

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E APOPTOSE EM MODELO *IN VITRO*
DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA AO METABOLISMO

PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2023

VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

**ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E APOPTOSE EM MODELO *IN VITRO*
DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA AO METABOLISMO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

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

**PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2023**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A779 Arruda, Vinícius Marques, 1999-
2023 Estresse oxidativo, inflamação e apoptose em modelo in vitro da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo [recurso eletrônico] / Vinícius Marques Arruda. - 2023.

Orientadora: Joyce Ferreira da Costa Guerra.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.119>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Guerra, Joyce Ferreira da Costa, 1986-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

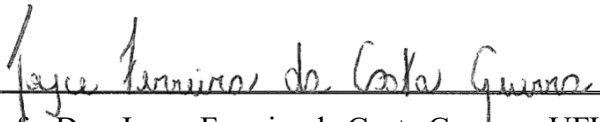
VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E APOPTOSE EM MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA AO METABOLISMO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra – UFU



Profa. Dra. Larissa de Freitas Bonomo – UFJF



Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU

PATOS DE MINAS – MG

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas e parceiros de pesquisa, em especial Dayanne, Fernanda e Helen.

Aos meus companheiros do LBq, em especial Maju, Júnior e João.

Aos professores e servidores da UFU.

Às Dras. Thaise Araújo e Larissa Bonomo pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

À minha professora orientadora Joyce Guerra pela perseverança e comprometimento.

À minha família, em especial meus pais que sempre buscaram o melhor para mim.

Ao Programa de pós-graduação em biotecnologia e Instituto de Biotecnologia por possibilitarem a ciência e a pesquisa.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio, essencial para a realização deste trabalho.

RESUMO

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) representa um amplo espectro clínico-patológico que envolve a esteatose e esteato-hepatite com possível progressão para a cirrose e carcinoma hepatocelular. Com o acúmulo de lipídios nos hepatócitos característico da esteatose, a progressão da MAFLD se dá pela ação conjunta de diversos fatores, especialmente o estresse oxidativo ao impulsionar a inflamação e apoptose. Esse distúrbio multissistêmico é a mais comum das doenças crônicas do fígado, e embora atinja em torno de um quarto da população mundial, ainda não possui tratamento estabelecido. O presente estudo buscou avaliar marcadores do estresse oxidativo, inflamação e apoptose a partir do estabelecimento de um modelo *in vitro* da MAFLD. O acúmulo de lipídios foi induzido em células HepG2 pela exposição aos ácidos oleico e palmítico em diferentes concentrações por 24 e 48 horas e avaliado qualitativa e espectrofotometricamente após coloração com corante *Oil Red O*. A viabilidade e o dano celular foram determinados pelo método MTT e pela atividade das enzimas lactato desidrogenase e aminotransferases liberadas no meio de cultivo. O estresse oxidativo foi avaliado pela quantificação de biomarcadores de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e pelos níveis de glutathiona total e reduzida. Também foi analisada a expressão proteica de intermediários da inflamação e apoptose pela técnica de *western blotting*. Os resultados revelam a eficácia do modelo em promover a esteatose e o estresse oxidativo em células HepG2, principalmente quando expostas à mistura de oleato e palmitato a 2 mM, apresentando níveis aumentados de biomarcadores do estado redox. Consoante a estes resultados, a razão dos níveis de glutathiona em suas formas reduzida e oxidada sugere alterações significativas no sistema glutathiona em resposta ao aumento da peroxidação lipídica, que pode estar relacionada ao aumento da expressão de NF- κ B, indicando possível ativação do processo inflamatório. Por outro lado, reduções mais expressivas na viabilidade celular em associação a um efeito citotóxico foram encontradas em células expostas ao ácido palmítico, consistentemente à maior expressão de caspase-3, que reforça o efeito lipotóxico de ácidos graxos saturados. Portanto, o modelo proposto neste trabalho constitui uma ferramenta útil e relevante para a investigação de mecanismos moleculares e abordagens terapêuticas para a MAFLD.

Palavras-chave: esteatose hepática; NAFLD; células HepG2; inflamação; lipotoxicidade.

ABSTRACT

Metabolism-associated fatty liver disease (MAFLD) represents a broad clinical-pathological spectrum involving steatosis and steatohepatitis with possible progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. With the lipid overaccumulation within hepatocytes, characteristic of steatosis, the progression of MAFLD is due to the joint action of several factors, especially oxidative stress, which drives to inflammation and apoptosis. This multisystem disorder is the most common chronic liver disease, and although it affects around a quarter of the global population, it still has no established treatment. The present study aimed to evaluate markers of oxidative stress, inflammation and apoptosis by the establishment of an in vitro model of MAFLD. Lipid accumulation was induced in HepG2 cells by exposure to oleic and palmitic acids at different concentrations for 24 and 48 hours and evaluated qualitatively and spectrophotometrically after staining with Oil Red O. Viability and cell damage were determined by the MTT method and by the activity of the enzymes lactate dehydrogenase and aminotransferases released in the culture media. Oxidative stress was assessed by quantifying biomarkers of lipid peroxidation, protein carbonylation, and total and reduced glutathione levels. Protein expression of inflammation and apoptosis intermediates was also analyzed using the western blotting technique. The results reveal the effectiveness of the model in promoting steatosis and oxidative stress in HepG2 cells, especially when exposed to a mixture of oleate and palmitate at 2 mM, showing increased levels of biomarkers of redox state. In agreement with these results, the ratios of oxidized and reduced levels of glutathione suggest significant changes in the glutathione system in response to increased lipid peroxidation, which may be related to increased expression of NF- κ B, indicating possible activation of the inflammatory process. On the other hand, more expressive reductions in cell viability associated with a cytotoxic effect were found in cells exposed to palmitic acid, consistent with a greater expression of caspase-3, which reinforces the lipotoxic effect of saturated fatty acids. Therefore, the proposed model constitutes a useful and relevant tool for the investigation of molecular mechanisms and therapeutic approaches for MAFLD.

