

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRUNO QUINTANILHA FARIA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA ASSOCIADA AO METABOLISMO E CARACTERIZAÇÃO DO  
ESTRESSE OXIDATIVO**

**PATOS DE MINAS – MG  
DEZEMBRO DE 2020**

**BRUNO QUINTANILHA FARIA**

**PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA ASSOCIADA AO METABOLISMO E CARACTERIZAÇÃO DO  
ESTRESSE OXIDATIVO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra**

**PATOS DE MINAS – MG**

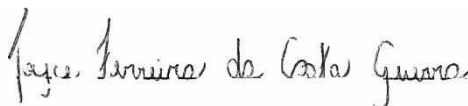
**DEZEMBRO DE 2020**

**BRUNO QUINTANILHA FARIA**

**Padronização de um modelo *in vitro* da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo e caracterização do estresse oxidativo**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:



Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra - IBTEC - UFU  
Presidente



Dra. Thaise Gonçalves de Araújo- IBTEC - UFU  
Membro



Dra. Mayara Medeiros de Freitas Carvalho – Instituto de Ciências da Saúde – UNEC  
Membro

Patos de Minas - MG, 02 de dezembro de 2020

## AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me agraciado com saúde e forças diariamente e por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida, além de me amparar em momentos de medo, tristeza, ansiedade e angústia.

Aos meus pais, pois mesmo com muitas dificuldades sempre lutaram para que eu tivesse a melhor educação possível e por sempre terem me incentivado e acreditado que eu seria capaz de superar os obstáculos impostos pela vida.

A minha orientadora e grande inspiradora, Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra, por me acolher em seu grupo de pesquisa e pelo grande conhecimento que adiquiri durante esses anos de convivência. Todo esse aprendizado me permitiu evoluir profissionalmente e intelectualmente. Além disso, durante esse período também aprendi lições de generosidade e caráter, que levarei durante toda a minha vida. Sou muito grato por você ser determinada e nunca ter desistido da pesquisa e continuar passando seu imenso conhecimento para todos os seus alunos.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, Luiza, Luiz Felipe e, especialme, ao Vinícius por ter estado comigo durante os vários momentos de tristeza e desmotivação que enfrentamos no laboratório, mas também por celebrar junto os momentos de felicidade.

Aos meus colegas de turma, especialme, ao Vinícius e a Brena por terem compartilhado os momentos de alegria e tristeza que passamos durante a graduação.

As professoras Dra. Thaise Gonçalves de Araújo e Dra. Mayara Medeiros de Freitas Carvalho, por terem aceitado participar da banca de defesa do trabalho de conclusão de curso.

Agradeço a todos os técnicos e professores da Universidade Federal de Uberlândia por todos esses anos de ensinamentos e comprometimento.

Agradeço as agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro fornecido para o desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) representa um amplo espectro de condições clínico-patológicas do fígado caracterizadas por acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos, podendo evoluir para esteato-hepatite, fibrose e por fim a cirrose e carcinoma hepatocelular. A etiopatogênese da MAFLD é multifatorial e assintomática e, embora seus mecanismos moleculares ainda não sejam compreendidos, o estresse oxidativo é considerado o principal determinante. Portanto, objetivou-se neste estudo padronizar um modelo *in vitro* da MAFLD em células da linhagem HepG2. Para indução do acúmulo de lipídeos as células foram mantidas em meio DMEM, privadas de soro fetal bovino por 24 horas e então incubadas com os ácidos graxos, palmítico (0,7mM) ou mistura dos ácidos oleico e palmítico (1mM e 2mM) na proporção de 2:1, respectivamente. Para a quantificação do teor intracelular de lipídeos as células foram coradas com Oil red O, a viabilidade celular e a citotoxicidade foram avaliadas através da técnica de MTT e liberação de LDH, respectivamente, o dano hepatocelular pela liberação de aminotransferases hepáticas e o estresse oxidativo através da quantificação dos biomarcadores de peroxidação lipídica e dos níveis de glutathiona total. O teor de lipídeos foi significativamente maior em células expostas a mistura de ácidos graxos nas concentrações de 1 e 2mM, não sendo observado redução da viabilidade ou aumento dos níveis de aminotransferases e liberação de LDH. O biomarcador de peroxidação lipídica também não aumentou após o tratamento, mas níveis reduzidos de glutathiona total foram evidenciados. Os resultados obtidos demonstram que o modelo proposto foi eficiente em induzir esteatose e estresse oxidativo em células HepG2, principalmente quando expostas as concentrações de 1 e 2mM da mistura lipídica.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Células HepG2. Espécies reativas de oxigênio. Esteatose hepática. Glutathiona.

## ABSTRACT

*Metabolism-associated fatty liver disease (MAFLD) represents a wide spectrum of clinical and pathological conditions of the liver characterized by the accumulation of triacylglycerols in hepatocytes, which may progress to steatohepatitis, fibrosis and eventually to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The etiopathogenesis of MAFLD is multifactorial and asymptomatic and, although its molecular mechanisms are not yet understood, oxidative stress is considered the main determinant. Therefore, the aim of this study was to establish an in vitro model of MAFLD in HepG2 cells. To fat-overloading induction, cells were kept in DMEM medium, deprived of fetal bovine serum for 24 hours and then incubated with fatty acids, palmitic (0.7mM) or mixture of oleic and palmitic acids (1mM and 2mM) in proportion 2: 1, respectively. To quantify the intracellular lipid content, cells were stained with Oil red O, cell viability and cytotoxicity were evaluated using the MTT and LDH release techniques, respectively, hepatocellular damage by the release of liver aminotransferases and oxidative stress through quantification of lipid peroxidation biomarkers and total glutathione levels. The lipid content was significantly higher in cells exposed to a mixture of fatty acids at concentrations of 1 and 2mM, with no reduction in viability or increased levels of aminotransferases and LDH release. The lipid peroxidation biomarker also did not increase after treatment, but reduced levels of total glutathione were evidenced. The results obtained demonstrate that the proposed model was efficient in inducing steatosis and oxidative stress in HepG2 cells, especially when exposed to concentrations of 1 and 2mM of the lipid mixture.*

*Keywords: Fatty acids. HepG2 cells. Oxygen-reactive species. Hepatic steatosis. Glutathione.*

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AGL: Ácidos graxos Livres  
AKT: Serina/treonina-cinase  
ALT: Alanina aminotransferase  
AMP: Adenosina 3',5'-monofosfato  
AMPK: Proteína cinase ativada por AMP  
AO: Ácido oleico  
AP: Ácido palmítico  
ApoB100: Apolipoproteína B100  
AST: Aspartato aminotransferase  
ATF4: Fator de transcrição 4  
ATF6: Fator de transcrição 6  
ATP: Adenosina trifosfato  
BCL-2: Linfoma de células B2  
BSA: Albumina sérica bovina  
CD36: cluster de diferenciação 36  
CHOP: Proteína homóloga do fator de transcrição C / EBP  
DAG: Diacilgliceróis  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DTNB: Reagente de Ellman (5,5'-ditio-bis- [ácido 2-nitrobenzoico])  
ER: Retículo endoplasmático  
ETC: Cadeia transportadora de elétrons  
FABP: Proteínas específicas de ligação a ácidos graxos  
FAS: Sintase de ácidos graxos  
FATP: Proteínas de transporte de ácidos graxos  
GLUT4: transportador de glicose tipo 4  
Gpx: Peroxidases da glutathione reduzida  
GSH: Glutathione  
GSSH: Glutathione dissulfeto  
G6Pase: Glicose-6-fosfatase  
HFD: Dieta rica em gordura  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
IRE1 $\alpha$ : Proteína requerente de inositol 1 $\alpha$   
IRS: Substrato do receptor de insulina  
JNK: C-Jun N-terminal cinase  
L: Litros  
LDH: Lactato desidrogenase  
MAFLD: Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo  
mg: Miligramas  
mL: Mililitro  
mM: Milimolar  
mmol: Milimol  
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro  
mtDNA: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial  
MTT: (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de Difeniltetrazólio)  
MPTP: Poro de transição de permeabilidade mitocondrial

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
nmol: Nanomol  
NASH: Esteato-hepatite  
OH•: Radical hidroxil  
PBS: Tampão fosfato-salino  
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinase  
PERK: Receptor proteína cinase  
PKC-ε: Proteína cinase tipo C épsilon  
PPAR-α: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa  
PPAR-γ: Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama  
Prx: Peroxirredoxinas  
PUMA: Modulador de apoptose regulado positivamente por p53  
ROS: Espécies reativas do oxigênio  
SERCA: Retículo sarco / endoplásmico Ca<sup>2+</sup> - ATPase  
SREBP-1c: Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de estero  
TAG: Triacilgliceróis  
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TLR4: Complexo receptor toll-like 4  
TNB: Ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico  
TNF1: Receptor de fator de necrose tumoral 1  
TNF-α: Fatores de necrose tumoral alfa  
UPR: Resposta de proteína desdobrada  
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade



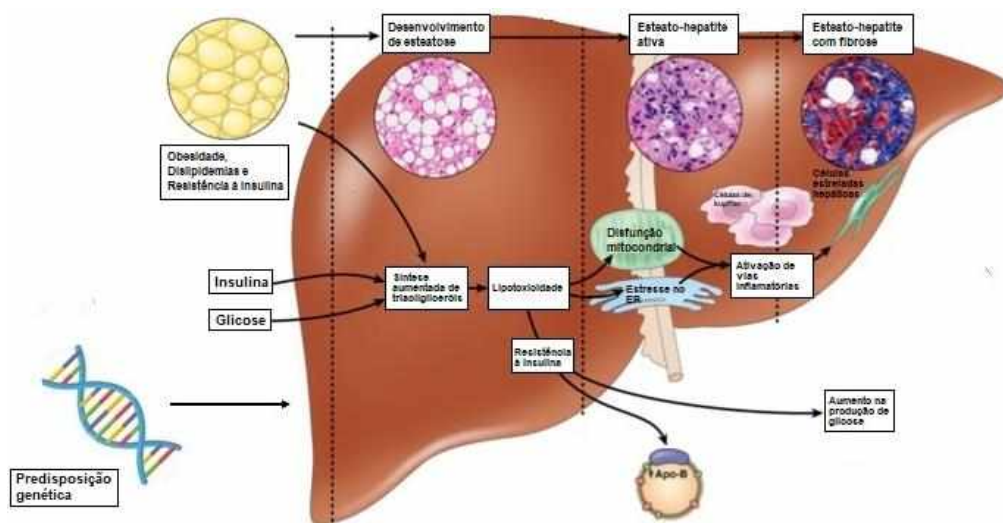
## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	10
1.2 Etiopatogênese.....	11
1.2.1 Resistência à insulina .....	11
1.2.2 Obesidade .....	13
1.2.3 Captação e destinos dos lipídios hepáticos.....	15
1.2.4 Alterações nas funções mitocondriais e estresse oxidativo .....	18
1.2.5 Estresse no retículo endoplasmático .....	22
1.2.6 Estratégias terapêuticas .....	24
1.3 Modelos propostos para estudos da MAFLD.....	25
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 Objetivo Geral .....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Cultura de células da linhagem HepG2 .....	27
3.2 Indução do acúmulo intracelular de lipídios .....	28
3.3 Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade .....	29
3.4 Avaliação do dano hepatocelular .....	30
3.5 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .....	30
3.6 Determinação de glutatona total.....	31
3.7 Análise estatística .....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1 Acúmulo de lipídios em células HepG2 .....	32
4.2 Viabilidade celular e citotoxicidade .....	34
4.3 Dano hepatocelular .....	36
4.4 Marcadores de estresse oxidativo .....	37
5 CONCLUSÃO .....	39
REFERÊNCIAS .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), nova nomenclatura dada à patologia antes denominada como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), é uma condição clínico-patológica do fígado caracterizada pelo acúmulo citoplasmático excessivo de triacilgliceróis (TAG) nos hepatócitos. Essa disfunção possui um curso potencialmente progressivo, podendo levar a quadros de esteato-hepatite (NASH), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (FOUAD et al., 2020; ANSTEE et al., 2019; YOUNOSSI, 2018). Embora os mecanismos moleculares exatos que impulsionam a progressão da doença ainda não sejam completamente esclarecidos, há uma clara associação com a obesidade, dislipidemias e resistência à insulina e devido a esta relação, tem sido considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (figura 1) (YOSHIOKA et al., 2020).

Figura 1- Patogênese da MAFLD



Fonte: AKSHINTALA et al., 2019.

A primeira teoria proposta para explicar o desenvolvimento e progressão da MAFLD considerava um processo patogênico de “dois *hits*”, no qual o “primeiro *hit*” consiste no aumento de gordura hepática, caracterizado pelo acúmulo de TAG (esteatose) e resistência à insulina, aumentando assim, a vulnerabilidade do fígado a eventos subsequentes. O “segundo *hit*” está associado a vários fatores, como estresse oxidativo, estresse no retículo endoplasmático (ER), citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial, o que, por sua vez, leva a quadros de esteato-hepatite e fibrose (CHAO et al, 2019; SCHWIMMER et al.,

2005). No entanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias e ensaios clínicos, essa visão se tornou simplista para elucidar a complexidade da MAFLD em humanos. Assim, essa teoria foi atualizada para o modelo de “múltiplos *hits*” que envolve diversos fatores envolvidos na etiopatogênese que podem agir de maneira paralela ou sequencial e de alguma forma sinérgica em indivíduos geneticamente predispostos, para causar MAFLD e, assim, definir o espectro fenotípico da doença (FANG et al., 2018; CHAO et al., 2019; DAY, 2006; et al., 2019)

### **1.1 Aspectos epidemiológicos**

A busca por nutrientes para suprir as necessidades básicas do organismo sempre exerceu uma importante influência nas ações humanas. Entretanto, as mudanças no estilo de vida nas últimas décadas, provocaram grandes modificações nos hábitos alimentares, tornando o consumo excessivo de calorias um fenômeno global (PINHEIRO, 2005; RINELLA; CHARLTON, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), a ingestão diária de quilocalorias per capita no mundo em 2015 foi 18,87% maior do que a consumida em 1964. Assim, doenças de origem metabólica, como obesidade, diabetes e a MAFLD, se tornaram cada vez mais comuns. Dados da Organização Mundial de Saúde (2020) demonstraram também que aproximadamente 39% dos adultos com 18 anos ou mais apresentavam sobrepeso em 2016 e 13% eram obesos. Paralelamente ao aumento da obesidade, o número de indivíduos afetados pela MAFLD também aumentou significativamente, sendo que aproximadamente 51% dos pacientes portadores da doença são obesos (YOUNOSSI et al., 2016).

