Q9BQE5	37	97
Arginine transporter	A0A0U3EDT9	36	99
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	60	100
ATP synthase subunit beta	A0A162IPY3	51	97
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	57	100
ATP-binding cassette sub-family G member 1	P45844	87	94
Beta-actin-like protein 2	Q562R1	42	100
C1ORF109	RLQ74310	18	97
Calmodulin-lysine N-methyltransferase	Q7Z624	36	96
Calnexin	P27824	68	100
Calreticulin	P27797	48	98
Carbamoyl phosphate synthase large subunit	K1SKE0	20	94
Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	P31327	166	100

Carboxylating nicotinamide-nucleotide diphosphorylase	A0A174WV77	31	94
Centromere protein U	Q71F23	48	95
Ceruloplasmin	P00450	122	96
Chaperone protein DnaK	P0A6Y8	69	95
Clathrin heavy chain 1	Q00610	192	100
Coatomer subunit beta	M7W4K5	95	95
Cofilin-1	P23528	19	100
Collagen alpha-2 (IV) chain	P08572	168	95
Collagen alpha-3 (IV) chain	Q01955	162	100
Creatine kinase brain isoform 1	V9HWH2	43	100
CYP7B1 protein	Q05C57	53	95
Cytosolic beta-glucosidase	Q9H227	54	95
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	P33316	27	100
Dipeptidyl carboxypeptidase	P24171	78	97
DNA topoisomerase 1	P11387	91	94
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78527	469	100
Elongation factor 1-delta	P29692	31	99
Elongation factor 1-gamma	P26641	50	100
Elongation factor 2	P13639	95	100
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	P11021	72	100
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	P14625	92	100
Eukaryotic translation initiation factor 5A	A0A1A6HPY8	16	100
Fatty acid synthase	P49327	273	100
Filamin-A	P21333	281	100
Formate hydrogenlyase	W9BD08	28	94
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	39	100
GDP-L-fucose synthase	P32055	36	95
Glucose-6-phosphate isomerase	P06744	63	100
Glutamine—tRNA ligase	M7SBX9	64	94
Glutamyl-tRNA synthetase	K1T505	12	95
Glutathione S-transferase omega-1	P78417	25	100
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	36	100
Golgin subfamily A member 4	Q13439	261	97
Heat shock 70 kDa protein 1B	P0DMV9	70	100
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	71	100
Heat shock protein beta-1	P04792	23	100
Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	85	100
Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	83	100
HERV-H LTR-associating protein 3	Q9XRX5	13	96
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	51	100
Histidine—tRNA ligase	A0A133Q2G3	48	97
Importin subunit beta-1	Q14974	97	100
Insulin receptor substrate 1	P35568	132	97
Isoleucine—tRNA ligase	K1S7R3	33	95
Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LoID	P75957	25	96
L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	37	100
L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	37	100
Macrophage migration inhibitory factor	P14174	12	100
Malate dehydrogenase, mitochondrial	P40926	36	100

Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	Q6UB35	106	96
MUC5AC	A0A3L7HX41	505	100
Multidrug resistance-associated protein	M7WPG9	182	94
Myosin -9	P35579	227	100
Myosin-10	P35580	230	100
NAP1L1	A0A0G1IGC6	43	100
Neuron navigator 1	Q8NEY1	202	98
Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	30	100
Obg-like ATPase 1	Q9CZ30	30	100
Olfactory receptor	A0A3L7HHR4	42	95
Pejvakin	Q0ZLH3	40	96
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18	100
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	24	100
Peroxiredoxin-1	Q06830	22	100
Peroxiredoxin-2	P32119	22	100
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	P30044	17	97
Peroxiredoxin-6	P30041	25	100
Phosphate import ATP-binding protein	P0AAH0	29	94
Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	M7W0V6	67	94
Phosphoglycerate kinase 1	P00558	45	100
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	29	100
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	A0A4S2EYZ8	136	97
Polyubiquitin-B	P0CG47	26	100
Profilin-1	P07737	15	100
Prostaglandin E synthase 3	Q15185	19	100
Protein disulfide-isomerase	P07237	57	100
Protein disulfide-isomerase A3	P30101	57	100
Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	48	100
Protein kinase, putative	M7WHG5	49	96
Protein kinase, putative	M7W8B3	38	95
Protein S100-A11	P31949	12	100
Protein S100-A6	P06703	10	100
Pyruvate kinase PKM	P14618	58	100
Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	51	100
Rab-GAP TBC domain-containing protein	A0A1A6H0L7	133	95
Rap-GTPase-activating protein, putative	M7WCB1	57	95
Ras-GTPase-activating-like protein IQGAP1	P46940	189	100
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Q13332	217	96
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	P23921	90	100
RRM domain-containing protein	A0A1A6H7I2	34	95
Serine/threonine protein kinase	M7X4H8	113	97
Serine/threonine-protein kinase WNK3	Q9BYP7	198	96
Serine—tRNA ligase	H1HG73	48	96
Sodium /glucose cotransporter 4	Q2M3M2	74	95
Squalene-hopene cyclase	A3PA30	73	96
T – complex protein 1 subunit beta	P78371	57	96
T – complex protein 1 subunit delta	P50991	58	100
T- complex protein 1 subunit gamma	P49368	56	100
Talin-1	Q9Y490	270	100
T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	58	100
Thioredoxin	P10599	12	100

Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Q16881	71	100
Transaldolase	P37837	38	100
Transcription elongation factor SPT5	O00267	121	95
Transferrin receptor protein 2	Q9UP52	89	94
Transgelin	A0A1A6GKR9	24	100
Transketolase	P29401	68	100
Triosephosphate isomerase	P60174	31	100
Tubulin alpha 1C chain	Q9BQE3	50	100
Tubulin alpha-4A chain	P68366	50	100
Tubulin beta chain	P07437	50	100
Uncharacterized protein similar to ARF5	A0A1A6GX44	20	100
Uncharacterized protein similar to KIF1B	A0A1A6HCX8	112	95
Uncharacterized protein similar to MDN1	A0A1A6HC61	21	96
Uncharacterized protein similar to RPLP0P6	A0A1A6HAF2	18	95
USP domain-containing protein	A0A1A6H4M5	270	94
Utrophin	P46939	394	100
Vang-like protein	A0A1A6HCX1	60	96
Vimentin	P08670	54	98
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	100
Zinc finger protein containing protein	M7WJR9	45	96
ZNF850	A0A3L7H1B2	133	94

Quadro A2. Agrupamento das proteínas presentes nas células HepG2 cultivadas com 400 μ M de AGs. No quadro foram consideradas proteínas pertencentes a espécie *Homo sapiens* e ortólogos de proteínas encontradas em *Homo sapiens* obtidas através da busca no banco de dados *liver Homo sapiens*. MM: Massa molecular. PIP: Probabilidade de identificação da proteína.

Proteínas presentes nas células cultivadas com 400 μM de AGs			
Nome da proteína	Código de acesso	MM (kDa)	PIP (%)
40S ribosomal protein S19, putative	M7W8Y7	18	96
40S ribosomal protein SA	P08865	33	99
Alanine—tRNA ligase, cytoplasmic	P49588	107	100
Amine oxidase [flavin-containing] B	P27338	59	96
Choriogonadotropin subunit beta variant 1	A6NKQ9	16	94
Coatomer subunit gamma 2	Q9UBF2	98	100
GDP-mannose 4,6-dehydratase	A0A174PY86	41	95
Glutathione S-transferase Mu 3	P21266	27	98
Guanine deaminase	A0A0U3EA75	48	98
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37	100
Impact, putative	M7VTN9	33	96
Importin N-terminal domain-containing protein	A0A1A6H6F1	116	100

KRAB domain-containing protein	A0A1A6HDL1	105	95
Nuclear mitotic apparatus protein 1	Q14980	238	94
OR4C13	A0A3L7HFE9	56	94
Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit gamma, putative	M7WCG4	140	98
Plastin-3	P13797	71	100
Postreplication repair protein hRAD18p variant	Q53H10	56	94

Quadro A3. Agrupamento das proteínas presentes na célula HepG2. No quadro foram consideradas proteínas pertencentes a espécie *Homo sapiens* e ortólogos de proteínas encontradas em *Homo sapiens* obtidas através da busca no banco de dados *liver Homo sapiens*. MM: Massa molecular. CT: controle, 400: 400 μ M de AGs, M: mímico do miRNA-1914-5p, I: inibidor do miRNA-1914-5p. Probabilidade de identificação da proteína acima de 94%. +: presença da proteína, -: ausência da proteína.