Keywords: hepatic steatosis; NAFLD; HepG2 cells; inflammation; lipotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: Absorbância
ACC: Acetil-CoA carboxilase
AGL: Ácidos graxos livres
Akt: Serina/treonina-cinase
ALT: Alanina aminotransferase
AP: Ácido palmítico
ApoB: Apolipoproteína B
AST: Aspartato aminotransferase
ATF6: Fator de transcrição 6
ATP: Adenosina trifosfato
BSA: Albumina sérica bovina
C: Grupo controle
Casp-3, Casp-9: Caspases 3 e 9, respectivamente
CAT: Catalase
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CHOP: Proteína homóloga do fator de transcrição C
ChREBP: Proteína de ligação do elemento resposta de carboidrato
Cq: do inglês, *Quantification cycle*
DAG: Diacilgliceróis
DISC: Complexo de sinalização indutor de morte
DMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB: Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO: Espécies reativas de oxigênio
Fas: Membro 6 da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral
FAS: Ácido graxo sintase
FFA: do inglês *Free fatty acids*, ácidos graxos livres
FOXO1: do inglês *Forkhead box Other 1*
g: Grama(s)
G6Pase: Glicose-6-fosfatase
GPx: Glutational peroxidase
GR: Glutational redutase
GSH: Glutational reduzida
GSSG: Glutational oxidada
h: Hora(s)
HepG2: Linhagem celular de hepatocarcinoma
HFD: Dieta hiperlipídica
HNE: 4-hidroxi-2-nonenal
IFN- α/γ : Interferon alfa, interferon gama
IgG: Imunoglobulina G
IKK: complexo quinase do I κ B
IL-1 β /6: Interleucina 1-beta, interleucina 6
IRE1: do inglês *Inositol-requiring signaling protein 1*
I κ B: Inibidor do NF- κ B

JNK: C-Jun N-terminal cinase
kDa: quilodalton(s)
L: Litro(s)
LDH: Lactato-desidrogenase
MAFLD: Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo
MCD: Dieta deficiente em metionina e colina
MDA: Malondialdeído
min: Minuto(s)
mL: Mililitro(s)
mM: Milimolar, milimol por litro
mtDNA: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mTORC1: Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro
NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAFLD: Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH: Esteato-hepatite não alcoólica
NF- κ B: Fator de transcrição nuclear *kappa* B
nm: Nanômetro(s)
Nrf2: Fator nuclear E2 associado ao fator 2
OD: Densidade óptica
OP1: Grupo tratado com ácido oleico e palmítico em proporção 2:1 a 1,0 mM
OP2: Grupo tratado com ácido oleico e palmítico em proporção 2:1 a 2,0 mM
ORO: *Oil Red O*
P: Grupo tratado com ácido palmítico a 0,7 mM
PBS: Tampão fosfato salino
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PERK: do inglês *RNA-activated protein Kinase (PKR)-like ER kinase*
PI3-K: Fosfatidilinositol-3-cinase
PKC- ϵ : Proteína cinase tipo C *épsilon*
PPAR- α : Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos *alfa*
qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
RE: Retículo endoplasmático
RI: Resistência à insulina
ROS: do inglês *Reactive Oxygen Species*, espécies reativas de oxigênio
SCREBP-1c: Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SERCA: Retículo sarco/endoplasmático Ca^{2+} -ATPase
SFB: Soro Fetal Bovino
SOD: Superóxido dismutase
TAG: Triacilgliceróis
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR: Receptor do tipo toll
TNB: Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF- α : Fator de necrose tumoral *alfa*
TNFR: Receptor associado ao fator de necrose tumoral
TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
U/L: Unidades por litro

UPR: Resposta a proteínas não dobradas

VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

VLDLR: Receptor de lipoproteína de densidade muito baixa

µg: Micrograma(s)

µL: Microlitro(s)

µM: Micromolar, micromol por litro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Problema.....	12
1.2 Hipótese.....	13
1.3 Objetivos.....	13
1.3.1 Objetivo geral	13
1.3.2 Objetivos específicos	13
1.4 Justificativa.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Definição	15
2.2 Aspectos gerais e epidemiológicos	16
2.3 Patogênese e progressão	19
2.3.1 Resistência à insulina	22
2.3.2 Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial.....	25
2.3.4 Apoptose e inflamação	33
2.4 Modelos de estudo da MAFLD	38
CAPÍTULO 2	42
Differential effect of oleic and palmitic acids on hepatic steatosis and oxidative stress in HepG2 cells	42
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	78
Normas da revista escolhida para submissão do artigo científico	78

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problema

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) é uma condição do fígado caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, chamada de esteatose hepática. A MAFLD compreende um amplo espectro de condições que envolve além da esteatose, a esteato-hepatite, fibrose, cirrose e eventualmente carcinoma hepatocelular, representando um grande desafio para a saúde mundial (GALLEGO-DURÁN *et. al*, 2021).

Nos dias atuais, a MAFLD afeta mais de um quarto da população global, sendo a mais comum das doenças crônicas do fígado e a causa de câncer hepático que mais cresce no mundo (YOUNOSSI *et al.*, 2016). A alta prevalência da MAFLD tem sido influenciada por hábitos contemporâneos, e cresce paralelamente aos índices de obesidade, diabetes e outras condições metabólicas, sendo por muitas vezes considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (INOUE *et al.*, 2018; YOSHIOKA *et al.*, 2020). Apesar de tal impacto, essa condição ainda é pouco compreendida devido à sua heterogeneidade fenotípica. Mais recentemente, evidências crescentes de estudos pré-clínicos e clínicos destacam o papel do estresse oxidativo na progressão da doença, representando um alvo em potencial para o tratamento e estudo da MAFLD.

Dada a complexidade de parâmetros histológicos e transtornos metabólicos envolvidos na MAFLD, ainda não existem tratamentos terapêuticos eficazes para a doença. Isso se deve principalmente à dificuldade de estratificação de pacientes, haja vista que a MAFLD é assintomática em seus estágios iniciais e o padrão ouro para o diagnóstico completo é a biópsia hepática.