Younossi et al. (2016) realizaram uma análise reunindo mais de 700 trabalhos publicados nos bancos de dados PubMed e MEDLINE entre 1989 e 2015 e demonstraram os resultados que estimam a prevalência, incidência e progressão da MAFLD. Segundo o estudo, a prevalência de MAFLD diagnosticada por imagem foi estimada em 25,24% da população global, sendo a América do Sul uma das regiões de maior incidência. Dentre os países latino-americanos, o Brasil é o que apresenta maior prevalência, alcançando aproximadamente 30% da população brasileira (ABDELMALEK, 2016). Além disso, de acordo com o mesmo estudo, entre os pacientes portadores da doença 59,10% possuem NASH e a incidência de fibrose avançada nesses indivíduos foi de aproximadamente 68 em 1.000 pessoas / ano (YOUNOSSI et al., 2016). Devido a sua alta prevalência, o impacto econômico no uso de serviços de saúde é enorme. Ghamar Chehreh et al. (2013) acompanharam 520 pacientes com MAFLD por dois anos para avaliar os custos com serviços de saúde e apresentaram os

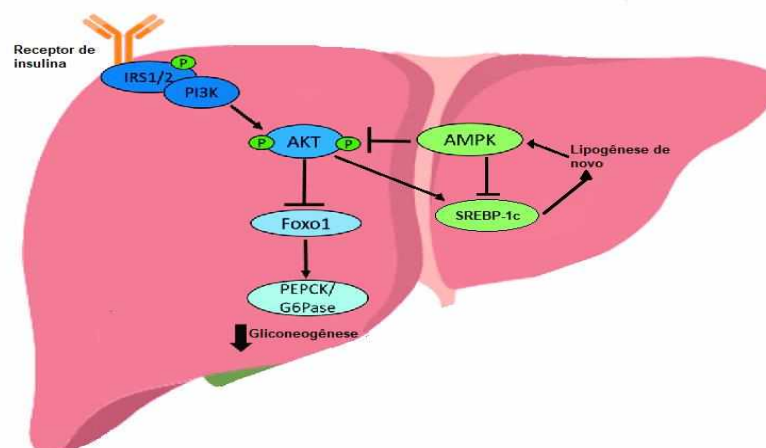
resultados em PPP \$ (Paridade do poder de compra), um indicador utilizado para determinar os valores relativos de duas moedas diferentes levando em consideração o impacto das taxas de câmbio. Segundo os pesquisadores, o custo anual para pacientes com MAFLD e suas comorbidades associadas é de PPP \$ 1 bilhão e aproximadamente PPP \$ 5043 por pessoa. Assim, a MAFLD constitui um importante problema de saúde pública na atualidade e um grande desafio devido ao seu impacto clínico, financeiro e social.

## 1.2 Etiopatogênese

### 1.2.1 Resistência à insulina

A sinalização da insulina é essencial para manutenção do metabolismo lipídico e de carboidratos no organismo. No estado pós-prandial, a concentração plasmática elevada desse hormônio, devido à hiperglicemia, ativa diretamente o receptor de insulina tirosina cinase, promovendo a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), como IRS-1 e IRS-2 que se ligam e ativam a fosfatidilinositol-3-cinase com subsequentemente ativação de uma serina/treonina-cinase (Akt). A fosforilação dependente de Akt suprime a expressões da glicose-6-fosfatase (G6Pase) e da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), resultando na inibição da produção hepática de glicose. Além disso, a insulina estimula a regulação positiva da sintase de ácidos graxos (FAS), aumentando a lipogênese hepática (figura 2). Assim, impactos na sinalização desse hormônio, são observados em diversas disfunções metabólicas (HONMA et al., 2018; SAMUEL; SHULMAN, 2016).

Figura 2 – Esquema da sinalização hepática da insulina



Fonte: GRAJALES; FERREIRA; VALVERDE, 2019.

Na MAFLD, irregularidades na sinalização da insulina são um importante fator que favorece a sua progressão. Em vários modelos experimentais da doença foi observada uma alteração nos níveis de fosforilação de IRS-2, o que, contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina. Além disso, foi observada também, uma regulação positiva na expressão de enzimas chave para gliconeogênese como a G6Pase e PEPCK, resultando na incapacidade de supressão da produção de glicose hepática. No entanto, a sinalização da insulina pela via lipogênica não foi suprimida, mas sim estimulada, indicando assim, que as desordens na sinalização da insulina no fígado esteatótico são limitadas à via que envolve a supressão da gliconeogênese, sendo considerada uma resistência seletiva à insulina (HONMA et al., 2018; NAKAMURA; TERAUCHI, 2013).

Uma análise realizada em amostras hepáticas de pacientes com MAFLD, demonstrou uma forte correlação positiva entre os níveis de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) de IRS-1 com os níveis de mRNA de FAS, mas não foram associados negativamente aos níveis de mRNA de PEPCK ou G6Pase. Por outro lado, os níveis hepáticos de mRNA do IRS-2 foram correlacionados negativamente com os níveis de mRNA PEPCK e G6Pase, não sendo observada associação entre as expressões IRS-2 e FAS, demonstrando que a expressão do IRS-1 está envolvida na regulação positiva de FAS, enquanto a regulação negativa do IRS-2 exerce um papel importante na supressão prejudicada da PEPCK e da G6Pase (HONMA et al., 2018). Além disso, em pacientes portadores da doença foi constatado também, que a expressão de IRS-1 está associada com níveis elevados de SREBP-1c (Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de estero), mas não com a expressão do IRS-2 (KOHJIMA et al., 2008).

Assim, a resistência seletiva à insulina no organismo superestimula as ilhotas de Langerhans em resposta a ineficiência na supressão da produção de glicose hepática, promovendo um aumento nos níveis plasmáticos de insulina. A hiperinsulinemia promove a constante ativação e expressão de IRS-2, com subsequente aumento de SREBP-1c, resultando assim, na regulação positiva da lipogênese de novo, agravando ainda mais o quadro de esteatose (CHAO et al., 2019; KOHJIMA et al., 2008; NAKAMURA; TERAUCHI, 2013).

Dessa forma, a deposição excessiva de ácidos graxos nos hepatócitos está claramente associada ao desenvolvimento da resistência à insulina na MAFLD. Muitos estudos apontam o acúmulo de certas espécies lipídicas como as ceramidas e os diacilgliceróis (DAG) no comprometimento na sinalização da insulina (BIRKENFELD; SHULMAN, 2014; SAMUEL; SHULMAN, 2016). Roedores alimentados com dieta hiperlipídica mostraram aumentos significativos nos níveis hepáticos de DAG. A concentração intracelular elevada desse lipídio

próximo à membrana leva à ativação de proteína cinase tipo C épsilon (PKC- $\epsilon$ ) que, por sua vez, inibe o receptor de insulina cinase, promovendo então, a diminuição da fosforilação de IRS-2 e a sinalização de insulina a jusante (SAMUEL et al., 2004). Verificou-se também, que a expressão hepática da PKC $\epsilon$  em camundongos *knockout* para o gene PKC $\epsilon$ , alimentados com dieta hiperlipídica, protegeu da resistência à insulina, apesar do desenvolvimento de esteatose hepática, determinando o papel específico e direto da PKC $\epsilon$  na aquisição da resistência à insulina (FRANGIOUDAKIS et al., 2009).

Além dos DAG, várias linhas de evidência apontam o papel das ceramidas na patogênese da resistência à insulina na MAFLD. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura juntamente com mirriocina, inibidor da serina palmitoil transferase 1, atenuou o aumento de ceramidas e melhorou a sensibilidade a insulina (HOLLAND et al., 2007). Assim, o acúmulo de metabólitos lipídicos específicos (diacilgliceróis e ceramidas) no fígado, devido a dietas ricas em ácidos graxos, demonstra ser uma importante via que leva a ineficiência na sinalização hepática da insulina (BIRKENFELD; SHULMAN, 2014; SAMUEL; SHULMAN, 2012).

### **1.2.2 Obesidade**

A obesidade, especialmente o acúmulo de gordura visceral, exerce um importante impacto nos tecidos envolvidos na regulação de nutrientes, sendo considerada um dos fatores de risco predominante para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Várias linhas de evidência indicam o crítico papel da inflamação crônica do tecido adiposo no desenvolvimento de disfunções metabólicas como resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão e MAFLD (LUMENG; SALTIEL, 2011; XU et al., 2003; JUNG; CHOI, 2014).

O tecido adiposo é considerado o principal local para o armazenamento do excesso de energia no organismo e um importante regulador do balanço energético sistêmico, sendo constituído de vários tipos celulares, incluindo, principalmente, adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais e células do sistema imunológico. Os adipócitos são células especializadas com capacidade para armazenar com segurança a energia excedente na forma de TAG (HAUSMAN et al., 2001; ABATE; SUMNER; CHANDALIA, 2013). Quando a energia é novamente requisitada, entre as refeições ou durante exercícios físicos, os TAG armazenados podem ser mobilizados através da lipólise para então serem liberados na circulação e usados por outros tecidos (BODEN, 1997).

No estado obeso, o aumento nas taxas de lipólise, especialmente no tecido adiposo visceral, promove um maior influxo de AGL (Ácidos graxos livres) para o fígado pela veia porta, aumentando o conteúdo lipídico no interior dos hepatócitos e desencadeando o desenvolvimento de esteatose (JUNG; CHOI, 2014). Os AGL são também ligantes do complexo receptor *toll-like 4* (TLR4) ligado à membrana e estimulam a produção de citocinas pro-inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento de complicações metabólicas associadas à obesidade (SHI et al., 2006).

Entretanto, o tecido adiposo não é somente o principal local de armazenamento do excesso de energia derivado da ingestão de alimentos, mas também, um órgão que desempenha uma importante função endócrina (JUNG; CHOI, 2014; MURAWSKA-CIAŁOWICZ, 2017). Esse tecido é responsável por secretar uma série de substâncias bioativas, como as quimiocinas e citocinas, que estão envolvidas na homeostase energética e inflamação. Além disso, essas substâncias estão associadas ao desenvolvimento e progressão da MAFLD (JUNG; CHOI, 2014; MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014). Indivíduos obesos apresentam um grande conteúdo de macrófagos no tecido adiposo, essas células são responsáveis por secretar quantidades expressivas de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (WEISBERG et al 2003; MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014). Essas citocinas suprimem a produção de algumas substâncias essenciais para a regulação do metabolismo lipídico no fígado, como a adiponectina, uma adipocina responsável por modular a resposta inflamatória e proteger o fígado de esteatose, pois aumenta a capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose, inibe a lipogênese através da regulação negativa do SREBP-1c e aumenta a oxidação de gordura hepática através da ativação da proteína cinase ativada por adenosina 3',5'-monofosfato (AMP) e da expressão do gene PPAR- $\alpha$  (Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa) (WEISBERG et al 2003; BERG et al., 2001; SHKLYAEV et al., 2013 YAMAUCHI et al., 2002). Em camundongos obesos com lesões hepáticas induzidas por lipopolissacarídeo, a adiponectina diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  e induziu a ativação de PPAR- $\alpha$ , diminuindo os danos ao fígado (MASAKI et al., 2004). HUI et al. (2004) realizaram um estudo em 109 pacientes com MAFLD e constataram que os níveis circulantes de adiponectina são mais baixos em indivíduos com a doença do que em controles saudáveis, indicando o importante papel protetor da adiponectina.

A leptina é outro importante regulador da MAFLD produzida no tecido adiposo, sendo responsável por estimular diretamente a proteína cinase ativada por AMP, que está envolvida na ativação da  $\beta$ -oxidação e glicólise, bem como na inibição da lipogênese. Ademais, a

leptina também atua na melhora da resistência à insulina hepática, pois suprime a atividade de esteroil-CoA desaturase, uma enzima que desempenha um papel importante no metabolismo e catalisa a reação limitante da taxa da síntese de ácidos graxos monoinsaturados (JUNG; CHOI, 2014; MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014). Em pacientes com esteatose, o nível de leptina sérica parece diminuir à medida que a lesão nos hepatócitos se desenvolve (SERIN et al., 2003). Além disso, análises realizadas em ratos diabéticos demonstraram que a infusão de adenovírus-leptina não apenas diminui a síntese hepática de TAG, mas também aumentou a  $\beta$ -oxidação através da regulação negativa de SREBP-1c e regulação positiva de PPAR- $\alpha$  (LEE et al., 2002).

### 1.2.3 Captação e destinos dos lipídios hepáticos

O fígado é o órgão central do metabolismo lipídico, desempenhando importante papel na síntese, exportação, redistribuição e utilização de ácidos graxos como substratos energéticos. Em condições fisiológicas, a concentração de TAG hepáticos é baixa, podendo se alterar em resposta à alimentação e ao jejum. Todos esses processos são rigidamente regulados por interações complexas entre hormônios, receptores nucleares e fatores de transcrição. Dessa forma, complicações nas vias que mantêm a homeostase do metabolismo lipídico podem resultar na retenção de gordura no fígado e o subsequente desenvolvimento de distúrbios metabólicos como a MAFLD (MASHEK, 2013; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018; GLUCHOWSKI et al., 2017).

Em indivíduos portadores de MAFLD os lipídios hepáticos são derivados principalmente da lipólise de TAG do tecido adiposo (60%), da lipogênese de novo (26%) e da hidrólise dos TAG da dieta (15%) (DONNELLY et al., 2005). Além disso, o influxo de ácidos graxos exógenos para o fígado depende em grande parte dos transportadores de ácidos graxos localizados na membrana dos hepatócitos, principalmente a família de proteínas de transporte de ácidos graxos, como as proteínas de transporte de ácidos graxos (FATP) 2 e 5, cluster de diferenciação 36 (CD36) e caveolinas (figura 3). A difusão passiva também exerce um importante papel na captação hepática de AGL, mas esse processo possui um impacto menor no influxo total (MASHEK, 2013; IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Estudos revelaram que camundongos *knockout* para o gene FATP5 reduziram a captação de ácidos graxos e o conteúdo de TAG hepáticos, indicando o importante papel de FATP na captação de hepática de lipídeos e no desenvolvimento de esteatose (DOEGE et al., 2006; DOEGE et al., 2008). Zhu et al. (2011) demonstraram também que a expressão gênica



de FATP2 e 5 foi aumentada em adolescentes com NASH em comparação com controles normais.