Nome da proteína	Código de acesso	MM (kDa)	Condições			
			CT	400	M	I
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	P61604	11	+	+	+	+
14-3-3 domain-containing protein	A0A1A6GSA4	25	+	+	-	-
14-3-3 domain-containing protein	A0A1A6HK93	26	+	-	-	-
14-3-3 protein épsilon	P62258	29	+	+	+	+
14-3-3 protein theta	P27348	28	+	+	+	-
14-3-3 protein zeta/delta	P63104	30	+	+	+	+
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	Q9UNM6	43	+	+	-	-
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	P0A6R0	43	+	-	-	-
40S ribosomal protein AS	P08865	33	-	+	-	-
40S ribosomal protein S13	P62277	17	-	-	+	-
40S ribosomal protein S16	P62249	16	+	-	-	-
40S ribosomal protein S18	P62269	18	+	-	+	+
40S ribosomal protein S19, putative	M7W8Y7	18	-	+	-	-
40S ribosomal protein S2	P15880	31	+	-	-	-
40S ribosomal protein S3	P23396	27	-	-	-	+
40S ribosomal protein S7	P62081	22	-	+	-	-
4F2 cell-surface antigen heavy chain	P08195	68	+	+	+	+
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	61	+	+	+	+
60S acidic ribosomal protein P1	G3HSN7	11	+	-	-	-
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	12	+	-	+	-
60S ribosomal protein L7	P18124	29	-	-	-	+
60S ribosomal protein L8	P62917	28	-	+	-	-
ABC transporter ATP-binding protein	A0A0W8AIB6	26	-	-	-	+
ABC transporter ATP-binding protein	A0A132P476	66	+	-	-	-
ABC transporter, ATP-binding protein	J3ACW0	93	+	-	-	-
Abhydrolase_3 domain-containing protein	I2AEL3	33	+	-	-	-
Aconitate hydratase B	P36683	98	+	-	-	-
Actin, cytoplasmic 2	P63261	42	+	+	+	+
Acyl-CoA dehydrogenase	H8IP14	42	-	-	-	+
Acyl-CoA synthetase	A0A0E7ZN45	63	-	-	-	+

Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase	F9EKT2	52	+	-	-	-
Adenylosuccinate lyase	A0A292DJY7	50	-	-	-	+
ADP/ATP translocase 2	P05141	33	-	-	+	+
ADP/ATP translocase 3	P12236	33	-	-	+	+
ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2	Q10588	36	+	-	-	-
ADP-ribosylation factor 4	P18085	21	+	-	-	-
A-kinase anchor protein 9	Q99996	453	-	-	-	+
Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	P49588	107	-	+	-	-
Alkaline phosphatase, germ cell type	P10696	57	+	-	+	+
Alpha-actinin-4	O43707	105	-	-	+	+
Alpha-enolase	P06733	47	+	+	+	+
Amine oxidase [flavin-containing] B	P27338	59	-	+	-	-
Annexin A1	P04083	39	+	-	-	-
Annexin A2	P07355	39	+	+	+	+
Annexin A5	P08758	36	+	-	-	-
Apolipoprotein A-I	P02647	19	-	-	+	+
Apolipoprotein L2	Q9BQE5	37	+	-	-	-
Arginine transporter	A0A0U3EDT9	36	+	-	-	-
Aspartate aminotransferase, mitochondrial	P00505	48	-	-	+	+
AT-hook DNA-binding motif-containing protein 1	Q5TGY3	168	-	-	-	+
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705	60	+	+	+	+
ATP synthase subunit b	J8W5C3	51	+	+	+	+
ATP synthase subunit beta	P9WPU5	53	-	-	-	+
ATP synthase subunit beta	A0A478FR01	-	-	-	+	-
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	P06576	57	+	+	+	+
ATPase family AAA domain-containing protein 2B	Q9ULI0	165	-	-	+	-
ATP-binding cassette sub-family G member 1	P45844	87	+	-	-	-
ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	A0A1R1GVC0	36	+	-	-	-
Beta-actin-like protein 2	Q562R1	42	+	-	-	-
Beta-hexosaminidase subunit beta	P07686	63	-	-	-	+
Biotin carboxylase	A0A174T523	59	-	-	-	+
BRCA1-associated protein	Q7Z569	67	+	-	-	-
C1ORF109	A0A3L7I8L9	18	+	-	-	-
Caib/baif family protein	H8IPE0	87	+	-	-	-
Calmodulin-lysine N-methyltransferase	Q7Z624	36	+	-	-	-
Calnexin	P27824	68	+	-	+	+
Calreticulin	P27797	48	+	-	+	-
Carbamoyl phosphate synthase large subunit	K1SKE0	20	+	-	-	-
Carbamoyl-phosphate synthase (ammonia), mitochondrial	P31327	166	+	+	+	+
Carboxylating nicotinate-nucleotide diphosphorylase	A0A174WV77	31	+	-	-	-
Cation_ATPase_N domain-containing protein	A0A1A6G085	58	-	-	-	+
Cation-translocating P-type ATPase	A0A4U5L379	160	-	-	-	+
CD44 antigen	P16070	82	-	-	+	+
Centromere protein U	Q71F23	48	+	-	-	-
Ceruloplasmin	P00450	122	+	-	-	-
Chaperone protein DnaK	P0A6Y8	69	+	-	-	-
Chitinase	A0A331LCR9	46	-	-	+	-

Choriogonadotropin subunit beta variant 1	A6NKQ9	16	-	+	-	-
Cilia- and flagella-associated protein 53	Q96M91	62	-	+	-	+
Clathrin heavy chain 1	Q00610	192	+	-	+	+
Coatomer subunit beta	M7W4K5	95	+	-	-	-
Coatomer subunit gamma-2	Q9UBF2	98	-	+	-	-
Cofilin-1	P23528	19	+	+	-	+
Collagen alpha-2(IV) chain	P08572	168	+	-	-	-
Collagen alpha-3(IV) chain	Q01955	162	+	-	-	-
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Q07021	31	-	-	-	+
Creatine kinase brain isoform 1	V9HWH2	43	+	-	-	-
CYP7B1 protein	Q05C57	53	+	-	-	-
Cytidine deaminase	A0A2B7YXP1	18	-	-	+	-
Cytosolic beta-glucosidase	Q9H227	54	+	-	-	-
Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	P33316	27	+	-	-	-
Dihydrolipoamide dehydrogenase, mitochondrial	P09622	54	-	-	+	-
Dipeptidyl carboxypeptidase	P24171	78	+	-	-	-
DNA topoisomerase 1	P11387	91	+	-	-	-
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	P78527	469	+	-	-	-
EF-hand domain family member A1 isoform 1	A0A0S2Z6V5	50	-	-	+	-
Elongation factor 1-alpha 1	P68104	50	+	+	+	+
Elongation factor 1-delta	P29692	31	+	-	+	-
Elongation factor 1-gamma	P26641	50	+	-	+	-
Elongation factor 2	P13639	95	+	+	+	+
Elongation factor Tu	A0A133CTY1	43	-	-	+	-
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	P11021	72	+	-	+	+
Endoplasmin	P14625	92	+	-	+	+
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	Q9BQI3	71	-	-	-	+
Eukaryotic translation initiation factor 5A	A0A1A6HPY8	16	+	+	+	+
Excitatory amino acid transporter 5	O00341	61	-	-	-	+
F-actin-uncapping protein LRRC16A	Q5VZK9	152	-	-	-	+
FadE36	H8IKU2	38	-	-	-	+
Fatty acid synthase	P49327	273	+	+	-	-
Filamin-A	P21333	281	-	-	+	-
Filamin-C	Q14315	291	-	-	+	-
Forkhead box protein J2	Q9P0K8	62	-	-	-	+
Formate hydrogenlyase transcriptional activator	A0A060VHZ6	28	+	-	-	-
Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	39	+	+	+	+
Fumarate hydratase, mitochondrial	P07954	50	-	-	+	-
Fumarate reductase flavoprotein subunit	A0A0C7KLC7	100	-	-	-	+
GDP-L-fucose synthase	P32055	36	+	-	-	-
GDP-mannose 4,6-dehydratase	A0A174PY86	41	-	+	-	-
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	P0AC53	56	-	-	-	+
Glucose-6-phosphate isomerase	P06744	63	+	+	+	-
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	P00367	61	-	-	-	+
Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 isoform 1	A0A0S2Z4X9	77	-	-	-	+