Assim, nas últimas décadas, modelos experimentais da MAFLD têm sido propostos para investigar mecanismos bioquímicos e moleculares que levam à patogênese e progressão da doença. Desse modo, os modelos celulares mais utilizados se baseiam na exposição das células a ácidos graxos, cujo acúmulo lipídico resultante é considerado um marco fenotípico

da doença. Apesar de já existirem diferentes modelos de estudo da esteatose hepática, há pouco consenso sobre uma padronização e mais escassos ainda os trabalhos que avaliam o impacto do acúmulo de lipídios sobre o estresse em associação a outros parâmetros no estabelecimento da MAFLD.

1.2 Hipótese

Diante da complexidade fenotípica da MAFLD, este trabalho se baseia na hipótese de que a exposição aos ácidos palmítico e oleico seja capaz de induzir alterações características da doença, como o estresse oxidativo, apoptose e inflamação em um modelo *in vitro* induzido em células da linhagem HepG2.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar o estresse oxidativo, a inflamação e a apoptose em modelo da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) induzido por ácidos graxos em células da linhagem HepG2.

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar as concentrações dos ácidos graxos palmítico e oleico e o tempo de incubação ideais para a indução da MAFLD em células HepG2.

Avaliar o efeito da sobrecarga lipídica induzida em células HepG2 sobre:

- o conteúdo intracelular de lipídios neutros;
- a viabilidade e o dano celular;
- biomarcadores da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas;
- o sistema glutational;
- a expressão proteica de biomarcadores de apoptose e inflamação.

1.4 Justificativa

A MAFLD é uma preocupação de saúde mundialmente prevalente e que oferece risco para diversas comorbidades, sendo assim referida como uma doença multissistêmica. No entanto, apesar de sua alta incidência, os mecanismos moleculares que levam ao estabelecimento e progressão da MAFLD ainda não são inteiramente compreendidos e parecem envolver fatores heterogêneos que dificultam a estratificação de pacientes e subfenótipos. Além disso, a doença ainda não possui tratamento farmacológico aprovado ou diretrizes médicas bem estabelecidas.

Desse modo, é urgente a necessidade de abordar os mecanismos moleculares e estratégias terapêuticas potencialmente importantes para a MAFLD. Apesar dos esforços robustos da pesquisa dedicada ao estudo da patogênese, prevenção e tratamento da MAFLD, o conhecimento sobre tais assuntos ainda é limitado. Com diversos modelos *in vivo* sendo utilizados, um modelo *in vitro* que engloba características-chave da doença é particularmente útil para uma investigação mais focada em parâmetros específicos da MAFLD. Portanto, a utilização de um modelo *in vitro* da doença também representa uma estratégia na redução do uso de animais de experimentação em ensaios pré-clínicos, em consonância com as políticas de sustentabilidade e ética animal.

Embora já existam modelos *in vitro* estabelecidos e ainda em estudo da esteatose hepática, ainda há grande divergência de condições e metodologias aplicadas para este fim, como a concentração e natureza dos ácidos graxos, mecanismos de entrega, tempo de incubação, diluição, linhagens celulares, entre outros fatores.

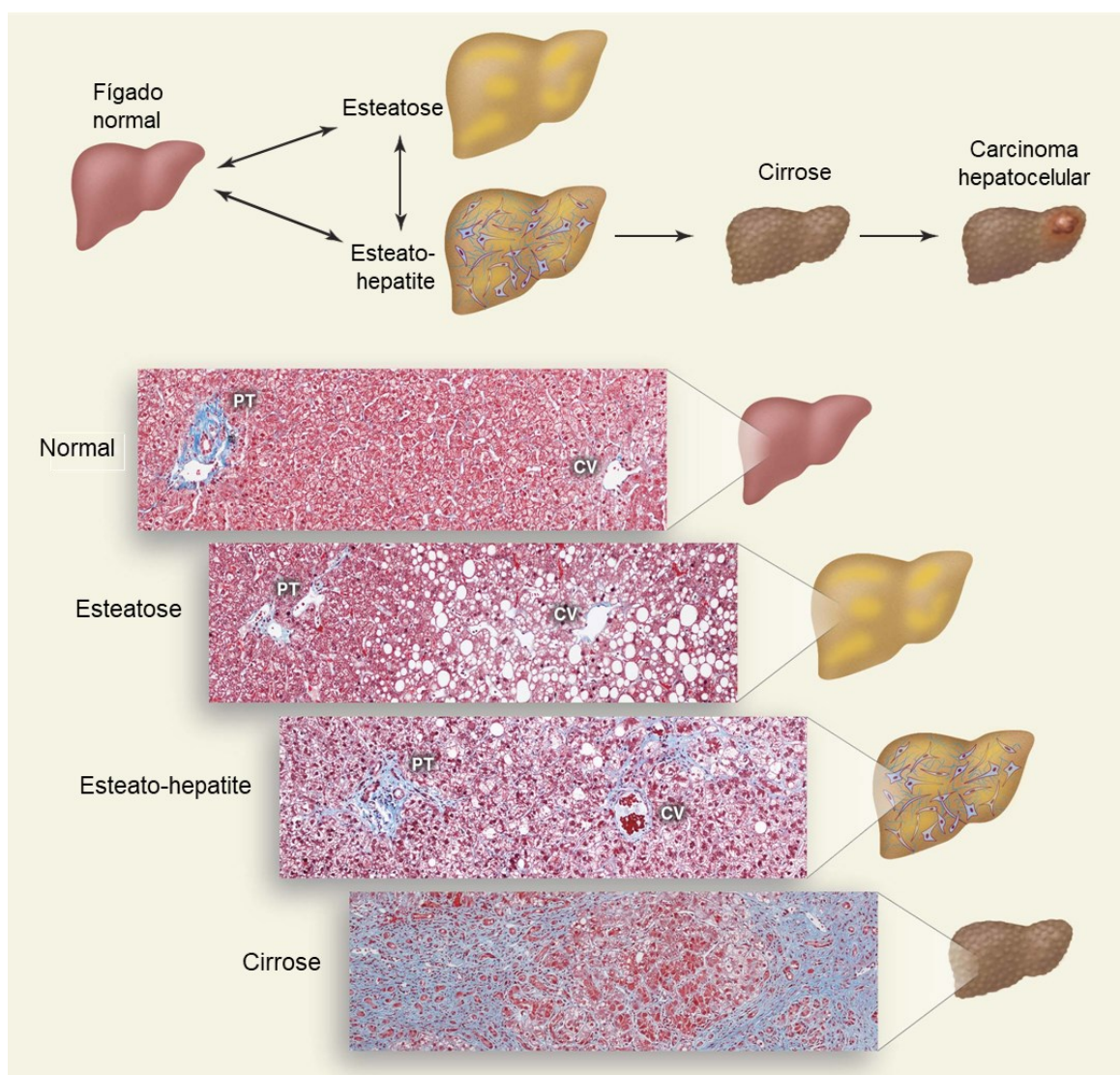
Estudos recentes reforçam a importância do estresse oxidativo na MAFLD em modelos animais e clínicos, cuja sobrecarga de lipídios leva ao aumento da peroxidação lipídica e depleção do sistema antioxidante, entre outros fatores, tornando o fígado mais vulnerável a lesões e ao processo inflamatório. Entretanto, poucos estudos investigam propriamente o estresse oxidativo em modelos *in vitro* da MAFLD, o que enfatiza a relevância e necessidade do presente trabalho na compreensão do papel da homeostase redox na progressão da doença e sua importância na prospecção de alternativas terapêuticas eficazes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) é uma condição clínico-patológica do fígado caracterizada pelo acúmulo excessivo de triacilgliceróis (TAG) no espaço intracelular dos hepatócitos. Essa disfunção possui um curso potencialmente progressivo, que envolve a esteatose e a esteato-hepatite, caracterizada por inflamação e morte celular (Figura 1). Além disso, diferentes estágios de fibrose podem se estabelecer, com possível progressão para cirrose e eventualmente carcinoma hepatocelular (GALLEGO-DURÁN *et. al*, 2021).