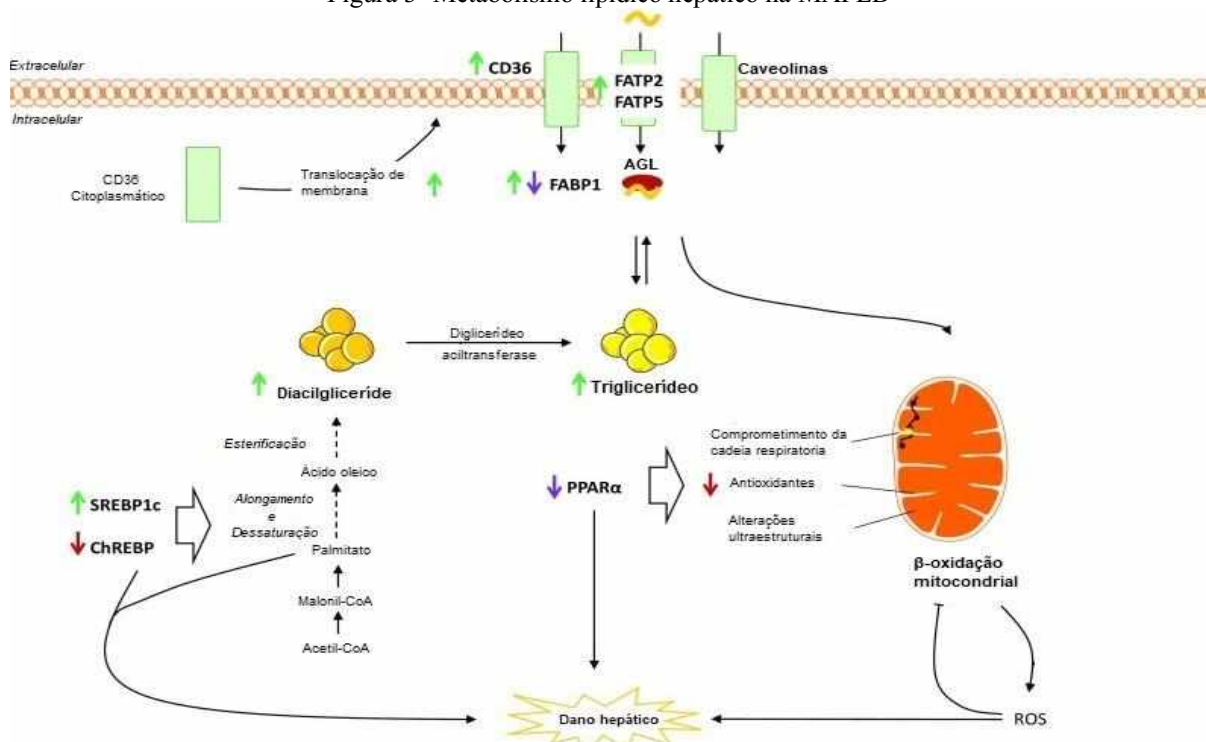
A proteína CD36, responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa, também é superexpressa no fígado esteatótico por meio da regulação transcricional de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- $\gamma$ ) (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Hepatócitos expostos ao ácido palmítico (AP) e ácido oleico (AO) aumentam a expressão de CD36 e da proteína de transporte de ácidos graxos FATP-2, aumentando a captação lipídica (CHABOWSKI et al., 2013). Ademais, ratos alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem esteatose hepática juntamente com o aumento dos níveis de mRNA de CD36 (KOONEN et al., 2007; WILSON et al., 2016). As caveolinas, uma família de três proteínas de membrana que desempenham um papel essencial no tráfico lipídico e na formação de gotículas lipídicas, são do mesmo modo superexpressas em pacientes portadores da doença (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). A expressão de caveolina 1 foi aumentada no fígado de camundongos com MAFLD e localizada principalmente nas regiões onde a esteatose era mais grave (QIU et al, 2013).

Devido à sua hidrofobicidade, os ácidos graxos não se difundem livremente no citosol e precisam ser transportados por proteínas específicas de ligação a ácidos graxos (FABP), sendo a isoforma FABP1 a mais predominante. A proteína FABP1 facilita o transporte, armazenamento e utilização de ácidos graxos, além de desempenhar um efeito protetor contra a lipotoxicidade, se ligando os AGL citotóxicos e facilitando sua oxidação ou incorporação em TAG (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Além disso, os níveis de FABP podem variar em pacientes com MAFLD de acordo com a gravidade da doença, níveis elevados de proteína FABP1 foram encontrados em indivíduos obesos com esteatose em comparação com controles, mas diminuíram em pacientes com NASH e fibrose. Assim, o aumento de FABP está correlacionado com os estágios iniciais da doença como mecanismo compensatório para eliminar a lipotoxicidade (CHARLTON et al., 2009).

Após a captação hepática, os ácidos graxos atuam como ligantes endógenos que ativam as vias reguladas por PPAR- $\alpha$ , responsável por aumentar a transcrição de genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação, promovendo maior oxidação de ácidos graxos e geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) (GEISLER; RENQUIST, 2017). Em pacientes com NASH a expressão de PPAR- $\alpha$  foi desregulada em comparação com indivíduos esteatóticos e saudáveis e diminuiu com a progressão para o estágio de fibrose (FRANCQUE et al., 2015). Assim, o aumento na expressão PPAR- $\alpha$ , com subsequente aumento da  $\beta$ -oxidação,

demonstra ser uma resposta adaptativa ao acúmulo de ácidos graxos hepáticos, que tenta reduzir a sobrecarga lipídica e a lipotoxicidade, mas também produz ROS e induz o estresse oxidativo (figura 3) (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Outro destino para os ácidos graxos no fígado é a lipogênese de novo. Através dessa via, os AGL são convertidos em TAG por uma série de etapas de dessaturação, alongamento e esterificação. Dessa forma, o aumento do conteúdo lipídico nos hepatócitos, pode promover o aumento da lipogênese de novo e subsequentemente causar esteatose e progressão da MAFLD, pois metabolitos lipídicos intermediários da síntese de TAG como o palmitato, podem desencadear processos inflamatórios e apoptose (LISTENBERGER et al., 2003).

Figura 3- Metabolismo lipídico hepático na MAFLD



Fonte: IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018.

Além da fosforilação oxidativa, a exportação de TAG é a única maneira de reduzir o conteúdo hepático de lipídios, sendo realizada em partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) hidrossolúveis. Essas partículas são formadas no ER em um processo catalisado pela enzima microsômica de transferência de TAG, responsável por transferir os TAG hepáticos para a apolipoproteína B100 (apoB100), cuja expressão é aumentada de acordo com a exposição dos hepatócitos a ácidos graxos. No entanto, a exposição prolongada pode levar ao estresse do ER e, conseqüentemente, a degradação pós-traducional da apoB100 (IPSEN; LYKKESFELDT; TVEDEN-NYBORG, 2018). Estudos revelaram que a secreção

de VLDL-apoB100 permaneceu inalterada em pacientes com esteatose hepática em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que os portadores da doença não secretam mais partículas VLDL, mas sim maiores e mais ricas em TAG (FABBRINI et al., 2008). Entretanto, o aumento no diâmetro das partículas pode alterar sua secreção e essa limitação pode resultar em retenção lipídica e contribuir pra o desenvolvimento da doença (HORTON et al., 1999).

#### **1.2.4 Alterações nas funções mitocondriais e estresse oxidativo**

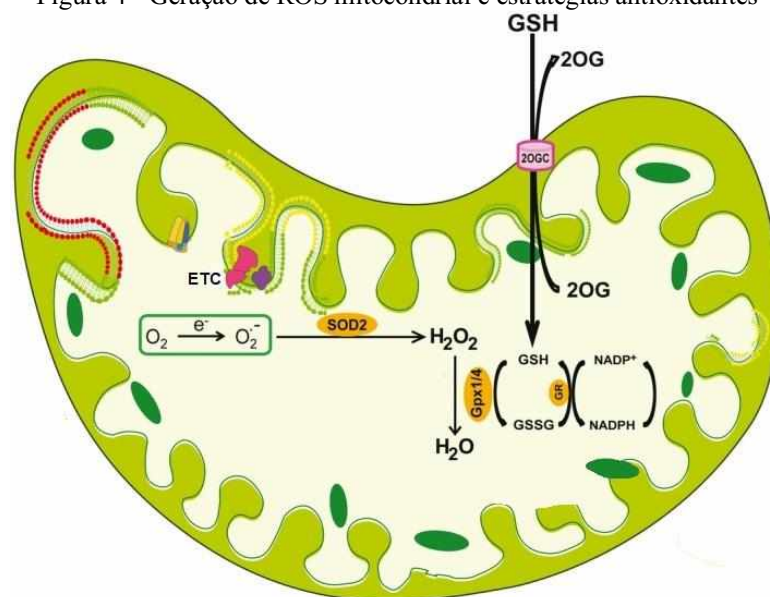
As mitocôndrias, uma das organelas mais abundante nos hepatócitos, são responsáveis por desempenhar funções essenciais para a manutenção da homeostase do metabolismo celular. Sua estrutura altamente complexa permite que o fluxo de elétrons, derivados da oxidação da glicose e lipídeos, gere ATP (Adenosina trifosfato) através da cadeia respiratória mitocondrial. Suas funções se estendem além dos limites da célula e influenciam a fisiologia do organismo, regulando a comunicação entre células e tecidos. Assim, evidências apontam disfunções nessa organela como fator crítico para progressão da MAFLD (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; NASSIR; IBDAH, 2014; FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017).

Estudos demonstraram que as mitocôndrias de camundongos com esteatose hepática são grandes e inchadas, limitadas em número, e que a matriz mitocondrial possui inclusões e hipodensidades paracristalinas (IBDAH et al., 2005). Essas perturbações ultraestruturais são indicativas de alterações funcionais, principalmente no processo de fosforilação oxidativa. Além disso, essas alterações levam a uma maior produção de ROS, com subsequente aumento da peroxidação lipídica, promovendo danos oxidativos em fosfolipídios da membrana mitocondrial como as cardiolipinas, responsáveis por desempenhar um importante papel na bioenergética mitocondrial, bem como na apoptose. Devido a isso, a MAFLD tem sido considerada uma doença mitocondrial (PARADIES et al., 2014; FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017).

Para desempenhar o seu papel na síntese de ATP, as mitocôndrias consomem cerca de 90% do oxigênio celular. No entanto, aproximadamente 0,2% - 2% do oxigênio consumido são convertidos em ROS, principalmente através da produção do ânion superóxido (PARADIE et al., 2014). Nesse sentido, a cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte de ROS, gerados principalmente pelo extravasamento de elétrons nos complexos I e III, resultando na formação do radical superóxido, que é então convertido em peróxido de

hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) através do processo de dismutação realizado pelas enzimas cobre-zinco superóxido dismutase no espaço intermediário e pela manganês superóxido dismutase na matriz mitocondrial. O peróxido de hidrogênio, embora não seja um radical, pode gerar espécies mais reativas pelas reações de Haber-Weiss / Fenton na presença de cátions bivalentes. Assim, sua detoxificação é essencial, sendo realizada principalmente pelas peroxirredoxinas (Prx), particularmente PrxIII e pelas peroxidases da glutatona reduzida (Gpx), incluindo Gpx1, e mais importante pela Gpx4 mitocondrial (figura 4) (PARADIES et al., 2014; GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2018; NASSIR; IBDAH, 2014).

Figura 4 - Geração de ROS mitocondrial e estratégias antioxidantes



Fonte: GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2018.

Devido a isso, o equilíbrio redox dos componentes da cadeia transportadora de elétrons (ETC) é fundamental para a manutenção da homeostase celular. Entretanto, o alto teor de lipídios nos hepatócitos, principal característica da MAFLD, é responsável por causar um aumento no gradiente eletroquímico mitocondrial. Sob essas condições, a meia-vida dos transportadores intermediários de elétrons é prolongada, facilitando a transferência de elétrons para o oxigênio, aumentando assim, a geração de ânions superóxido. Esse desequilíbrio crítico a favor da geração de ROS promove a depleção das enzimas antioxidantes e consequentemente, o estresse oxidativo (PARADIE et al., 2014; GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2018). Uma diminuição significativa nos níveis séricos de glutatona (GSH) e um aumento no marcador de oxidação do DNA (Ácido desoxirribonucleico), 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, foram encontrados no fígado de pacientes

com MAFLD (IRIE et al., 2016). Além disso, a sobrecarga lipídica também é responsável por um maior grau de oxidação extra mitocondrial, realizada principalmente pelos peroxissomos e citocromo. Entretanto, esses processos contribuem para a geração de quantidades consideráveis de ROS e ácidos dicarboxílicos (IPSEN et al., 2018). GARCÍA-RUIZ et al. (2007) demonstram que a  $\beta$ -oxidação peroxissômica de ácidos graxos de cadeia longa foi 1,35 vezes maior em camundongos ob / ob do que em controles selvagens.

Vários estudos apontam o estresse oxidativo como um dos principais mediadores do dano hepático na MAFLD e assim, um dos principais contribuintes para a progressão da esteatose simples para a esteato-hepatite (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017). Devido à falta de histonas, mecanismos de reparos pouco eficientes e pela proximidade com a ETC, o mtDNA (Ácido desoxirribonucleico mitocondrial) é um dos principais alvos do dano oxidativo. Diferentes tipos de danos ao mtDNA foram detectados em pacientes com MAFLD, incluindo deleções, mutações pontuais e aumento do nível de 8-hidroxi-desoxiguanosina (NOMOTO et al., 2008; CALDWELL et al., 1999). O acúmulo de mutações pode levar a expressão reduzida de polipeptídeos codificados pelo mtDNA, resultando em disfunções na ETC e conseqüentemente, aumento na produção de ROS e redução na síntese de ATP. Essa condição, desencadeia um ciclo vicioso no qual a disfunção mitocondrial produz grandes quantidades de radicais livres que, por sua vez, podem induzir danos oxidativos adicionais à estrutura e função mitocondrial (PARADIES et al., 2014).

Outra estrutura mitocondrial particularmente propensa ao dano oxidativo são os fosfolipídios de membrana, responsáveis por modular a barreira da permeabilidade, as propriedades estruturais e funcionais das atividades enzimáticas associadas à membrana e por fornecer uma matriz para a montagem e função de uma variedade de processos catalíticos. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são um dos componentes essenciais dos fosfolipídios mitocondriais e devido a sua estrutura, são altamente propensos ao dano oxidativo, sua reação com agentes oxidantes promove a formação de vários intermediários reativos, dentre eles o malondialdeído e o 4-hidroxi-trans-2-nonenal, metabólitos altamente tóxicos e relacionados com várias patologias (MUSATOV EL et al., 2002; AJITH, 2018; MARNETT, 1999; ZARKOVIC, 2003). Além disso, a permeabilidade da membrana alterada, devido à peroxidação lipídica, possibilita o influxo de cálcio e ferro nas mitocôndrias, favorecendo a reação de Fenton e conseqüentemente, a geração de radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ), com tempo de meia vida curto e altamente deletério, acentuando ainda mais o dano às estruturas mitocondriais (PARADIES et al., 2014).

Além de desencadear a peroxidação lipídica da membrana, o estresse oxidativo, é responsável por gerar vários mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ . Essa citocina multipotente, desempenha um papel central em várias etapas do desenvolvimento da MAFLD e progressão para NASH (KAKINO et al.,2018). Nakayama et al. (2007) demonstraram que em camundongos com NASH os níveis circulantes de TNF- $\alpha$  são significativamente maiores do que o encontrado nos controles. O TNF- $\alpha$  também está envolvido na ativação da ciclo-oxigenase-2, geração de prostaglandinas e recrutamento de células imunológicas, desencadeando críticos processos inflamatórios. Entre todos os biomarcadores pró-inflamatórios, o TNF- $\alpha$  também exerce um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, reduzindo a expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), regulado por insulina e localizado principalmente nos adipócitos, músculos esqueléticos e cardíacos, além de promover a fosforilação em serinas do receptor de insulina, desencadeando a resistência periférica à insulina (AKASH; REHMAN; LIAQAT, 2018).