Glutamine--tRNA ligase	M7SBX9	64	+	-	-	-
Glutaminyl-tRNA synthetase	K1T505	12	+	-	-	-
Glutathione S-transferase Mu 3	P21266	27	-	+	-	-
Glutathione S-transferase omega-1	P78417	25	+	-	-	-
Glutathione S-transferase P	P09211	23	-	+	-	-
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	36	+	+	+	+
Glycoside hydrolase family 2 sugar binding protein	K1U6N4	60	+	-	-	-
GOLGB1	A0A3L7HRL5	454	-	-	+	-
Golgin subfamily A member 4	Q13439	261	+	-	-	-
Guanine deaminase	A0A0U3EA75	48	-	+	-	-
Heat shock 70 kDa protein 1B	P0DMV9	70	+	+	+	+
Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	71	+	+	+	+
Heat shock protein beta-1	P04792	23	+	-	-	-
Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	85	+	+	+	+
Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	83	+	+	+	+
Hemoglobin subunit alpha	P69905	15	-	-	+	+
Hemoglobin subunit beta	P68871	16	-	-	+	+
HERV-H LTR-associating protein 3	Q9XRX5	13	+	-	-	-
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	51	+	+	+	+
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	37	-	+	-	-
Histidine--tRNA ligase	A0A133Q2G3	48	+	-	-	-
Histone H1.4	P10412	22	-	-	+	+
Histone H2A	A0A1A6FVX2	15	-	-	+	+
Histone H2B	A0A1A6FVX5	14	-	-	+	+
Histone H4	P62805	11	-	-	+	-
Impact, putative	M7VTN9	33	-	+	-	-
Importin N-terminal domain-containing protein	A0A1A6H6F1	116	-	+	-	-
Importin subunit beta-1	Q14974	97	+	-	-	-
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-interacting protein-like 2	Q3MIP1	58	-	-	+	-
Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 1	Q6PFW1	160	-	-	-	+
Insulin receptor substrate 1	P35568	132	+	-	-	-
Isoleucine--tRNA ligase	K1S7R3	33	+	-	-	-
Keratin, type II cytoskeletal 7	P08729	51	-	-	+	+
Keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	54	-	-	+	-
KRAB domain-containing protein	A0A1A6HDL1	105	-	+	-	-
Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Q01650	55	-	-	+	-
Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein Lold	P75957	25	+	-	-	-
Liver carboxylesterase 1	P23141	50	-	-	-	+
L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	37	+	+	+	+
L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	37	+	+	+	+
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	P11279	45	-	-	+	-
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	P13473	45	-	-	+	+
Macrophage migration inhibitory fator	P14174	12	+	+	+	+