Figura 1 – Espectro de condições que constituem a doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). Progressão esquemática da MAFLD (A). Seções histológicas representando o fígado normal, esteatose, esteato-hepatite e cirrose (B). CV, veia central; PT, tríade portal (veia porta, artéria hepática e ducto biliar).



Fonte: COHEN, HORTON, HOBBS, 2011.

Até muito recentemente, a MAFLD era chamada de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), cujo nome ainda pode ser encontrado na pesquisa clínica e no ambiente hospitalar. O termo NAFLD foi cunhado por Ludwig *et al.* (1980) na tentativa descrever achados histológicos semelhantes à hepatite alcoólica, como hepatomegalia e hepatite-lobular, em pacientes prevalentemente obesos e sem histórico de ingestão de álcool. Trabalhos subsequentes reforçaram os achados de Ludwig confirmando a severidade da NAFLD e, com o passar do tempo, novos estudos demonstraram que essa doença contempla uma síndrome clínico-patológica ampla. Desde então, a NAFLD tem sido reconhecida como um espectro de condições que incluem a esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose, na ausência de consumo significativo ou recente de álcool (10 a 20 g de etanol por dia) (EASL-EASD-EASO, 2016).

No entanto, devido à heterogeneidade fenotípica e à imprecisão de terminologias e definições envolvidas na NAFLD, uma reformulação de sua nomenclatura se fez necessária. Desse modo, o acrônimo MAFLD foi recentemente proposto por um consenso internacional de pesquisadores para o melhor entendimento e elaboração da pesquisa médica e de abordagens clínicas (ESLAM *et al.*, 2020). Assim, diante das recentes atualizações, a MAFLD está sujeita a subclassificações baseadas em sua heterogeneidade fenotípica, o que torna o desenvolvimento de modelos de estudo uma ferramenta fundamental para o melhor entendimento das vias fisiopatológicas envolvidas e a investigação de abordagens terapêuticas eficazes.

2.2 Aspectos gerais e epidemiológicos

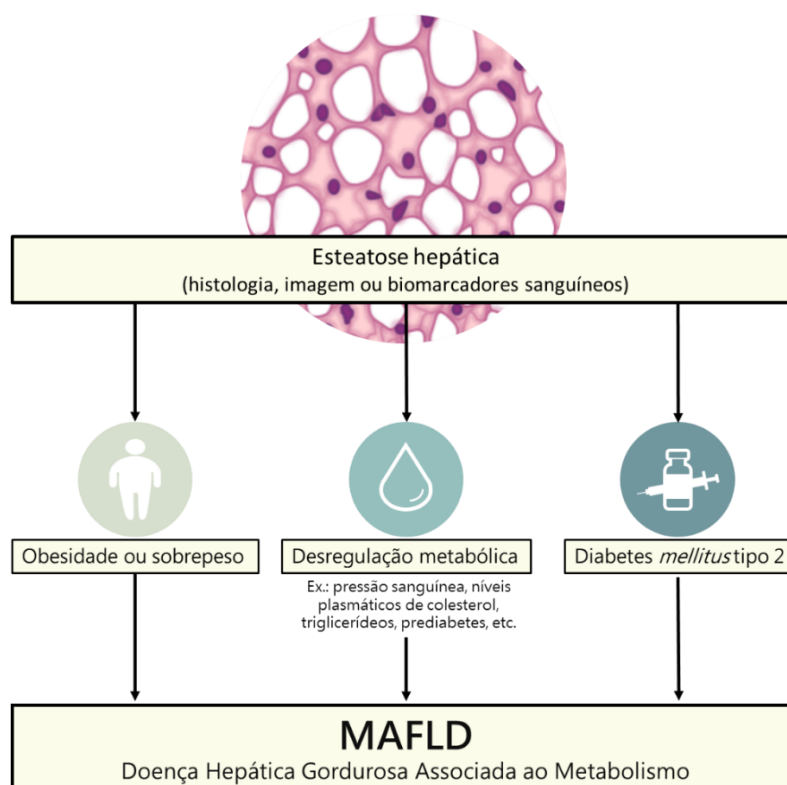
Nas últimas décadas, as mudanças no estilo de vida também afetaram contingencialmente os hábitos alimentares da população, tornando um fenômeno global o consumo excessivo de alimentos com alta densidade energética (PINHEIRO, 2005; RINELLA, CHARLTON, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), a ingestão diária de quilocalorias *per capita* mundial foi 18,87% maior em 2015 do que a consumida em 1964. Assim, doenças de origem metabólica, como obesidade, diabetes e a MAFLD, se tornaram cada vez mais comuns. Dados de 2016 demonstram que aproximadamente 39% dos adultos com 18 anos ou mais apresentavam sobrepeso e 13%