Ademais, o TNF- $\alpha$  produzido pelas células de Kupffer e pelos hepatócitos pode se ligar aos receptores de morte das células hepáticas, incluindo o receptor de fator de necrose tumoral (TNF) e receptores de ligantes indutores de apoptose relacionados à TNF, ativando a via extrínseca de apoptose. A via de apoptose induzida por TNF- $\alpha$  é bem caracterizada e ocorre, principalmente, pela ativação do receptor de TNF1, que promove a formação do complexo de sinalização indutor de morte e a liberação do silenciador de domínios de morte. Assim, ocorre o recrutamento e ativação das caspases iniciadoras, como a caspase 8, com subsequente ativação das caspases executoras, como as caspase 3 e 7. A caspase 3 é responsável pela degradação do DNA genômico por meio da ativação de DNase, que causa essencialmente a morte celular programada (OCEANDY et al., 2019; RIEDL; SHI, 2004). No entanto, o elevado conteúdo de AGL intra-hepático, que ocorre na MAFLD, induz a expressão de desacopladores de proteínas, como o desacopladores de proteínas 2. A ativação desses desacopladores permite que os prótons entrem novamente na matriz mitocondrial, ignorando a ATP sintase, contribuindo ainda mais para a depleção na síntese de ATP nas células. Como a apoptose é um processo consumidor de energia, o aumento da atividade dos desacopladores de proteínas tem o potencial de restringir a apoptose, desencadeando processos necróticos e, conseqüentemente, danos ao fígado (PESSAYRE, 2007; RASHID et al., 1999).

Assim, devido à elevada produção de citocinas pro-inflamatórias, ROS, produtos de peroxidação lipídica e as severas lesões ao fígado, células fibrogênicas como as células hepáticas estreladas, são estimuladas. Com o aumento da população hepática dessas células

ocorre também, o acúmulo progressivo de proteínas cicatrizantes, que são progressivamente substituídas por uma matriz rica em colágeno formador de fibrila, que formam nódulos regenerativos e distorcem a arquitetura do fígado, desencadeando a fibrogênese hepática (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017; URTASUN; NIETO, 2007). Quadros de lesões hepáticas progressivas e fibrose podem progredir a doença para um estágio terminal cirrótico, que aumenta significativamente os riscos de desenvolver complicações importantes como hipertensão portal, descompensação, encefalopatia hepática, hemorragia, síndrome hepatorenal e carcinoma hepatocelular (GE; RUNYON, 2016; ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014; BERTOT; ADAMS, 2016).

### **1.2.5 Estresse no retículo endoplasmático**

O retículo endoplasmático é um componente celular que está estrutural e funcionalmente conectado com muitas outras organelas, sendo imprescindível para a integração de diversas sinalizações emanadas de outros compartimentos celulares. Essa organela também é responsável por desempenhar diversas funções no interior das células, incluindo a biossíntese de lipídios, síntese, maturação, dobragem e transporte de proteínas e a regulação do armazenamento e da dinâmica do cálcio (GHEMRAWI; BATTAGLIA-HSU; ARNOLD, 2018). O ER também é responsável pela produção de parte do oxigênio reativo celular, gerados principalmente durante o dobramento de proteínas como resultado da formação de ligações dissulfeto. Dessa forma, o estado redox está intimamente ligado à manutenção da homeostase nessa organela (CAO; KAUFMAN, 2014).

Disfunções no ER são uma das características marcantes de pacientes com MAFLD, pois o excesso de nutrientes, principalmente de ácidos graxos, é um dos principais responsáveis por desencadear alterações metabólicas e promovendo estresse no ER. (CHEN et al., 2020; CAO; KAUFMAN, 2014; GHEMRAWI; BATTAGLIA-HSU; ARNOLD, 2018; FENG et al., 2003). Sob condições de estresse e lipotoxicidade, proteínas dobradas e desdobradas se acumulam no lúmen do retículo, desencadeando assim, várias vias para restaurar a homeostase, incluindo a ativação da proteína requerente de inositol  $1\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), do fator de transcrição 6 (ATF6) e da ER cinase semelhante ao RNA (Ácido ribonucleico) da proteína cinase (PERK), levando, conseqüentemente, à ativação da via UPR (Resposta de proteína desdobrada). Por essas vias, uma miríade de cascatas de sinalização são estimuladas. Dentre elas, a fosforilação do fator de iniciação eucariótico 2 $\alpha$ , principal substrato do PERK, parece desempenhar um importante papel na MAFLD, pois induz transcrição de vários genes,

incluindo o fator de transcrição 4 (ATF4) (JO et al., 2013; CHEN et al., 2020). JO et al. (2013) demonstraram que a via PERK - ATF4 estimula o aumento dos níveis de VLDL hepático em modelos de animais obesos. O mesmo estudo indicou que camundongos deficientes em VLDLR e apolipoproteína E foram protegidos da esteatose hepática induzida por tunicamicina, esses dados indicam que níveis elevados de VLDLR hepáticos durante o estresse no ER seriam um dos mecanismos para induzir esteatose hepática através do acúmulo de TAG na forma de VLDL. A regulação positiva de ATF4, também promove a transcrição da proteína homóloga do fator de transcrição C / EBP (CHOP), responsável por ativar vias pró-apoptóticas como as proteínas BH3. Além disso, a ativação de IRE1 $\alpha$  e ATF6 também medeia respostas inflamatórias e apoptóticas através de vias de sinalização como a C-Jun N-terminal cinase (JNK), que também é responsável por induzir a expressão de proteínas BH3 (LEBEAUPIN et al., 2018; HETZ; CHEVET; HARDING, 2013). Assim, o estresse no retículo provocado por disfunções no metabolismo lipídico pode levar a inflamação e morte celular através da ativação de diversas vias (CHEN et al., 2020; MOTA et al., 2016). Além disso, várias linhas de evidencia indicam que a saturação lipídica no ER pode levar a ativação da UPR independentemente das proteínas desdobradas, evidenciando um papel direto dos lipídios na resposta ao estresse do ER (VOLMER; VAN DER PLOEG; RON, 2013).

O estresse no ER também é responsável pelo aumento na geração de ROS, principalmente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, contribuindo para a redução de antioxidantes celulares, como a GSH, em indivíduos portadores da doença. Vários estudos demonstraram que a regulação positiva de CHOP aumenta a produção de ROS pelo retículo (CHEN et al., 2020). Uma importante análise realizada em vários modelos de ratos diabéticos demonstrou que a ausência de CHOP melhorou a função das células  $\beta$  e aliviou o dano oxidativo, indicando que a ativação de CHOP poderia agravar o estresse oxidativo e contribuir para o desenvolvimento da MAFLD (SONG et al., 2008).

Outro importante efeito deletério exercido pela sobrecarga de AGL e pelo aumento na geração de ROS é o desequilíbrio na regulação do cálcio intracelular, armazenado principalmente no lúmen do retículo. A homeostase do cálcio é mediada principalmente pela retículo sarco / endoplásmico Ca<sup>2+</sup> - ATPasa (SERCA), que o bombeia do citoplasma para o retículo. O estresse prolongado nessa organela pode diminuir a atividade de SERCA, promovendo extravasamento de cálcio para o citoplasma. O excesso desse elemento fora do ER pode contribuir para o desenvolvimento de disfunções mitocondriais e desencadear vias apoptóticas. Além disso, disfunções mitocondriais também podem promover estresse no retículo (SUGIMOTO et al., 2010; WEI et al., 2009; DENIAUD et al., 2008). Um recente



estudo constatou que a deficiência na enzima glicerol fosfato desidrogenase mitocondrial inibe a ubiquitinação da ciclofilina D e induz estresse no ER, resultando em esteatose hepática (ZHENG et al., 2019). Assim, a interferência entre o estresse do ER e a disfunção mitocondrial forma um ciclo vicioso que promove o esteatose, estresse oxidativo e morte celular durante a progressão da MAFLD (CHEN et al., 2020).

### 1.2.6 Estratégias terapêuticas

Os impactos econômicos e de saúde pública da MAFLD despertam grande interesse entre as indústrias de biotecnologia e farmacêutica no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, pois atualmente, não existe tratamento farmacológico aprovado para a doença e as terapias existentes são limitadas, se baseando principalmente na redução da ingestão de gorduras e aprimoramento da atividade física. Dessa forma, ensaios clínicos visando o desenvolvimento de terapias estão evoluindo rapidamente à medida que novos alvos e tecnologias de diagnóstico surgem (YOUNOSSI et al., 2011; NASCIMBENI et al., 2013; FRIEDMAN et al., 2018; AJITH, 2018). FU et al. (2017) demonstraram que a substituição de mitocôndrias disfuncionais por mitocôndrias exógenas funcionais atenuou o lipídio excessivo intra-hepático e recuperou a função dos hepatócitos.

Além disso, os compostos bioativos derivados de plantas, também podem ser agentes promissores no tratamento da MAFLD, pois são capazes de atingir as mitocôndrias e restaurar sua função, melhoram a toxicidade hepática induzida pelo estresse oxidativo, atenuam a esteatose e possuem atividade anti-inflamatória (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017; AJITH, 2018). Um estudo realizado em células HepG2 demonstrou que o extrato de *Artemisia capillaris* melhorou significativamente a esteatose induzida por AGL, diminuiu a atividade das vias pró-apoptóticas JNK e PUMA (Modulador de apoptose regulado positivamente por p53), reduziu o nível de expressão da proteína X associada ao BCL-2 (Linfoma de células B2) e Caspase-3 e aumentou a manifestação de BCL-2 e Caspase-9 (JANG et al., 2014). Outro estudo evidenciou o potencial hipolipidêmico e indutor de autofagia das antocianinas da cereja em células hepáticas com acúmulo de lipídeos (CHU et al., 2019). No entanto, apesar da evidente eficácia dos produtos naturais e de outras estratégias terapêuticas, mais estudos são necessários para a elucidação de seus mecanismos de atuação e melhor compreensão de seus efeitos hepatoprotetores (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017).

### 1.3 Modelos propostos para estudos da MAFLD

O aumento alarmante nas últimas décadas na prevalência da MAFLD, sua relevância clínica, falta de compreensão dos mecanismos básicos envolvidos em sua patogênese, envolvimento do estresse oxidativo e necessidade de novas estratégias terapêuticas, tornou de grande relevância o desenvolvimento de modelos de estudos que permitam a investigação das diversas vias envolvidas e a busca por estratégias eficazes e seguras de tratamento. Além disso, a utilização de modelo *in vitro* da doença também representa uma estratégia na redução do uso de animais de experimentação em ensaios pré-clínicos (YOUNOSSI, 2018; FOUAD et al., 2020; YOUNOSSI et al., 2016).

Dessa forma, vários modelos *in vitro* têm sido propostos nos últimos anos. Nos estudos de Ricchi et al., (2009) três linhagens de células hepáticas (HepG2, WRL-68 e HuH7) foram expostas ao AP (0,33mM e 0,66mM), AO (0,66mM e 1,32mM) e a misturas de AO e AP (proporção 2: 1) nas concentrações de 1mM e 2mM. Os dados mostraram que a extensão da esteatose foi mais grave nas células tratadas com AO do que nas expostas ao AP, mas um efeito oposto foi observado na apoptose. Ainda de acordo com os autores, a concentração de triglicerídeos nas células HepG2 revelou ser sempre maior do que a encontrada nas células WRL-68, mas menor do que em HuH-7 tratadas com o mesmo esquema experimental. Diferenças na atividade das caspases também foram encontradas, após exposição ao AP as células HepG2 e WRL68 apresentaram diminuição na atividade das caspases 3 e 7, mas na linha celular HuH7 isso não foi observado. Apesar dos experimentos iniciais terem sido realizados nas três linhagem celulares, a HepG2 foi escolhida pelos autores para dar continuidade ao trabalho. Por outro lado, Zhao et al. (2018) demonstraram que células HepG2 tratadas com palmitato nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu$ M suprimiram a oxidação ácidos graxos e aumentaram o conteúdo intracelular de lipídeos. Yao et al., (2011), também propuseram um modelo *in vitro* da doença utilizando células HepG2. Para induzir a sobrecarga lipídica, as células foram expostas a uma mistura de AGL (AO/AP, 2: 1) nas concentrações finais de 1, 2 e 3mM. De acordo com os resultados, todas as concentrações testadas induziram o acúmulo intracelular de lipídeos, no entanto, a concentrações de 2 e 3mM apresentaram lipotoxicidade após 12, 24 e 36 horas de tratamento. Apesar de terem sido utilizadas diversas concentrações de AGL nos diferentes modelos de MAFLD nenhum deles avaliou o impacto da sobrecarga lipídica na produção de ROS e no estado redox celular.

Uma série de linhagens celulares de hepatoma humano, incluindo HepG2, Hep3B, HuH7 e HepaRG, são amplamente utilizadas em estudos de metabolismo e hepatotoxicidade.

Dentre elas, a HepG2 é mais utilizada, pois suas características funcionais foram examinadas extensivamente. E ainda, expressam muitas funções hepáticas diferenciadas, como síntese e secreção de proteínas plasmáticas, metabolismo de colesterol e TAG, metabolismo e transporte de lipoproteínas, síntese de ácidos biliares, síntese de glicogênio e sinalização da insulina e, devido a isso, são muito utilizadas em modelos da MAFLD (DONATO; TOLOSA; GÓMEZ-LECHÓN, 2005).

Além disso, existem também muitos modelos animais de MAFLD induzida por dieta ou genéticos. Muitos deles levam ao acúmulo significativo de lipídeos no fígado, mas nem todos o fazem por vias relevantes para a MAFLD em humanos. Ademais, muitos ainda não possuem as características metabólicas e transcriptômicas desejadas. Entretanto, apesar de apresentarem limitações eles têm desempenhado um papel vital na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da MAFLD (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017; FRIEDMAN et al., 2018). A dieta deficiente em metionina e colina é um dos modelos dietéticos mais bem descritos para a MAFLD. Nele, camundongos são alimentados com dieta contendo grandes quantidades de sacarose (40%) e gordura (10%), mas carente de metionina e colina, duas substâncias necessárias para a secreção hepática de TAG como VLDL e também estão envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácido graxo mitocondrial, resultando em acúmulo de gordura hepática, morte celular, estresse oxidativo e alterações nas citocinas e adipocinas, mas com inflamação e fibrose menores (LAU; ZHANG; YU, 2017; IBRAHIM et al., 2016). Modelos com camundongos *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* (Ob / Ob) também são muito utilizados, pois exibem uma mutação espontânea no gene da leptina, o que os torna deficientes dessa adipocina. Dessa forma, os camundongos Ob / Ob são hiperfágicos, inativos, extremamente obesos e apresentam hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia desde as primeiras semanas de idade. Já com 12 semanas, os camundongos apresentam esteatose leve a grave, mas com inchaço e inflamação lobular ausentes (LINDSTRÖM, 2007; KRISTIANSEN et al., 2016; TRAK-SMAYRA et al., 2011).

Outro fator que eleva a importância do desenvolvimento de modelos de estudos para a MAFLD é a dificuldade de se realizar análises em humanos, pois para avaliação da gravidade histológica de MAFLD é necessário o uso rotineiro de achados patológicos do fígado, entretanto a biópsia hepática repetida é algo invasivo, caro e, em última análise, impraticável. Dessa forma, os estudos da doença em humanos se limitam as amostras sorológicas, não permitindo a investigação dos seus mecanismos moleculares (TANAKA et al., 2019).