Malate dehydrogenase, mitochondrial	P40926	36	+	+	+	+
Mannose-P-dolichol utilization defect 1 isoform 1	A0A0S2Z4W8	27	-	-	+	-
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	Q9UPN3	838	-	+	-	-
Monocarboxylate transporter 8	P36021	60	-	-	-	+
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase,mitochondrial	Q6UB35	106	+	-	-	-
MUC5AC	A0A3L7HX41	505	+	-	-	-
Multidrug resistance-associated protein	M7WPG9	182	+	-	-	+
Myosin-10	P35580	230	+	-	+	-
Myosin-9	P35579	227	+	-	-	-
NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	I2AA13	35	-	-	-	+
NAP1L1	A0A061IGC6	43	+	+	-	-
NBPF domain-containing protein	A0A1A6H8V5	162	-	-	+	-
Nesprin-1	Q8NF91	-	-	-	-	+
Nesprin-2	Q8WXH0	796	-	-	-	+
Neuron navigator 1	Q8NEY1	202	+	-	-	-
Neutral amino acid transporter B (0)	Q15758	57	-	-	+	+
NLR family member X1	Q86UT6	108	-	-	-	+
Nuclear autoantigenic sperm protein	P49321	85	-	-	-	+
Nuclear mitotic apparatus protein 1	Q14980	238	-	+	-	-
Nuclear receptor corepressor 2	Q9Y618	274	-	-	+	-
Nuclear receptor corepressor 2	Q9Y618	-	-	-	+	-
Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	30	+	-	-	-
Obg-like ATPase 1	Q9CZ30	30	+	-	-	-
Olfactory receptor	A0A3L7HHR4	42	+	-	-	-
OR4C13	A0A3L7HFE9	56	-	+	-	-
OR4K15	A0A3L7INW8	100	-	-	+	+
Pejvakin	Q0ZLH3	40	+	-	-	-
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	18	+	+	+	+
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	24	+	+	+	-
Peroxiredoxin-1	Q06830	22	+	+	-	+
Peroxiredoxin-2	P32119	22	+	+	-	-
Peroxiredoxin-5, mitochondrial	P30044	17	+	-	-	-
Peroxiredoxin-6	P30041	25	+	+	+	-
Phosphate import ATP-binding protein PstB	P0AAH0	29	+	-	-	-
Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit gamma, putative	M7WCG4	140	-	+	-	-
Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	M7W0V6	67	+	-	-	-
Phosphoglycerate kinase 1	P00558	45	+	+	-	-
Phosphoglycerate mutase 1	P18669	29	+	+	-	-
Phosphoribosylformylglycinamide synthase	A6LEY1	136	+	-	-	-
Plastin-3	P13797	71	-	+	-	-
Polyubiquitin-B	P0CG47	26	+	-	-	-
Postreplication repair protein hRAD18p variant	Q53H10	56	-	+	-	-
Probable cation-transporting ATPase 13A4	Q4VNC1	134	-	-	-	+
Profilin-1	P07737	15	+	+	+	+
Prohibitin	P35232	30	-	-	+	+
Prohibitin-2	Q99623	33	-	-	+	+

Prosaposin	P07602	58	-	-	+	+
Prostaglandin E synthase 3	Q15185	19	+	-	-	-
Proteasome subunit alpha type-5	P28066	26	-	-	+	+
Proteasome subunit alpha type-6	P60900	27	-	-	-	+
Proteasome subunit beta type-3	P49720	23	-	-	+	-
Protein containing Glycoside hydrolase 97 domain protein	K1SLT6	38	-	-	-	+
Protein disulfide-isomerase	P07237	57	+	+	+	+
Protein disulfide-isomerase A3	P30101	57	+	-	-	-
Protein disulfide-isomerase A6	Q15084	48	+	+	+	+
Protein kinase, putative	M7WHG5	49	+	-	-	-
Protein kinase, putative	M7W8B3	38	+	-	-	-
Protein S100-A11	P31949	12	+	-	-	-
Protein S100-A6	P06703	10	+	-	-	-
Protein unc-80 homolog	Q8N2C7	-	-	-	+	-
Pyridoxine/ Pyridoxal/ pyridoxamine kinase	P40191	31	+	-	-	-
Pyruvate carboxylase	H8ILQ1	121	-	-	-	+
Pyruvate kinase PKM	P14618	58	+	+	+	+
Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	51	+	-	-	-
Rab GTPase activating protein, putative	M7VVJ1	73	+	-	-	-
Rab-GAP TBC domain-containing protein	A0A1A6H0L7	133	+	-	-	-
Rap GTPase-activating protein, putative	M7WCB1	57	+	-	-	-
Rap guanine nucleotide exchange factor 5 isoform 1	A0A0S2Z5S1	52	-	-	+	-
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	P46940	189	+	-	-	-
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	Q13332	217	+	-	-	-
Ribonucleoside-diphosphate reductase	Q53GZ5	90	+	+	-	-
RPL12	A0A3L7HCF2	24	+	-	-	-
RRM domain-containing protein	A0A1A6H7I2	34	+	-	-	-
Serine/threonine protein kinase	M7X4H8	113	+	-	-	-
Serine/threonine-protein kinase SMG1	Q96Q15	410	-	-	-	+
Serine/threonine-protein kinase WNK3	Q9BYP7	198	+	-	-	-
Serine--tRNA ligase	H1HG73	48	+	-	-	-
SMP-30/gluconolactonase/LRE domain-containing protein	I2AFG7	23	-	-	-	+
Sodium/glucose cotransporter 4	Q2M3M2	74	+	-	-	-
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	P04179	21	-	-	+	-
Talin-1	Q9Y490	270	+	+	-	-
T-complex protein 1 subunit beta	P78371	57	+	+	-	-
T-complex protein 1 subunit delta	P50991	58	+	+	-	-
T-complex protein 1 subunit epsilon	P48643	60	-	-	+	-
T-complex protein 1 subunit eta	Q99832	59	+	+	+	-
T-complex protein 1 subunit gamma	P49368	56	+	+	-	-
T-complex protein 1 subunit zeta	P40227	58	+	+	+	+
Thioredoxin	P10599	12	+	+	-	+
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Q16881	71	+	-	-	-
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P30048	28	-	-	-	+
T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1	Q13009	178	-	-	-	+
Transaldolase	P37837	38	+	+	-	-
Transcription elongation factor SPT5	O00267	121	+	-	-	-
Transferrin receptor protein 1	P02786	85	-	-	+	+