eram obesos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Além disso, a incidência do diabetes também cresceu com o passar dos anos. Estudos da OMS revelam que o número de pessoas portadoras de diabetes quase quadruplicou de 1980 a 2014, crescendo mais rapidamente em países de baixa e média renda, como o Brasil. Paralelamente ao aumento da obesidade e do diabetes, a prevalência da MAFLD também aumentou significativamente, visto que mais de 50 e 80% dos pacientes portadores da MAFLD e de esteato-hepatite são obesos, e 22% convivem com o diabetes tipo 2 (YOUNOSSI *et al.*, 2016).

Dada a ausência de sintomas, complexo diagnóstico e a negligência de pacientes e profissionais, a real prevalência e incidência da MAFLD pode ser difícil de se estimar e representa um desafio para os pesquisadores. Na metanálise de Younossi *et al.* (2016) com dados publicados entre 1989 e 2015, a prevalência de MAFLD diagnosticada por imagem foi estimada em mais de um quarto da população global, sendo a América do Sul uma das regiões de maior incidência. Dentre os países latino-americanos, o Brasil apresenta a maior prevalência, afetando aproximadamente 30% da população (ABDELMALEK, 2016). Além disso, em projeção para o ano de 2030, estima-se que a abrangência da MAFLD seja de 100,9 milhões de pessoas em todo o mundo, o que corresponde a um aumento de 21% em relação a 2015, constituindo um importante problema de saúde pública e um grande desafio devido ao seu impacto clínico, financeiro e social (ESTES *et al.*, 2017).

Clinicamente, a exclusão do consumo significativo de álcool, de infecções virais ou do uso de drogas não é mais um pré-requisito para o diagnóstico da MAFLD, como o era anteriormente para a NAFLD (SINGAL *et al.*, 2018; ESLAM *et al.*, 2020). Com base na aceitação de que a MAFLD pode comumente coexistir com outras condições, seu diagnóstico é determinado pela observação de anormalidades associadas ao metabolismo (Figura 2). O critério primário para seu diagnóstico positivo é a detecção da esteatose hepática, confirmada por evidências histológicas (biópsia), de imagem ou por biomarcadores hepáticos do acúmulo de lipídios (como níveis séricos de triacilgliceróis, ácidos graxos livres, apolipoproteínas, colesterol, etc.). Além deste parâmetro, deve-se observar pelo menos uma das seguintes condições na saúde do paciente: sobrepeso/obesidade, diabetes melito tipo 2 ou evidência de desregulação metabólica, definida por parâmetros como altos níveis séricos de colesterol e pressão arterial elevada (ESLAM, SANYAL, GEORGE, 2020).

Figura 2 – Critérios para o diagnóstico positivo da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A maioria dos indivíduos com MAFLD são clinicamente assintomáticos nos estágios iniciais da doença, o que pode dificultar seu diagnóstico precoce e a determinação de um prognóstico (KUPČOVÁ *et al.*, 2019). Além disso, o padrão ouro para a identificação da doença e único método capaz de determinar a gravidade do dano hepático é a biópsia do fígado, que por ser um procedimento invasivo, não é sempre o exame solicitado (NEWSOME *et al.*, 2020). Exames de imagem, como a ultrassonografia, são recomendados na primeira linha de diagnóstico, mas também apresentam limitações como custo e em certos procedimentos, a impossibilidade de detecção da esteatose abaixo de 20% (ZHOU *et al.*, 2019). Assim, testes alternativos para o diagnóstico não invasivo da MAFLD se baseiam na avaliação dos níveis de biomarcadores de dano hepático, como as enzimas alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST), que estão comumente elevadas no espectro da doença (BORLAK, CHOUGULE, SINGH, 2014). Além disso, a heterogeneidade fenotípica dos pacientes, influenciada por diversos fatores, como idade, sexo, estado hormonal e metabólico, etc., dificulta a padronização de um diagnóstico único, além de se refletir também no desenvolvimento de abordagens terapêuticas.

Apesar de seu grande impacto na saúde e economia mundial, a MAFLD ainda não possui farmacoterapia aprovada e os tratamentos profiláticos se baseiam no aprimoramento

da atividade física e na redução do consumo de frutose e lipídios na dieta, como ácidos graxos saturados e gorduras *trans* (YOUNOSSI *et al.*, 2017). Tais intervenções geralmente objetivam promover a redução da adiposidade, podendo conduzir a uma melhora relativa da esteatose hepática, da inflamação e lesão hepatocelular de indivíduos com esteato-hepatite, além de reduzir o risco para doenças cardiovasculares (PROMRAT *et al.*, 2010; SULLIVAN *et al.*, 2012).

Por outro lado, o consumo de frutas e vegetais ricos em compostos bioativos (polifenóis, fibras, vitaminas, etc.) é fortemente encorajado dada sua eficácia na redução do risco de doenças crônicas (DONGIOVANNI *et al.*, 2016). Dessa forma, vários ensaios clínicos que investigam o potencial de produtos naturais contra o espectro da MAFLD têm sido desenvolvidos, obtendo resultados promissores. De fato, diversas evidências conferem às plantas uma fonte abundante de compostos bioativos capazes de atenuar a esteatose, restaurar a função mitocondrial, melhorar a toxicidade hepática induzida pelo estresse oxidativo, além de propriedades como a atividade anti-inflamatória e hipolipidêmica (FERRAMOSCA, DI GIACOMO, ZARA, 2017; AJITH, 2018). No entanto, apesar do evidente potencial terapêutico dos produtos naturais e de outras estratégias, mais estudos são necessários para a elucidação de seus mecanismos de atuação e melhor compreensão de efeitos hepatoprotetores.