Assim, apesar de haver muitos modelos propostos para estudos da MAFLD, o desenvolvimento de novos modelos *in vitro* é de grande importância, pois contribui para

redução do uso de animais de laboratório e para investigação dos mecanismos moleculares da doença. Além disso, existe ainda, uma grande divergência nas concentrações de AGL utilizadas pelos diferentes autores. Essas discordâncias são determinantes na alteração de parâmetros bioquímicos de interesse. Portanto, faz-se necessária a padronização das concentrações dos mesmos com o objetivo de investigar o estresse oxidativo e as diversas vias envolvidas na progressão da doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Padronizar um modelo *in vitro* para estudo da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo em células da linhagem HepG2.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as concentrações ideais dos ácidos graxos palmítico e oleico para induzir o acúmulo intracelular de lipídios;
- Determinar a viabilidade celular e a citotoxicidade;
- Caracterizar o estresse oxidativo e o estado redox através da quantificação dos biomarcadores de peroxidação lipídica e dos níveis de glutatona total;
- Avaliar o dano hepatocelular através dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Cultura de células da linhagem HepG2**

Células hepáticas humanas de linhagem contínua HepG2, fornecem um modelo viável para estudos de metabolismo hepático, pois mantém muitas características de hepatócitos

normais, além de serem do tipo selvagem para o gene p53 portanto, serão utilizadas neste estudo (OU et al., 2011; RICCHI et al., 2009). A linhagem foi obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) low glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100U/mL) a temperatura de 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> em incubadora. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 2 a 3 dias, utilizando-se solução de tripsina/EDTA.

### 3.2 Indução do acúmulo intracelular de lipídios

Para induzir o acúmulo de ácidos graxos nas células HepG2, com o intuito de desenvolver um modelo *in vitro* da doença, foram utilizados os ácidos graxos palmítico e oleico. No ensaio foram utilizadas uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 4,5% em DMEM e soluções estoque dos ácidos palmítico e oleico a 50mM em etanol. Inicialmente, foram semeadas  $8 \times 10^4$  células em placas de 12 poços com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para adesão. Após 24 horas, o meio contendo soro foi removido, os poços foram lavados com PBS (Tampão fosfato-salino) e então foi realizada uma nova incubação com DMEM não suplementado por 24 horas. Após o período de privação de SFB, o grupo controle foi incubado com o veículo (DMEM contendo etanol e BSA), um grupo foi tratado apenas com AP (0,7mM), outro com a mistura de AGL na concentração de final de 1mM (0,33mM de AP e 0,66mM de AO) e o último com a mistura de AGL na concentração final de 2mM (0,66mM de AP e 1,32mM de ácido AO). A concentração de 0,7mM de AP e a proporção de 1:2 de AP/AO são comumente encontradas no soro de pacientes portadores de MAFLD e por isso foram utilizadas nesse trabalho (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2007; ARAYA et al., 2004). Os AGL foram diluídos a partir da solução de 50mM em meio DMEM não suplementado contendo 4,5% de BSA e os tratamentos realizados por 24 horas. Posteriormente, o meio foi retirado e os poços lavados com PBS. Para a quantificação dos níveis intracelulares de lipídios, as células foram fixadas em temperatura ambiente com solução a 10% de paraformaldeído a 4°C, por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com água Milli-Q e coradas com solução de Oil Red (50% Oil Red (6,25mg/mL em isopropanol) e 50% água Milli-Q) por 50 minutos a temperatura ambiente. O corante foi então retirado e as células lavadas novamente para remoção do excesso de corante. Com os poços secos, foram adicionados em todos eles 500µL de isopropanol e deixado em agitação no agitador de placas

por 30 minutos. A absorbância foi então medida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 490nm. Para obtenção das fotomicrografias, após a coloração com Oil Red as células foram coradas com hematoxilina de Meyer por 1 minuto e em seguida realizada novamente mais 5 lavagens com água Mili-Q. As fotomicrografias foram obtidas utilizando uma câmera acoplada ao microscópio biológico trinocular invertido com contraste de fase (Kozo, Japão) em uma ampliação de 200 vezes.

### 3.3 Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de Difeniltetrazólio). Esse ensaio quantifica a atividade mitocondrial baseando-se na redução do MTT à cristais de formazan de cor azul, através da ação da succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). Para o ensaio,  $2,5 \times 10^3$  células em meio DMEM *low* glicose foram semeadas em microplacas de 96 poços, após o tempo de adesão de 24 horas o meio foi retirado e os poços lavados duas vezes com tampão PBS. Em seguida, as células foram tratadas com os AGL por 24 horas, seguindo a metodologia descrita anteriormente. Posteriormente, foi adicionado em todos os poços solução contendo  $5\text{mg mL}^{-1}$  de MTT em meio DMEM e realizada incubação por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . A solução de MTT foi então removida e  $200\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido foram adicionados a cada poço. A absorbância foi medida em leitor de microplacas em comprimento de onda de 570nm e a viabilidade celular foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{média da absorbância dos tratados}}{\text{média da absorbância dos controles}} \times 100$$

A citotoxicidade foi avaliada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica liberada no meio quando as células são danificadas ou destruídas. Esse ensaio se baseia na conversão do piruvato a lactato catalisada pela LDH na presença de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo). O decréscimo da absorbância, devido à oxidação do NADH, é proporcional a atividade de LDH na amostra. Inicialmente, foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células em placas de 6 poços e o tratamento com ácidos graxos foi realizado por 24 horas, o sobrenadante coletado dos poços foi então utilizado para realizar a

análise. Para a quantificação dos níveis de LDH, foi utilizando kit comercial Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Para o controle positivo as células foram lisadas com triton X-100 por 5 minutos. Os níveis de LDH no meio de cultura foram calculados utilizando o fator de calibração de acordo com a lei de Lambert-Bee e os resultados expressos em unidades/L.

### **3.4 Avaliação do dano hepatocelular**

Os níveis das aminotransferases ALT e AST foram determinados por método colorimétrico utilizando kits comerciais Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Ambos os ensaios se baseiam na reação de transferência de grupamentos amina de  $\alpha$ -aminoácidos para  $\alpha$ -cetoácidos a partir de substratos específicos. O oxaloacetato e o piruvato formados durante a reação são medidos separadamente através da formação de hidrazona, que tem coloração intensa em meio alcalino. Para o ensaio, primeiramente, foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células em placas de 6 poços com meio DMEM suplementado com SFB, por 24 horas. Após o tempo de adesão, o meio foi retirado, os poços lavados duas vezes com PBS e realizada a privação de SFB por 24 horas. Em seguida, o tratamento com ácidos graxos foi realizado com meio DMEM sem vermelho de fenol, após a incubação o sobrenadante foi coletado dos poços e utilizado para realizar as análises. As curvas de calibração foram preparadas com diluições do reagente substrato para cada uma das aminotransferases e usadas para determinar a atividade de ambas, que foi expressa em unidades/mL.

### **3.5 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essa técnica baseia-se na interação do ácido tiobarbitúrico com alguns subprodutos da peroxidação lipídica, resultando na formação de uma substância que pode ser lida por espectrofotometria (BUEGE; AUST, 1978). Primeiramente,  $2 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas com as diferentes concentrações de AGL por 24 horas. Posteriormente, as células foram coletadas e homogeneizadas em 1mL de tampão PBS (pH 7,2), as células foram lisadas através de três ciclos de congelamento e descongelamento. Resumidamente,  $2 \times 10^7$  células foram adicionadas a uma solução contendo ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico e, logo em seguida, foi acrescentado o

butilhidroxitolueno, um antioxidante utilizado para prevenir peroxidação lipídica adicional durante o procedimento. A mistura foi levada ao vórtex e incubada em termobloco por 60 minutos a 95°C. Ao final, a reação foi interrompida em banho de gelo e a mistura centrifugada por 15 minutos a 3000g em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro à 535nm. Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão para construção da curva de calibração.

### 3. 6 Determinação de glutathiona total

O estado redox foi avaliado através dos níveis de glutathiona total presente nas amostras, de acordo com o método adaptado de Griffith (1980). O ensaio baseia-se na redução contínua do reagente de ellman (5,5'-dítio-bis- [ácido 2-nitrobenzoico]) (DTNB) a ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico (TNB) pela GSH formando a GSSG (Glutathiona dissulfeto), que é reciclada pela glutathiona redutase utilizando o NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina). O produto final formado, TNB, possui coloração amarela e pode ser lido espectrofotometricamente. Inicialmente, foram plaqueadas  $2 \times 10^6$  células em placas de 6 poços e realizada a incubação com AGL, por 24 horas. Ao final, foi adicionado a cada poço 1mL de PBS gelado, as células foram então coletadas com auxílio do *cell scraper* e centrifugadas a 600g por 5 minutos. Após obter o *pellet* celular, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500µL de ácido sulfossalicílico a 5%, as células foram lisadas, incubadas por 5 minutos a 4°C e centrifugadas novamente por 10 minutos a 10000g em centrífuga refrigerada a 4°C. Em uma microplaca de 96 poços foram pipetados 10µL do sobrenadante, adicionados 150µL de solução contendo a enzima GR diluída, DTNB e tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0), a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo em seguida, foi adicionado 50µL de solução contendo NADPH e as leituras foram então realizadas em leitor de microplacas a 412nm por 5 minutos com intervalos de 1 minuto entre elas. A construção da curva padrão foi realizada com soluções padrão de GSH nas concentrações de 1,5625 a 25mM.

### 3.7 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente, dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste-t de



Student ou análise de variância univariada ANOVA one-way seguida pelo teste de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Acúmulo de lipídios em células HepG2

O tratamento das células HepG2 com AP e AO induziu o acúmulo intracelular de lipídeos nas concentrações de 1 e 2mM da mistura lipídica. No entanto, como demonstrado nas figuras 5 e 6, células expostas a 0,7mM de palmitato não apresentaram aumento significativo no conteúdo de lipídeos intracelular, demonstrando claramente um efeito esteatótico dependente da dose de oleato utilizada.

Figura 5 - Fotomicrografias representativas após coloração com Oil Red O em células HepG2 expostas a sobrecarga lipídica por 24 horas (A) Controle; (B) 0,7mM de palmitato; (C) 0,33mM de palmitato e 0,66 de oleato; (D) 0,66mM de palmitato e 1,32mM de oleato. Aumento de 200x.

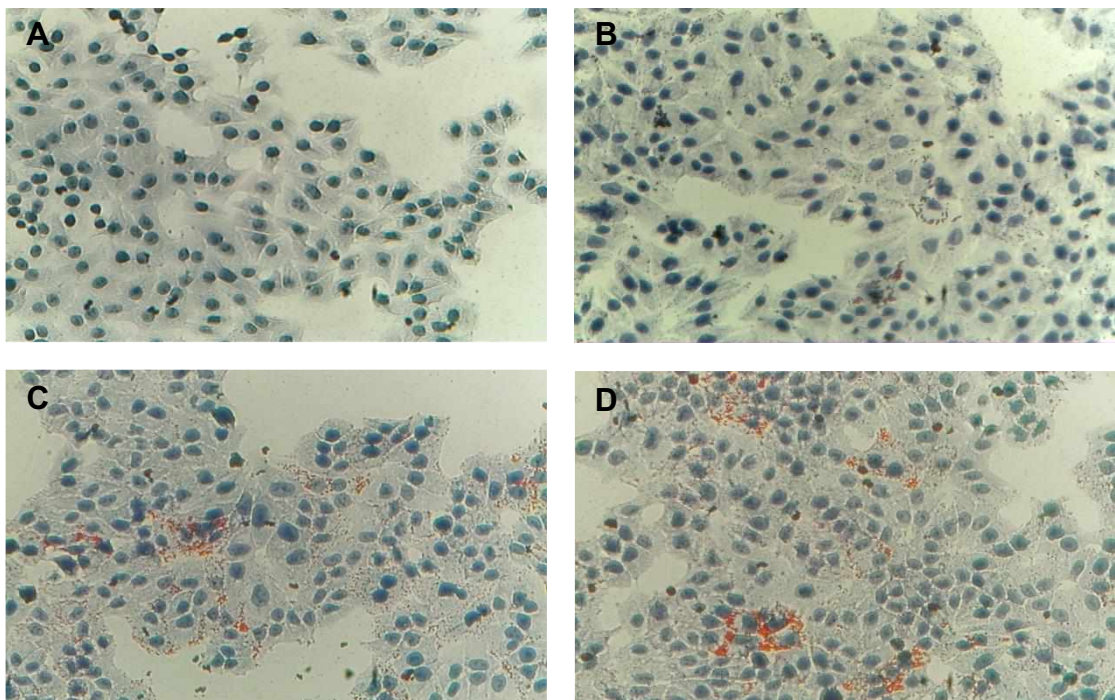
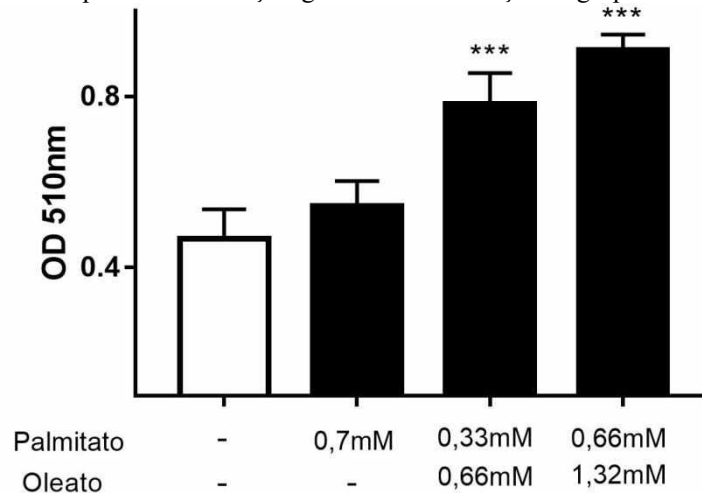


Figura 6 - Quantificação de lipídios realizada espectrofotometricamente a 510nm após coloração com Oil Red O em células HepG2 expostas a sobrecarga lipídica por 24 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=6. O \*\*\* representa diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).



O palmitato e o oleato estão fortemente presentes na dieta ocidental, sendo os ácidos graxos mais abundantes em TAG hepáticos de indivíduos normais e pacientes com MAFLD (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2006; PENKE et al., 2017). Nos estudos de Ricchi et al. (2009), o acúmulo intracelular de lipídeos mostrou ser claramente dependente da dose de AGL utilizada no tratamento. Entretanto, células HepG2 expostas a maiores concentrações de AO (0,66mM e 1,32mM) e a mistura dos dois ácidos graxos (proporção 2:1, concentrações finais de 1mM e 2mM) apresentaram acúmulo lipídico significativamente maior do que quando tratadas apenas com AP, dados que vão ao encontro aos apresentados no presente trabalho. Ainda de acordo com o estudo, o oleato apresentou maior eficiência na indução do acúmulo de TAG em todas as linhagens celulares testadas (HepG2, WRL-68 e HuH-7).

Resultados semelhantes foram relatados por Gómez-Lechón et al. (2007) ao incubar células HepG2 e hepatócitos humanos primários com 0,5, 1 e 2 mM da mistura de ácidos graxos (oleato/palmitato) em diferentes proporções (3:0, 2:1, 1:1, 1:2 e 0:3) por 24 horas. Nesse estudo, o acúmulo de lipídeos também foi proporcional a dose utilizada no tratamento, sendo a indução máxima, alcançada pela mistura de AGL na concentração final de 2mM. As relações 3:0, 2:1, 1:1 e 1:2 exibiram conteúdo lipídico próximo, mas níveis inferiores foram observados em células expostas apenas ao palmitato (proporção 0:3).