Transferrin receptor protein 2	Q9UP52	89	+	-	-	-
Transgelin	A0A1A6GKR9	24	+	-	-	-
Transketolase	P29401	68	+	+	+	+
Transketolase	A0A162J1L2	30	+	-	-	-
Translocon-associated protein subunit alpha	Q9CY50	32	-	-	+	+
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	P49755	25	-	-	+	+
Triosephosphate isomerase	P60174	31	+	+	+	+
Tubulin alpha-1C chain	Q9BQE3	50	+	+	+	+
Tubulin alpha-4A chain	P68366	50	+	+	-	+
Tubulin beta chain	P07437	50	+	+	+	+
Tumor protein D53	Q16890	22	-	-	+	-
Tumor protein D54	O43399	22	-	-	+	+
Uncharacterized protein similar to ARF5	A0A1A6GX44	20	+	-	+	+
Uncharacterized protein similar to CCER2	A0A1A6GW10	35	-	-	-	+
Uncharacterized protein similar to DLG5	A0A1A6H063	187	-	-	-	+
Uncharacterized protein similar to KIF1B	A0A1A6HCX8	112	+	-	-	-
Uncharacterized protein similar to MDN1	A0A1A6HC61	21	+	-	-	-
Uncharacterized protein similar to NCOA4	A0A1A6HNF6	70	-	-	-	+
Uncharacterized protein similar to NUP50	A0A1A6GF03	46	-	-	-	+
Uncharacterized protein similar to RPLP0P6	A0A1A6HAF2	18	+	-	-	-
Uncharacterized protein similar to SEC24B	A0A1A6HCY5	35	-	-	-	+
Uncharacterized protein similar to ZNF366	A0A1A6HGJ5	84	-	-	+	-
Uncharacterized protein similar to ZNF8	A0A1A6GXJ8	34	-	-	-	+
USP domain-containing protein	A0A1A6H4M5	270	+	-	-	-
Utrophin	P46939	394	+	-	-	-
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Q709C8	422	-	-	-	+
Vacuolar protein-sorting-associated protein 25	Q9BRG1	21	-	-	+	-
Vang-like protein	A0A1A6HCX1	60	+	-	-	-
Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P49748	70	-	-	+	-
Vimentin	P08670	54	+	-	+	+
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	31	+	-	+	+
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	P45880	32	-	-	+	+
VTN	A0A212D931	55	-	-	+	-
Zinc finger protein containing protein	M7WJR9	45	+	-	-	-
ZNF14	A0A3L7HI42	64	-	-	-	+
ZNF850	A0A3L7H1B2	133	+	+	-	-