2.3 Patogênese e progressão

Embora a patogênese da MAFLD não seja ainda totalmente compreendida, diversas hipóteses atribuem à esteatose o primeiro e mais proeminente estágio para o desenvolvimento da doença (CHALASANI *et al.*, 2018). A esteatose hepática, popularmente conhecida como fígado gorduroso, é caracterizada pela retenção de lipídios nos hepatócitos, principalmente na forma de TAG, em quantidade superior a 5% do peso líquido das células e está presente em 100% dos casos de MAFLD. Ainda que seja um estágio reversível, um quarto dos casos de esteatose se desenvolve para esteato-hepatite, e destes, mais de um quarto progridem para fibrose severa (HU *et al.*, 2018).

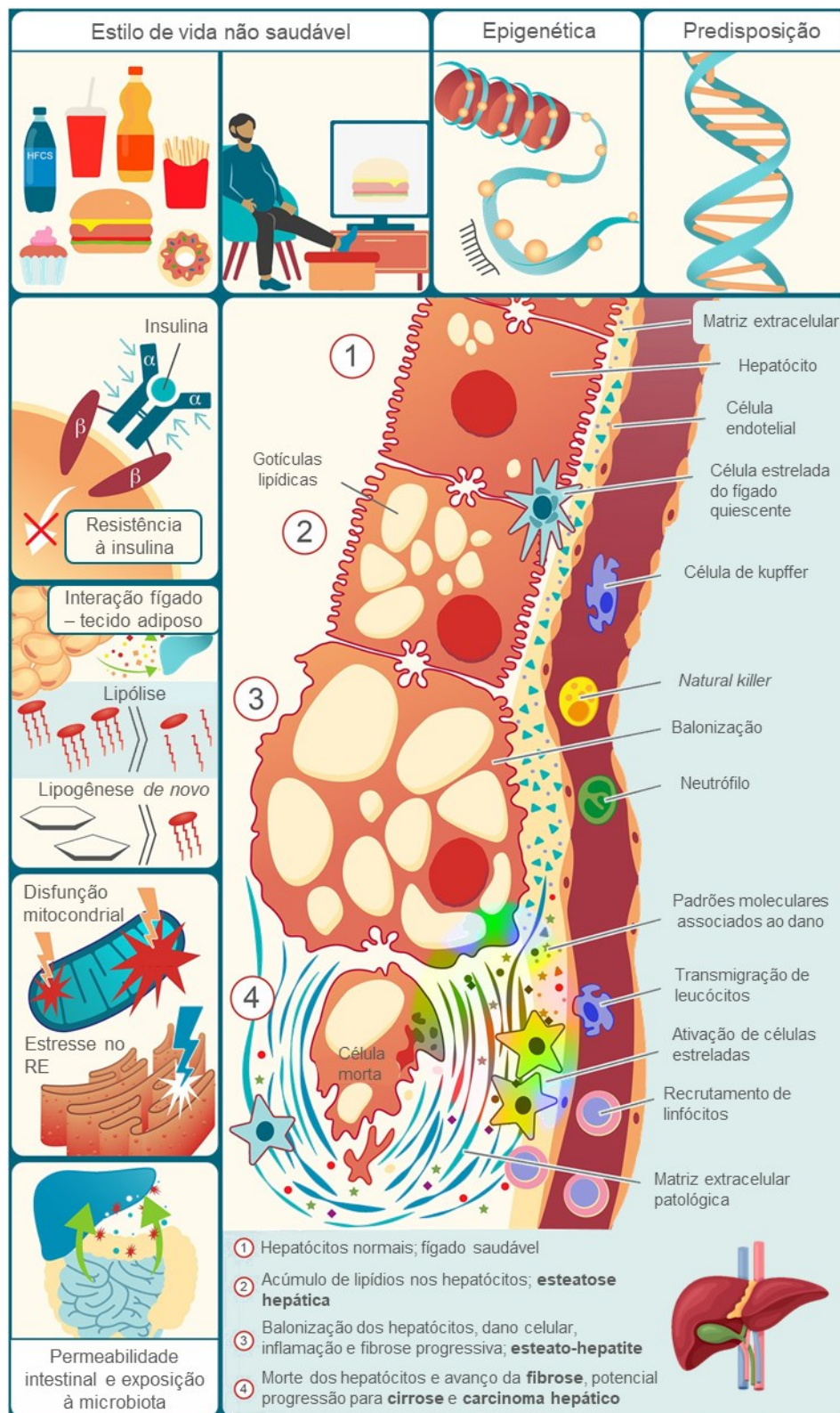
O acúmulo de TAG é resultado de alterações no metabolismo lipídico intra e extra-hepático decorrentes principalmente da resistência à insulina (RI), um dos principais fatores de risco da MAFLD (MARCHESINI *et al.*, 1999). TAG são gerados a partir de ácidos graxos livres (AGL) e suas principais fontes são o processo de lipólise do tecido adiposo, a síntese

intracelular *de novo* e os lipídios da dieta, que são captados pelo fígado na forma de quilomícrons. Nos hepatócitos, os AGL podem ser oxidados, principalmente na β -oxidação mitocondrial ou esterificados na síntese de TAG, para o armazenamento em gotículas ou para a exportação associados à apolipoproteína B (ApoB) na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (LEONARDO; LORIA, 2002). Além disso, transformações significativas no tecido adiposo culminam na hipertrofia dos adipócitos, alterações no padrão de secreção de adipocinas e infiltração de macrófagos no tecido, levando a um aumento da taxa de apoptose dos adipócitos e a ativação do processo inflamatório. Em conjunto, estes fatores culminam em alterações no balanço entre as vias de síntese, degradação e secreção de lipídios no fígado, contribuindo para o acúmulo intracelular de ácidos graxos e seus metabólitos (PAREKH; ANANIA, 2007; MCCARTHY; RINELLA, 2012).