Yao et al. (2011), através da coloração com Oil Red O, também identificaram um aumento significativo de gotículas lipídicas no citoplasma de células HepG2 expostas a AGL por 24 horas. Segundo os resultados, o maior teor de lipídios intracelular foi alcançado após tratamento com 3mM da mistura de AGL (AO/AP, 2:1), não sendo observada grandes

diferenças entre os tratamentos com 1 e 2mM. Resultados similares aos encontrados nesse trabalho.

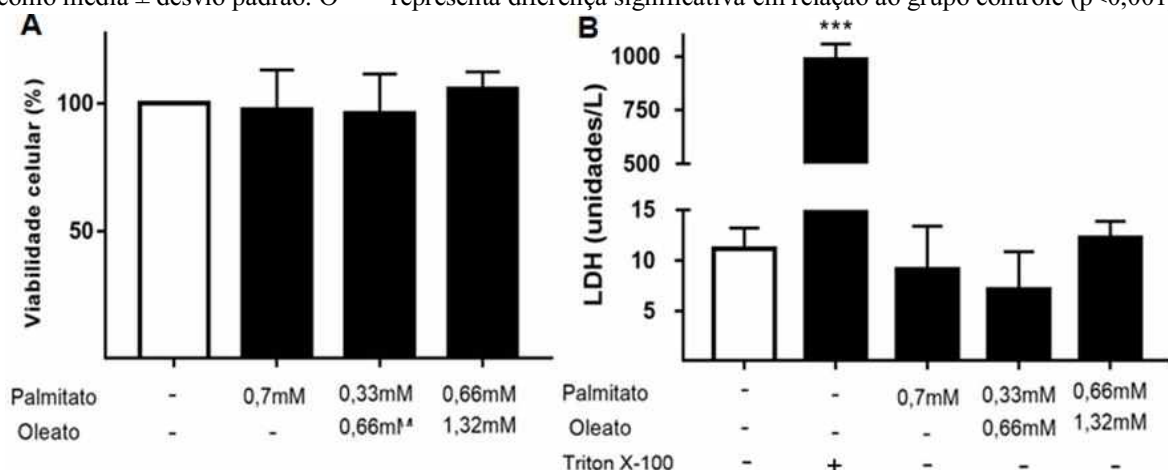
Por outro lado, um estudo demonstrou que a exposição a diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu$ M) de AP induziu acúmulo significativo de lipídeos em células HepG2 de maneira dose dependente. Além disso, a contração de 200 $\mu$ M também foi eficiente em induzir uma diminuição significativa da lipólise (ZHAO et al., 2018). Resultados divergentes dos encontrados nos estudos citados anteriormente.

O elevado acúmulo de gotículas lipídicas nas células observado, principalmente, após tratamento com 2mM da mistura de ácidos graxos demonstra a eficiência do modelo proposto em induzir esteatose, principal característica da MAFLD. Além disso, modelos experimentais utilizando células HepG2 expostas a elevadas concentrações de AGL (palmitato/oleato, 2:1, 1 e 2mM) promovem um acúmulo intracelular de lipídeos muito semelhante aos encontrado no fígado de pacientes portadores da doença (GÓMEZ-LECHÓN et al., 2007; ARAYA et al., 2004).

## 4.2 Viabilidade celular e citotoxicidade

Os ensaios de MTT e liberação de LDH foram realizados de modo a determinar o citotoxicidade da sobrecarga de AGL e seu impacto na viabilidade celular. Como demonstrado na figura 7, nenhuma das concentrações testadas apresentou impactos na viabilidade celular, pois não houve diferença significativa na viabilidade das células dos grupos tratados em relação ao controle. Da mesma forma, a razão de morte celular, avaliada pelo ensaio de liberação de LDH, também não foi aumentada em células HepG2 na presença de AGL.

Figura 7 - Viabilidade e citotoxicidade em células HepG2 expostas a sobrecarga lipídica por 24 horas. (A) Viabilidade celular avaliada pelo método MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de Difentiltetrazólio), n=8; (B) Citotoxicidade determinada através da liberação de LDH (Lactato desidrogenase), para o controle positivo, que representa 100% de lise celular, foi utilizado o triton X-100, n=6. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O \*\*\* representa diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,001).



Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular demonstrados nesse estudo são amplamente utilizados em análises de toxicologia *in vitro*. A avaliação da liberação de LDH baseia-se na liberação da enzima para o meio de cultura após dano à membrana celular, estimando assim a quantidade de células lisadas. Já ensaios como o MTT são baseados, principalmente, na atividade mitocondrial das células, ou seja, estimam a quantidade de células viáveis após exposição a determinado composto (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Em uma análise realizada por Gómez-Lechón et al. (2007), a viabilidade de células HepG2 e hepatócitos humanos primários foi determinada pelo teste MTT após tratamento por 24 horas de tratamento com a mistura de oleato e palmitato em diferentes proporções. Os resultados demonstraram que as várias proporções da mistura de AGL promoveram diferentes impactos na viabilidade celular, pois não foi observado efeito citotóxico na relação oleato/palmitato nas proporções de 3:0, 2:1, 1:1 e 1:2 até 2mM, dados que corroboram com este estudo. No entanto, a mistura de AGL a 2mM nas proporções com maior teor de palmitato (proporções 1:1, 1:2 e 0:3) demonstrou ser altamente tóxica para as células, sugerindo um efeito citotóxico dependente do aumento da concentração de palmitato na mistura.

No estudo realizado por Yao et al., (2011) as células HepG2 foram expostas a mistura de AGL (oleato/palmitato na proporção 2:1) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 3mM e a viabilidade celular foi determinada pelo teste MTT em intervalos de 12, 24 e 36 horas. Observou-se com os resultados, que as concentrações de 0,25 a 1mM não apresentaram citotoxicidade em nenhum dos intervalos de tempo testados. Entretanto, a mistura com as maiores concentrações (2 e 3mM) revelou ser tóxica para as células independente do tempo, com porcentagens de células viáveis entre 70-80% e 60-70%, respectivamente. Além disso, as células HepG2 demonstraram uma maior sensibilidade nas concentrações de 2mM e 3mM de AGL após tratamento por 12 e 24 horas.

Enquanto que nos resultados apresentados por Penke et al., (2017) não foram observadas alterações na viabilidade analisada pelo teste WST-1 após 4 horas de incubação das células HepG2 com palmitato (0,5mM), oleato (1mM) e combinação de ambos (0,5mM / 1mM). Ainda de acordo com os resultados, o palmitato diminuiu significativamente a viabilidade celular com 24 horas de tratamento e ainda mais após 48 horas, já o oleato não influenciou a viabilidade celular em nenhum dos intervalos de tempo testados, mas foi capaz de melhorar o impacto negativo do palmitato no tratamento com a mistura de AGL, evidenciando assim, um efeito protetor do ácido oleico.

Além disso, células HepG2 e hepatócitos murinos primários expostos a mistura de AGL (oleato/palmitato, proporção 2:1) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, e 2mM não

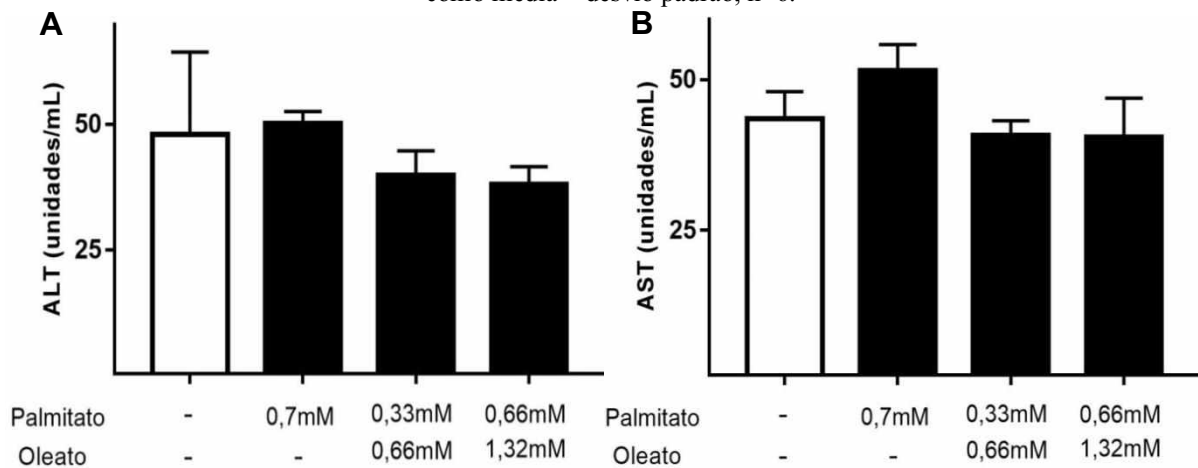
apresentaram redução da viabilidade celular quando tratadas por 24 horas com até 1mM de AGL. Contudo, tanto as células HepG2 quanto os hepatócitos murinos primários apresentaram diminuição significativa da viabilidade celular quando expostos a mistura de 2mM (ZHOU et al., 2017).

Diferente dos resultados apresentados no presente trabalho, alguns estudos demonstraram que a concentração de 2mM pode causar lipotoxicidade em células hepáticas (ZHOU et al., 2017; YAO et al., 2011). Entretanto, a viabilidade celular permanece acima de 70%, não impedindo a realização das análises posteriores. Essa divergência de dados pode ocorrer devido aos autores utilizarem diferentes metodologias para a indução do acúmulo de lipídios, resultando na alteração de importantes parâmetros bioquímicos.

### 4.3 Dano hepatocelular

O tratamento das células HepG2 com AGL não promoveu dano hepatocelular, pois não houve aumento significativo dos níveis de enzimas hepáticas (ALT/AST) nos grupos tratados em relação ao controle (figura 8).

Figura 8 - Níveis de enzimas hepáticas liberadas por células HepG2 expostas a sobrecarga lipídica por 24 horas. (A) ALT (Alanina aminotransferase) (B) AST (Aspartato aminotransferase) Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=6.



O dano hepático pode ser sinalizado por marcadores de lesão hepática como as enzimas ALT e AST. Dessa forma, a avaliação dos níveis séricos de AST pode ser utilizada para a identificação não invasiva da MAFLD (NEWSOME et al., 2020). Nos estudos de Gómez-Lechón et al (2007), células HepG2 e hepatócitos humanos primários expostos a mistura de AGL (oleato / palmitato nas proporções de 3:0, 2:1, 1:1, 1:2) não demonstraram redução na viabilidade após 24 horas de tratamento. Ainda de acordo com o mesmo estudo,

após análise por citometria de fluxo, não foi observado apoptose significativa em hepatócitos humanos primários expostos a mistura de AGL com maiores concentrações de oleato (proporções 3:0, 2:1, 1:1 e 1:2, até 2mM). No entanto, o AP sozinho (proporção de 0:3) induziu fragmentação do DNA na concentração de 1mM da mistura lipídica.

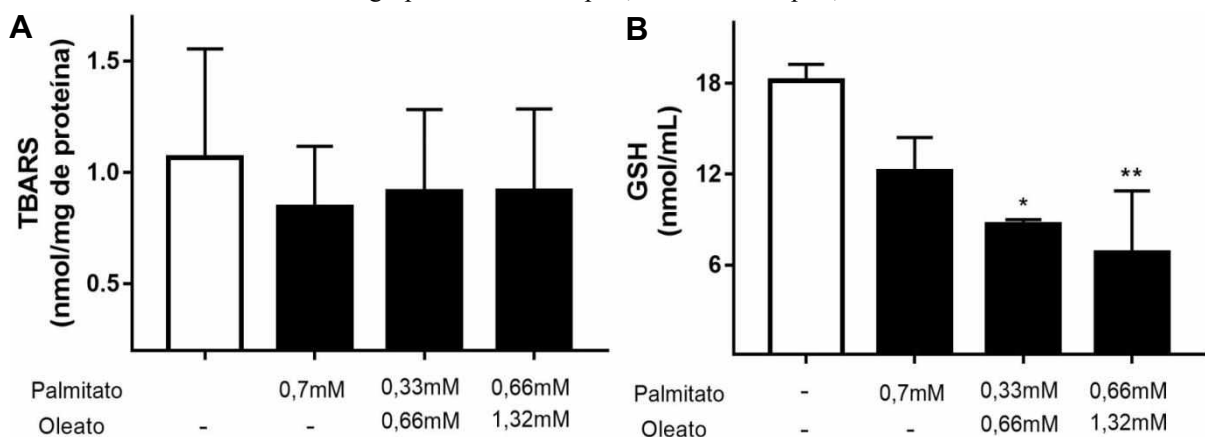
Por outro lado, hepatócitos murinos primários expostos ao palmitato e oleato nas concentrações de 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1 e 2mmol/L ou a mistura dos dois (oleato/palmitato proporções de 3:1, 2:1 e 1:1, concentrações finais de 0,5, 0,75 e 1 mmol/L) apresentaram aumento na liberação de LDH, diminuição em WST-1 e na produção de albumina, sendo esses efeitos ligados a concentração total crescente de AGL e a proporção crescente de AP. Revelando uma forte correlação entre o dano hepatocelular e as concentrações crescentes de AP (MORAVCOVÁ et al., 2015).

Apesar de alguns autores relatarem a ocorrência de dano hepatocelular em células expostas ao AP e AO, no presente trabalho os níveis de ALT e AST não foram aumentados. No entanto, esse resultado corrobora com os dados de viabilidade celular e citotoxicidade apresentados anteriormente. Comprovado que a exposição de células HepG2 as concentrações de AGL utilizadas nesse trabalho não induz dano celular.

#### 4.4 Marcadores de estresse oxidativo

Como demonstrado na figura 9 os níveis de TBARS não foram aumentados após o tratamento das células com as diferentes concentrações de AGL. Entretanto, níveis reduzidos de GSH foram observados em células expostas a concentração de 1 e 2mM da mistura de AGL.

Figura 9 - Marcadores de estresse oxidativo em células HepG2 expostas a sobrecarga lipídica por 24 horas. (A) TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), n=6; (B) Níveis intracelulares de GSH (Glutaciona), n=3. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O \* representam diferença significativa em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$  e o \*\* com  $p < 0,01$ .



A peroxidação lipídica, desencadeada pela sobrecarga de lipídeos em pacientes com MAFLD, é um processo no qual espécies reativas atacam lipídeos contendo duplas ligações de carbono, principalmente, ácidos graxos poli-insaturados que envolvem a remoção de hidrogênio de um carbono, com a inserção de oxigênio, resultando na formação de radicais peroxil lipídico e hidroperóxidos, além de vários outros metabolitos tóxicos como o malondialdeído (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Nesse sentido, a glutathione, um tripeptídeo, principal antioxidante sintetizado pelas células e fortemente presente em hepatócitos, fornece os meios para a remoção de peróxidos e regulação do ciclo celular. A defesa antioxidante celular é realizada, principalmente, por três membros da família da Gpx e por uma das peroxirredoxinas (Prdx 6). Essas enzimas catalisam a redução de  $H_2O_2$  por GSH em  $H_2O$  (água) e GSSG. A Gpx 4 pode reduzir os peróxidos lipídicos a álcoois lipídicos, sendo imprescindível na proteção contra os danos da peroxidação lipídica. A GSSG formada durante o processo é potencialmente tóxica para as células, mas as células normalmente contêm alta atividade da glutathione redutase, mantendo a maior parte da GSH na forma reduzida (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

No estudo de Chenet al. (2019), hepatócitos primários de murinos expostos ao AP na concentração de  $400\mu M$  apresentaram um aumento significativo na produção de ROS em relação ao grupo controle. Além disso, de acordo com o mesmo estudo, os níveis de GSH em hepatócitos com sobrecarga de AGL foi significativamente menor do que em células controle, indicando um crítico papel exercido pelo AP na produção de ROS e depleção do sistema de defesa antioxidante celular.