Diante do papel central da esteatose hepática, Day e James (1998) propuseram inicialmente o modelo dos “dois *hits*” para elucidar o mecanismo etiopatogênico da MAFLD. Nessa hipótese, o acúmulo citoplasmático de TAG resultante da RI constitui o “primeiro *hit*”. Ainda que reversível, a esteatose representa um estado vulnerável para o desenvolvimento do “segundo *hit*”, que se caracteriza principalmente pelo estresse oxidativo ao desempenhar um papel central na progressão da doença. Nesse mecanismo, a saturação do metabolismo de lipídios causada pela sua sobrecarga, leva a alterações na função mitocondrial e ao aumento na produção de espécies reativas aliado à ineficiência do sistema antioxidante. O estresse oxidativo resultante também pode causar danos celulares pela peroxidação lipídica e está estritamente relacionado à ativação do sistema imune.

No entanto, apesar da relevância de ambos os fatores no desenvolvimento da MAFLD, o modelo dos “dois *hits*” é inadequado diante da heterogeneidade de mecanismos envolvidos nos diversos fenótipos da doença. Logo, a compreensão atual sobre a etiopatogênese da MAFLD envolve a hipótese de “múltiplos *hits*” (KUPČOVÁ *et al*, 2019). Tais *hits* consistem em uma ação conjunta e/ou sequencial de fatores variados em indivíduos geneticamente predispostos, como o estresse oxidativo associado à disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e ao estresse do retículo endoplasmático, aspectos nutricionais e epigenéticos, intermediários inflamatórios, hormônios secretados do tecido adiposo e a microbiota intestinal (Figura 3) (MARCHISELLO *et al.*, 2019; BUZZETTI, PINZANI, TSOCHATZIS, 2016).

Figura 3 – Fatores de risco e eventos moleculares e fisiológicos envolvidos na patogênese e progressão da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD).



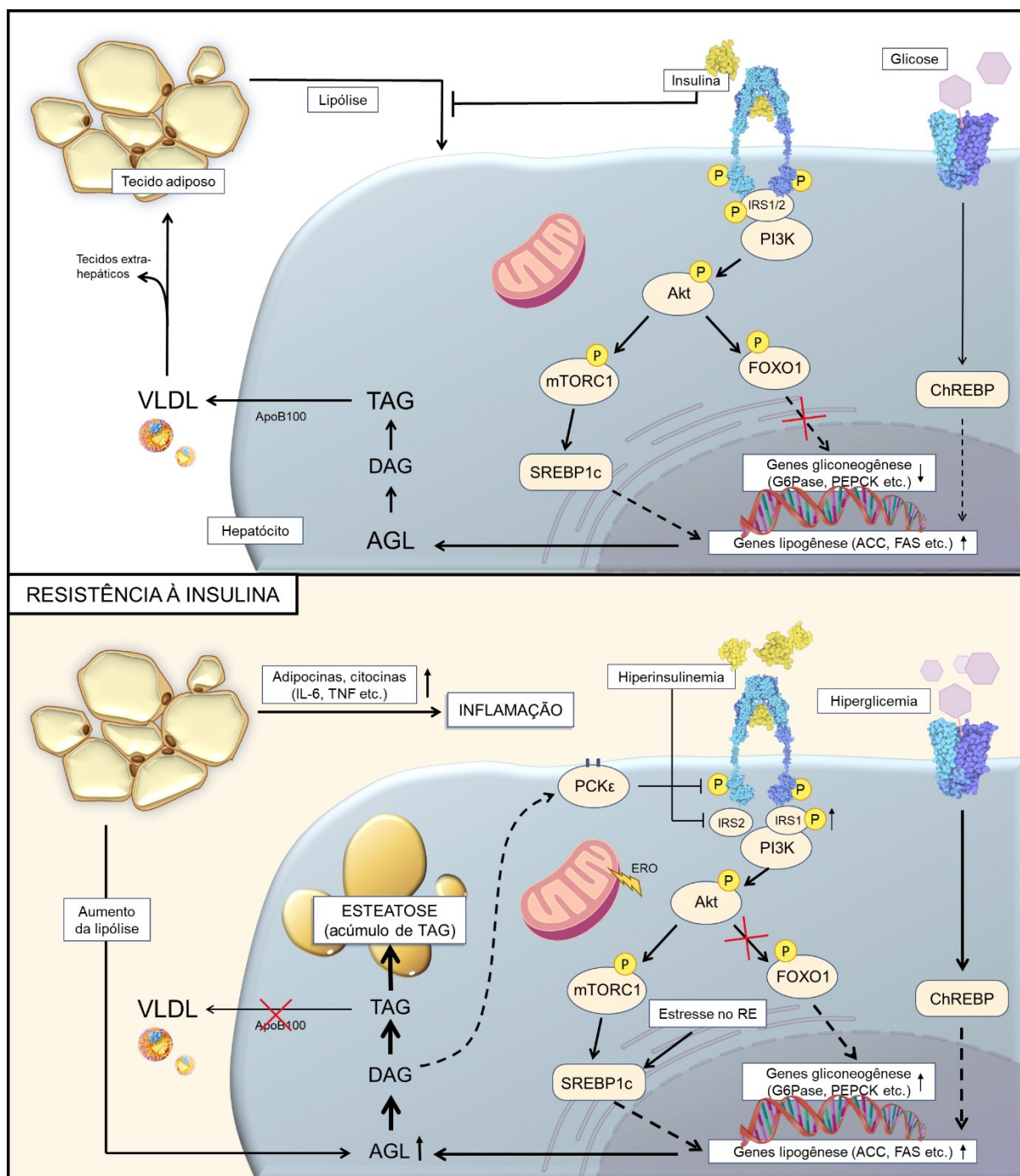
Fonte: adaptado de TORRES *et al.*, 2021

2.3.1 Resistência à insulina

A sinalização da insulina é essencial para manutenção do metabolismo lipídico e de carboidratos no organismo. No estado pós-prandial e a concentrações plasmáticas elevadas, a insulina se liga ao seu receptor, induzindo a autofosforilação de resíduos de tirosina em sua subunidade intracelular. Esse processo causa a fosforilação e ativação dos substratos do receptor de insulina (IRS), como IRS1 e IRS2, cujos resíduos fosforilados atuam como sítios de ligação para proteínas que atuam em vias de coordenação do tráfego intracelular de vesículas, síntese de outras proteínas, ativação ou inibição da atividade de enzimas e expressão gênica (SAKURAI *et al.*, 2021).