Dados semelhantes foram apresentados por Tsai et al. (2016) ao alimentarem ratos *Sprague dawley* com dieta rica em gordura (HFD) por 11 semanas. De acordo com os resultados, o conteúdo de AGL plasmático e concentração hepática de TAG foram acentuadamente aumentados no grupo HFD em relação ao grupo que recebeu dieta controle. Os níveis de marcadores de peroxidação lipídica (TBARS) também estavam elevados nesse grupo em comparação aos controles. Por outro lado, os níveis de enzimas antioxidantes, GSH, Prx e Gpx estavam significativamente reduzidos em ratos do grupo HFD.

Ademais células HepG2 expostas ao palmitato por 1, 2 e 3 dias apresentaram níveis significativamente menores de GSH total, sendo associado ao fluxo consistentemente reduzido através da síntese de GSH. No entanto, o tratamento com oleato não exerceu impacto no teor de GSH presente nos hepatócitos, reforçando assim o papel lipotóxico exercido pelo ácido palmítico (SRIVASTAVA; CHAN, 2008).

Apesar de não terem sido observados aumento nos níveis de TBARS nas células HepG2 após exposição aos AGL, os níveis reduzidos de GSH sugerem uma depleção significativa das defesas antioxidantes intracelulares e, conseqüentemente, um desequilíbrio no estado redox celular. Essa depleção pode estar relacionada com o aumento na geração de ROS promovido pela sobrecarga lipídica.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir deste trabalho demonstram que o modelo proposto foi eficiente em induzir a esteatose e o estresse oxidativo, duas das principais características da MAFLD. As células expostas a mistura de AGL nas concentrações de 1 e 2mM apresentaram maior acúmulo intracelular de lipídeos do que quando tratadas apenas com palmitato. Embora, não tenha sido observado aumento na peroxidação lipídica, níveis reduzidos de GSH foram evidenciados após exposição das células a mistura de AGL nas concentrações de 1 e 2mM, revelando um desequilíbrio no estado redox celular. Dessa forma, o modelo *in vitro* proposto neste estudo será de grande importância para o desenvolvimento de investigações com o intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese da doença e no estabelecimento de estratégias terapêuticas.



## REFERÊNCIAS

ABATE, N.; SUMNER, A. E.; CHANDALIA, M. S. Manifestations of adipose tissue dysfunction. **Journal of obesity**, v. 2013, p. 940275, 2013.

ABDELMALEK, M. F. NAFLD: The clinical and economic burden of NAFLD: time to turn the tide. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 13, n. 12, p. 685-686, 2016.

AJITH, T. A. Role of mitochondria and mitochondria-targeted agents in non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 45, n.5, p. 413-421, 2018.

AKASH, M.; REHMAN, K.; LIAQAT, A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 105-110, 2018.

AKSHINTALA, D.; CHUGH, R.; AMER, F.; CUSI, K. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Overlooked Complication of Type 2 Diabetes. In: FEINGOLD, K.R.; ANAWALT, B.; BOYCE, A.; CHROUSOS, G.; HERDER, W. W.; DUNGAN, K.; GROSSMAN, A.; HERSHMAN, J. M.; HOFLAND, H. J.; KALTSAS, G.; KOCH, C.; KOPP, P.; KORBONITS, M.; MCLACHLAN, R.; MORLEY, J. E.; NEW, M.; PURNELL, J.; SINGER, F.; STRATAKIS, C. A.; TRENCE, D.L.; WILSON, D. P. Editores. **Endotext [Internet]**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–, 2019.

ANSTEE, Q. M.; REEVES, H. L.; KOTSILITI, E.; GOVAERE, O.; HEIKENWALDER, M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, p. 411–28, 2019

ARAYA, J.; RODRIGO, R.; VIDELA, L. A.; THIELEMANN, L.; ORELLANA, M.; PETTINELLI, P.; PONIACHIK, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Science**, v. 106, n. 6, p. 635-643, 2004.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 360438, 2014.

BERG, A. H.; COMBS, T. P.; DU, X.; BROWNLEE, M.; SCHERER, P. E. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nature medicine**, v.7, n. 8, p. 947-953, 2001.

BERTOT L, C.; ADAMS, L. A. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 774, 2016.

BIRKENFELD, A. L.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 713–723, 2014.

BODEN G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 1, p. 3-10, 1997.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, n., p. 302-310, 1978.

CALDWELL, S. H.; SWERDLOW, R. H.; KHAN, E. M.; IEZZONI, J. C.; HESPENHEIDE, E. E.; PARKS, J. K.; PARKER JUNIOR, W. D. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of hepatology**, v. 31, n. 3, p. 430-434, 1999.

CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 3, p. 396-413, 2014.

CHABOWSKI, A.; ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; KONSTANTYNOWICZ, K.; PANKIEWICZ, W.; MIKŁOSZ, A.; ŁUKASZUK, B.; GÓRSKI, J. Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. **Acta Physiologica**, v. 207, n. 2, p. 346-357, 2013.

CHAO, H. W.; CHAO, S. W.; LIN, H.; KU, H. C.; CHENG, C. F. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 298, 2019.

CHARLTON, M.; VIKER, K.; KRISHNAN, A.; SANDERSON, S.; VELDT, B.; KAALSBEK, A. J.; KENDRICK, M.; THOMPSON, G.; QUE, F.; SWAIN, J.; SARR, M. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1375-1384, 2009.

CHEN, X.; XUE, H.; FANG, W.; CHEN, K.; CHEN, S.; YANG, W.; SHEN, T.; CHEN, X.; ZHANG, P.; LING, W. Adropin protects against liver injury in nonalcoholic steatohepatitis via the Nrf2 mediated antioxidant capacity. **Redox biology**, v. 21, p. 101068, 2019.

CHEN, Z.; TIAN, R.; SHE, Z.; CAI, J.; LI, H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free radical biology & medicine**, v. 152, p. 116-141, 2020.

CHENG, K. P.; OU, H. Y.; HUNG, H. C.; LI, C. H.; FAN, K. C.; WU, J. S.; WU, H. T.; CHANG, C. J. Unsaturated Fatty Acids Increase the Expression of Hepassocin through a Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Dependent Pathway in HepG2 Cells. **Lipids**, v. 53, n. 9, p. 863-869, 2018.

CHU, Q.; ZHANG, S.; CHEN, M.; HAN, W.; JIA, R.; CHEN, W.; ZHENG, X. Cherry Anthocyanins Regulate NAFLD by Promoting Autophagy Pathway. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

DAY, C. P. From fat to inflammation. **Gastroenterology**, v. 130, n. 1, p. 207-210, 2006.

DENIAUD, A.; SHARAF EL DEIN, O.; MAILLIER, E.; PONCET, D.; KROEMER, G.; LEMAIRE, C.; BRENNER, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 285-299, 2008.

DOEGE, H.; BAILLIE, R. A.; ORTEGON, A. M.; TSANG, B.; WU, Q.; PUNREDDY, S.; HIRSCH, D.; WATSON, N.; GIMENO, R. E.; STAHL, A. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1245-1258, 2006.

DOEGE, H.; GRIMM, D.; FALCON, A.; TSANG, B.; STORM, T. A.; XU, H.; ORTEGON, A. M.; KAZANTZIS, M.; KAY, M. A.; STAHL, A. Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves hyperglycemia. **J Biol Chem**, v. 283, n. 32, p. 22186-22192, 2008.

DONATO, M. T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. **Methods in molecular biology**, v. 1250, p. 77-93. 2005.

DONNELLY, K. L.; SMITH, C. I.; SCHWARZENBERG, S. J.; JESSURUN, J.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005.

FABBRINI, E.; MOHAMMED, B. S.; MAGKOS, F.; KORENBLAT, K. M.; PATTERSON, B. W.; KLEIN, S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 424-431, 2008.

FANG, Y. L.; CHEN, H.; WANG, C. L.; LIANG, L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 27, p. 2974-2983, 2018.

FENG, B.; YAO, P. M.; LI, Y.; DEVLIN, C. M.; ZHANG, D.; HARDING, H. P.; SWEENEY, M.; RONG, J. X.; KURIAKOSE, G.; FISHER, E. A.; MARKS, A. R.; RON, D.; TABAS, I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. **Nature cell biology**, v. 5, n. 9, p. 781-792, 2003.

FERRAMOSCA, A.; DI GIACOMO, M.; ZARA, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 23, 4146-4157, 2017.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, 2019.

FOUAD, Y.; WAKED, I.; BOLLIPO, S.; GOMAA, A.; AJLOUNI, Y.; ATTIA, D. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 40, n. 6, p. 1254-1261, 2020.

FRANCQUE, S., VERRIJKEN, A., CARON, S., PRAWITT, J., PAUMELLE, R., DERUDAS, B., LEFEBVRE, P., TASKINEN, M. R., VAN HUL, W., MERTENS, I., HUBENS, G., VAN MARCK, E., MICHIENSEN, P., VAN GAAL, L.; STAELS, B. PPAR $\alpha$  gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of hepatology**, v. 63, n. 1, p. 164-173, 2015.

FRANGIOUDAKIS, G.; BURCHFIELD, J. G.; NARASIMHAN, S.; COONEY, G. J.; LEITGES, M.; BIDEN, T. J.; SCHMITZ-PEIFFER, C. Diverse roles for protein kinase C  $\delta$  and protein kinase C  $\epsilon$  in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C  $\delta$ . **Diabetologia**, v. 52, n. 12, p. 2616-2620, 2009.

FRIEDMAN, S. L.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; RINELLA, M.; SANYAL, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature medicine**, v. 24, n. 7, p. 908-922, 2018.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FU, A.; SHI, X.; ZHANG, H.; FU, B. Mitotherapy for Fatty Liver by Intravenous Administration of Exogenous Mitochondria in Male Mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 241, 2017.

GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. **Hepatology communications**, v. 2, n. 12, p. 1425-1439, 2018.

GARCÍA-RUIZ, I.; RODRÍGUEZ-JUAN, C.; DÍAZ-SANJUÁN, T.; MARTÍNEZ, M. A.; MUÑOZ-YAGÜE, T.; SOLÍS-HERRUZO, J. A. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 414-423, 2007.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. **J endocrinol**, v. 234, n. 1, p. R1–R21, 2017.  
GE, P. S.; RUNYON, B. A. Treatment of Patients with Cirrhosis. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 8, p. 767-777, 2016.

GHAMAR CHEHREH, M. E.; VAHEDI, M.; POURHOSEINGHOLI, M. A.; ASHTARI, S.; KHEDMAT, H.; AMIN, M.; ZALI, M. R.; ALAVIAN, S. M. Estimation of diagnosis and treatment costs of non-alcoholic Fatty liver disease: a two-year observation. **Hepatitis monthly**, v. 13, n. 5, p. 7382, 2013.

GHEMRAWI, R.; BATTAGLIA-HSU, S. F.; ARNOLD, C. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. **Cells**, v. 7, n. 6, p. 63, 2018.

GLUCHOWSKI, N. L.; BECUWE, M.; WALTHER, T. C.; FARESE JUNIOR, R.V. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 6, p. 343-355, 2017.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; JIMÉNEZ, N.; CASTELL, J. V.; O'CONNOR, J. E. A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis. **Chemico-biological interactions**, v. 165, n. 2, p. 106-116, 2007.

GRAJALES, D.; FERREIRA, V.; VALVERDE, Á. M. Second-Generation Antipsychotics and Dysregulation of Glucose Metabolism: Beyond Weight Gain. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1336, 2019.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

HAJIGHASEM, A.; FARZANEGI, P.; MAZAHARI, Z. Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 142-149,2019.

HAUSMAN, D. B.; DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T. J.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 2, n. 4, p. 239-254, 2001.

HETZ, C.; CHEVET, E.; HARDING, H. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 703-719, 2013.

HOLLAND, W. L.; BROZINICK, J. T.; WANG, L. P.; HAWKINS, E. D.; SARGENT, K. M.; LIU, Y.; NARRA, K.; HOEHN, K. L.; KNOTTS, T. A.; SIESKY, A.; NELSON, D. H.; KARATHANASIS, S. K.; FONTENOT, G. K.; BIRNBAUM, M. J.; SUMMERS, S. A. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 5, n. 3, p.167-179, 2007.

HONMA, M.; SAWADA, S.; UENO, Y.; MURAKAMI, K.; YAMADA, T.; GAO, J.; KODAMA, S.; IZUMI, T.; TAKAHASHI, K.; TSUKITA, S.; UNO, K., IMAI, J.; KAKAZU, E.; KONDO, Y.; MIZUNO, K.; KAWAGISHI, N.; SHIMOSEGAWA, T.; KATAGIRI, H. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. **International journal of obesity**, v. 42, n. 9, p. 1544-1555, 2018.

HORTON, J. D.; SHIMANO, H.; HAMILTON, R. L.; BROWN, M. S.;GOLDSTEIN, J. L. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. **J Clinl Invest**, v.103, n.7, p. 1067-1076, 1999.

HUI, J. M.; HODGE, A.; FARRELL, G. C.; KENCH, J. G.; KRIKETOS, A.; GEORGE, J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 46-54, 2004.

IBDAH, J. A.; PERLEGAS, P.; ZHAO, Y.; ANGDISEN, J.; BORGERINK, H.; SHADOAN, M. K.; WAGNER, J. D.; MATERN, D.; RINALDO, P.; CLINE, J. M. Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 128, n. 5, p. 1381-1390, 2005.

IBRAHIM, S. H.; HIRSOVA, P.; MALHI, H.; GORES, G. J. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. **Digestive diseases and sciences**, v. 61, n. 5, p. 1325–1336, 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**, v. 75, n. 18, p. 3313-3327, 2018.

IRIE, M., SOHDA, T.; ANAN, A.; FUKUNAGA, A.; TAKATA, K.; TANAKA, T.; YOKOYAMA, K.; MORIHARA, D.; TAKEYAMA, Y.; SHAKADO, S.; SAKISAKA, S. Reduced Glutathione suppresses Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Euroasian journal of hepato-gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 13-18, 2016.

JANG, E.; SHIN, M. H.; KIM, K. S.; KIM, Y.; NA, Y. C.; WOO, H. J.; KIM, Y.; LEE, J. H.; JANG, H. J. Anti-lipoapoptotic effect of *Artemisia capillaris* extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 253, 2014.

JO, H.; CHOE, S. S.; SHIN, K. C.; JANG, H.; LEE, J. H.; SEONG, J. K.; BACK, S. H.; KIM, J. B. Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1366-1377, 2013.

JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.

KAKINO, S.; OHKI, T.; NAKAYAMA, H.; YUAN, X.; OTABE, S.; HASHINAGA, T.; WADA, N.; KURITA, Y.; TANAKA, K.; HARA, K.; SOEJIMA, E.; TAJIRI, Y.; YAMADA, K. Pivotal Role of TNF- $\alpha$  in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. **Horm Metab Res**, v. 50, n. 1, p. 80-87, 2018.

KOHJIMA, M.; HIGUCHI, N.; KATO, M.; KOTOH, K.; YOSHIMOTO, T.; FUJINO, T.; YADA, M.; YADA, R.; HARADA, N.; ENJOJI, M.; TAKAYANAGI, R.; NAKAMUTA, M. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular medicine**, v. 21, n. 4, p. 507-511, 2008.

KOONEN, D. P., JACOBS, R. L., FEBBRAIO, M., YOUNG, M. E., SOLTYS, C. L., ONG, H., VANCE, D. E.; DYCK, J. R. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2863-2871, 2007.

KRISTIANSEN, M. N.; VEIDAL, S. S.; RIGBOLT, K. T.; TØLBØL, K. S.; ROTH, J. D.; JELSING, J.; VRANG, N.; FEIGH, M. Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. **World journal of hepatology**, v. 8, n.16, p. 673-684, 2016.

LAU, J. K.; ZHANG, X.; YU, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **The Journal of pathology**, v. 241, n. 1, p. 36–44, 2017.

LEBEAUPIN, C.; VALLÉE, D.; HAZARI, Y.; HETZ, C.; CHEVET, E.; BAILLY-MAITRE, B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 69, n. 4, p. 927-947, 2018.

LEE, Y., YU, X.; GONZALES, F.; MANGELSDORF, D. J.; WANG, M. Y.; RICHARDSON, C.; WITTERS, L. A.; UNGER, R. H. PPAR alpha is necessary for the lipopenic action of hyperleptinemia on white adipose and liver tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11848-11853, 2002.

LIANG, H.; ZHANG, L.; WANG, H.; TANG, J.; YANG, J.; WU, C.; CHEN, S. Inhibitory Effect of Gardenoside on Free Fatty Acid-Induced Steatosis in HepG2 Hepatocytes. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 27749-27756, 2015.

LINDSTRÖM P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **TheScientificWorldJournal**, v. 7, p. 666–685, 2007.

LISTENBERGER, L. L.; HAN, X.; LEWIS, S. E.; CASES, S., FARESE JUNIOR, R. V.; ORY, D. S.; SCHAFFER, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 6, p. 3077-3082, 2003.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

MARCHISELLO, S.; DI PINO, A.; SCICALI, R.; URBANO, F.; PIRO, S.; PURRELLO, F.; RABUAZZO, A. M. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1948, 2019.

MARNETT L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation research**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.

MASAKI, T.; CHIBA, S.; TATSUKAWA, H.; YASUDA, T.; NOGUCHI, H.; SEIKE, M.; YOSHIMATSU, H. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 177-184. 2004.



MORAVCOVÁ, A.; ČERVINKOVÁ, Z.; KUČERA, O.; MEZERA, V.; RYCHTRMOC, D.; LOTKOVÁ, H. The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. **Physiological research**, v. 64, n. 5, p. 627-636, 2015.

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

MILIĆ, S., LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9330-9337, 2014.

MOTA, M.; BANINI, B. A.; CAZANAVE, S. C.; SANYAL, A. J. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 8, p. 1049-1061, 2016.

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

MURAWSKA-CIAŁOWICZ, E. Adipose tissue - morphological and biochemical characteristic of different depots. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 71, n. 0, p. 466-484, 2017.

MUSATOV, A.; CARROLL, C. A.; LIU, Y. C.; HENDERSON, G. I.; WEINTRAUB, S. T.; ROBINSON, N. C. Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. **Biochemistry**, v. 41, n. 25, p. 8212-8220, 2002.

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 11, p. 21240-21257, 2013.

NAKAYAMA, H; OTABE, S.; UENO, T.; HIROTA N; YUAN, X; FUKUTAN, T; HASHINAGA, T; WADA, N; YAMADA, K. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, v. 56, n. 4, p. 470-475, 2007.

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

NEWSOME, P. N.; SASSO, M.; DEEKS, J. J.; PAREDES, A.; BOURSIER, J.; CHAN, W. K.; YILMAZ, Y.; CZERNICHOW, S.; ZHENG, M. H.; WONG, V. W.; ALLISON, M.; TSOCHATZIS, E.; ANSTEE, Q. M.; SHERIDAN, D. A.; EDDOWES, P. J.; GUHA, I. N.; COBBOLD, J. F.; PARADIS, V.; BEDOSSA, P.; MIETTE, V.; HARRISON, S. A. FibroScan-AST (FAST) score for the non-invasive identification of patients with non-alcoholic steatohepatitis with significant activity and fibrosis: a prospective derivation and global validation study. **The lancet. Gastroenterology & hepatology**, v. 5, n. 4, p. 362–373, 2020.

NOMOTO, K.; TSUNEYAMA, K.; TAKAHASHI, H.; MURAI, Y.; TAKANO, Y. Cytoplasmic fine granular expression of 8-hydroxydeoxyguanosine reflects early mitochondrial oxidative DNA damage in nonalcoholic fatty liver disease. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 2008.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145-1159, 2012.

NASCIMBENI, F.; PAIS, R.; BELLENTANI, S.; DAY, C.P.; RATZIU, V.; LORIA, P.; LONARDO, A. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. **J Hepatol**, v. 59, p. 859-871, 2013.

OCEANDY, D.; AMANDA, B.; ASHARI, F. Y.; FAIZAH, Z.; AZIS, M. A.; STAFFORD, N. The Cross-Talk Between the TNF- $\alpha$  and RASSF-Hippo Signalling Pathways. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2346, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Padrões e tendências de consumo alimentar global e regional. 2020. Disponível em: <[https://www.who.int/nutrition/topics/3\\_foodconsumption/en/#:~:text=Analysis%20of%20FAOSTAT%20data%20shows,per%20capita%20per%20day%20in](https://www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/#:~:text=Analysis%20of%20FAOSTAT%20data%20shows,per%20capita%20per%20day%20in)>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesidade e excesso de peso. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight#>>

OU, T. T.; HSU, M. J.; CHAN, K. C.; HUANG, C. N.; HO, H. H.; WANG, C. J. Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 15, p. 2740-2748, 2011.

PARADIES, G.; PARADIES, V.; RUGGIERO, F. M.; PETROSILLO, G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14205-14218, 2014.

PARDO, V.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Á.; MUNTANÉ, J.; KOZMA, S. C.; VALVERDE, Á. M. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, n., p. 298-309, 2015.

PENKE, M.; SCHUSTER, S.; GORSKI, T.; GEBHARDT, R.; KIESS, W.; GARTEN, A. Oleate ameliorates palmitate-induced reduction of NAMPT activity and NAD levels in primary human hepatocytes and hepatocarcinoma cells. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 191, 2017.

PESSAYRE, D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 20-27.

PINHEIRO, K.; A.; P.; N. História dos hábitos alimentares ocidentais. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, 2005.

PETROSILLO, G.; CASANOVA, G.; MATERA, M.; RUGGIERO, F. M.;

QIU, Y.; LIU, S.; CHEN, H. T.; YU, C. H.; TENG, X. D.; YAO, H. T.; XU, G. Q. Upregulation of caveolin-1 and SR-B1 in mice with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 12, n. 6, p. 630-636, 2013.

RASHID, A.; WU, T. C.; HUANG, C. C.; CHEN, C. H.; LIN, H. Z.; YANG, S. Q.; LEE, F. Y.; DIEHL, A. M. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. **Hepatology**, v. 29, n. 4, p. 1131-1138, 1999.

RICCHI, M.; ODOARDI, M. R.; CARULLI, L.; ANZIVINO, C.; BALLESTRI, S.; PINETTI, A.; FANTONI, L. I.; MARRA, F.; BERTOLOTTI, M.; BANNI, S.; LONARDO, A.; CARULLI, N.; LORIA, P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

RINELLA, M.; CHARLTON, M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 19-22, 2016.

SAMUEL, V. T.; LIU, Z. X.; QU, X.; ELDER, B. D.; BILZ, S.; BEFROY, D.; ROMANELLI, A. J.; SHULMAN, G. I. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-

alcoholic fatty liver disease. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32345-32353, 2004.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852-871, 2012.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 1, p. 12-22, 2016

SAYINER, M.; OTGONSUREN, M.; CABLE, R.; YOUNOSSI, I.; AFENDY, M.; GOLABI, P.; HENRY, L.; YOUNOSSI, Z. M. Variables Associated With Inpatient and Outpatient Resource Utilization Among Medicare Beneficiaries With Nonalcoholic Fatty Liver Disease With or Without Cirrhosis. **J Clin Gastroenterol**, v. 5, n. 13, p. 254-260, 2017.

SCHWIMMER, J. B.; BEHLING, C.; NEWBURY, R.; DEUTSCH, R.; NIEVERGELT, C.; SCHORK, N. J.; LAVINE, J. E. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 3, p. 641-649, 2005.

SERIN, E.; OZER, B.; GÜMÜRDÜLÜ, Y.; KAYASELÇUK, F., KUL, K.; BOYACIOĞLU, S. Serum leptin level can be a negative marker of hepatocyte damage in nonalcoholic fatty liver. **Journal of gastroenterology**, v. 38, n. 5, p. 471-476, 2003.

SHKLYAEV, S.; ASLANIDI, G.; TENNANT, M.; PRIMA, V.; KOHLBRENNER, E.; KROUTOV, V.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; CRAWFORD, J.; SHEK, E. W.; SCARPACE, P. J.; ZOLOTUKHIN, S. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14217-14222, 2003.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n.11, p. 3015-3025, 2006.

SONG, B.; SCHEUNER, D.; RON, D.; PENNATHUR, S.; KAUFMAN, R. J. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 10, p. 3378-3389, 2008.

SRIVASTAVA, S.; CHAN, C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. **Biotechnology and bioengineering**, v. 99, n. 2, p. 399–410, 2008.

SUGIMOTO, H.; OKADA, K.; SHODA, J.; WARABI, E.; ISHIGE, K.; UEDA, T.; TAGUCHI, K.; YANAGAWA, T.; NAKAHARA, A.; HYODO, I.; ISHII, T.; YAMAMOTO, M. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 298, n. 2, p. G283-G294, 2010.

TANAKA, N.; KIMURA, T.; FUJIMORI, N.; NAGAYA, T.; KOMATSU, M.; TANAKA, E. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 163–177, 2019.

TRAK-SMAYRA, V.; PARADIS, V.; MASSART, J.; NASSER, S.; JEBARA, V.; FROMENTY, B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. **International journal of experimental pathology**, v. 92, n. 6, 413–421, 2011.

TSAI, S. Y.; CHUNG, P. C.; OWAGA, E. E.; TSAI, I. J.; WANG, P. Y.; TSAI, J. I.; YEH, T. S.; HSIEH, R. H. Alpha-mangostin from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) pericarp extract reduces high fat-diet induced hepatic steatosis in rats by regulating mitochondria function and apoptosis. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 88, 2016.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397-411, 2017.

URTASUN, R.; NIETO, N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. **REV ESP ENFERM DIG**, v. 99, n. 4, p. 223-230, 2007.

VAN HERCK, M. A.; VONGHIA, L.; FRANQUE, S. M. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1072, 2017.

VOLMER, R.; VAN DER PLOEG, K.; RON, D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4628-4633, 2013.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JUNIOR, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEI, Y.; WANG, D.; GENTILE, C. L.; PAGLIASSOTTI, M. J. Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 331, n. 1-2, p. 31-40, 2009.

WILSON, C. G.; TRAN, J. L.; ERION, D. M.; VERA, N. B.; FEBBRAIO, M.; WEISS, E. J. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 570-585, 2016.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J., NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n.12, p.1821-1830, 2003.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; MINOKOSHI, Y.; ITO, Y.; WAKI, H.; UCHIDA, S.; YAMASHITA, S.; NODA, M.; KITA, S.; UEKI, K.; ETO, K.; AKANUMA, Y.; FROGUEL, P.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; CARLING, D.; KIMURA, S.; NAGAI, R.; KAHN, B. B.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature medicine**, v. 8, n. 11, p. 1288-1295, 2002.

YAO, H. R.; LIU, J.; PLUMERI, D.; CAO, Y. B.; HE, T.; LIN, L.; LI, Y.; JIANG, Y. Y.; LI, J.; SHANG, J. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. **American journal of translational research**, v. 3, n. 3, p. 284-291, 2011.

YOSHIOKA, N.; ISHIGAMI, M.; WATANABE, Y.; SUMI, H.; DOISAKI, M.; YAMAGUCHI, T.; ITO, T.; ISHIZU, T.; KUZUYA, T.; HONDA, T.; ISHIKAWA, T.; HARUTA, J.I.; FUJISHIRO, M. Effect of weight change and lifestyle modifications on the development or remission of nonalcoholic fatty liver disease : sexspecific analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 481, p. 1–10, 2020.

YOUNOSSI, Z.; ANSTEE, Q. M.; MARIETTI, M.; HARDY, T.; HENRY, L.; ESLAM, M.; GEORGE, J.; BUGIANESI, E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2018.

YOUNOSSI, Z. M.; BLISSETT, D.; BLISSETT, R.; HENRY, L.; STEPANOVA, M.; YOUNOSSI, Y.; RACILA, A.; HUNT, S.; BECKERMAN, R. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. **Hepatology**, v. 64, n. 5, p. 1577-1586, 2016.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A.B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Meta Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

YOUNOSSI, Z. M.; STEPANOVA, M.; AFENDY, M.; FANG, Y.; YOUNOSSI, Y.; MIR, H.; SRISHORD, M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 524-530, 2011.

ZARKOVIC, N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, n. 4-5, 281-291, 2003.

ZHAO, N.; LI, X.; FENG, Y.; HAN, J.; FENG, Z.; LI, X.; WEN, Y. The Nuclear Orphan Receptor Nur77 Alleviates Palmitate-induced Fat Accumulation by Down-regulating G0S2 in HepG2 Cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4809, 2018.

ZHENG, Y.; QU, H.; XIONG, X.; WANG, Y.; LIU, X.; ZHANG, L.; LIAO, X.; LIAO, Q.; SUN, Z.; OUYANG, Q.; YANG, G.; ZHU, Z.; XU, J.; ZHENG, H. Deficiency of Mitochondrial Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Contributes to Hepatic Steatosis. **Hepatology**, v. 70, n. 1, p. 84-97, 2019.

ZHOU, B.; ZHOU, D. L.; WEI, X. H.; ZHONG, R. Y.; XU, J.; SUN, L. Astragaloside IV attenuates free fatty acid-induced ER stress and lipid accumulation in hepatocytes via AMPK activation. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 7, p. 998-1008, 2017

ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7312-7324, 2014.

ZHU, L.; BAKER, S. S.; LIU, W.; TAO, M. H.; PATEL, R.; NOWAK, N. J.; BAKER, R. D. Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: combined effects of pathways on steatosis. **Metabolism**, v. 60, n. 7, p. 1001–1011, 2011.