Em uma dessas vias, a fosforilação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3-K) com subsequente ativação de uma serina/treonina-cinase (Akt) desencadeia uma cascata de enzimas quinase. A Akt ativada fosforila e inibe a FOXO1 (do inglês Forkhead box Other 1), reduzindo a atividade transcricional de vários genes, incluindo as enzimas gliconeogênicas glicose-6-fosfatase (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), suprimindo assim a produção de glicose pela gliconeogênese hepática. A Akt ainda media o metabolismo lipídico nos hepatócitos pela ativação do fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c), que é regulado tanto a nível transcricional quanto proteolítico pela ação da mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina), uma das moléculas na via de sinalização da Akt. O SREBP-1c então leva à transcrição de diversos genes envolvidos na síntese de lipídios, como aqueles que codificam a acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e enzimas do complexo de alongamento de ácidos graxos, promovendo a lipogênese hepática (Figura 4) (SAKURAI *et al.*, 2021).

Figura 4 – Representação esquemática da resistência à insulina como fator etiopatogênico da esteatose hepática. ACC, Acetil-CoA carboxilase; AGL, Ácidos graxos livres; Akt, Serina/treonina-cinase; ApoB100, Apolipoproteína B 100; ChREBP, Proteína de ligação do elemento resposta de carboidrato; DAG, Diacilgliceróis; ERO, Espécies reativas de oxigênio; FAS, Ácido graxo sintase; FOXO1, *Forkhead box Other 1*; G6Pase, Glicose-6-fosfatase; IL-6, interleucina 6; IRS1/2, Substrato do receptor de insulina 1 e 2; mTORC1, Complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina; P, Grupo fosfato; PCK ϵ , Proteína cinase tipo C épsilon; PEPCK, Fosfoenolpiruvato carboxicinase; PIK3, Fosfatidilinositol-3-cinase; RE, Retículo endoplasmático; SREBP1c, Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol; TAG, Triacilgliceróis; TNF α , Fator de necrose tumoral alfa; VLDL, Lipoproteína de densidade muito baixa.



Fonte: Elaborado pelo autor

Dada a importância da insulina, alterações em sua sinalização são observadas em diversas disfunções metabólicas (HONMA *et al.*, 2018; SAMUEL, SHULMAN, 2016). Não obstante, a RI é um importante fator de risco para a patogênese e progressão da MAFLD. Nessa condição, a resposta biológica à estimulação pela insulina é prejudicada nos tecidos-alvo, principalmente fígado, músculo e tecido adiposo. Com a disposição de glicose comprometida, ocorre um aumento compensatório de sua produção intracelular e a

consequente produção adicional de insulina nas células beta pancreáticas, levando aos estados de hiperglicemia e hiperinsulinemia. No tecido adiposo, a RI leva a uma deficiência na inibição da lipólise, com o consequente aumento do efluxo de AGL para o fígado, além de promover sua disfunção levando à produção e secreção aumentada de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (MILIĆ, LULIĆ, ŠTIMAC, 2014). Além disso, a RI ainda contribui para o acúmulo de TAG nos hepatócitos pela regulação negativa da expressão da ApoB, impedindo sua exportação para o tecido adiposo na forma de VLDL (VAZQUEZ *et al.*, 2008; ANGULO, 2002).

Assim, em resposta aos níveis aumentados de glicose, outro fator de transcrição importante, a proteína de ligação do elemento resposta ao carboidrato (ChREBP), induz a expressão de enzimas fundamentais da glicólise e da lipogênese (AL SHARIF *et al.*, 2014). Diversos modelos experimentais comprovam o efeito de ChREBP sobre a MAFLD, já que sua expressão se encontra frequentemente elevada no fígado de ambos pacientes com obesidade e esteato-hepatite (HURADO *et al.*, 2011; BENHAMED *et al.*, 2012). No estudo de Dentin *et al.* (2006), a inibição hepática temporária de ChREBP em camundongos obesos resultou na melhora da esteatose hepática pela inibição de enzimas lipogênicas. Similarmente, o *knockout* hepatócito específico de ChREBP em camundongos também apresentou um efeito protetor contra a esteatose induzida por uma dieta rica em carboidratos (JOIS *et al.*, 2017).

Consoante a estes resultados, diversas linhas de evidência indicam que a RI é seletiva e não afeta a síntese de lipídios do mesmo modo que o faz ao metabolismo de carboidratos (LEITE *et al.*, 2014). Em muitos modelos experimentais e clínicos da MAFLD, se observa uma regulação positiva na expressão de G6Pase e PEPCK, resultante do comprometimento dos efeitos supressores da insulina na gliconeogênese. Por outro lado, a sinalização da insulina através da via lipogênica hepática não se encontra suprimida, mas sim estimulada, corroborando a hipótese de uma resistência seletiva à insulina (HONMA *et al.*, 2018; NAKAMURA; TERAUCHI, 2013). Dados obtidos também revelam alterações na expressão de IRS-2, fator que contribui para o desenvolvimento da insulinoresistência. Em uma análise realizada com amostras hepáticas de pacientes da MAFLD, Honma *et al.* (2018) observaram uma forte correlação positiva entre IRS-1 e a expressão de mRNA da FAS, em oposição a uma correlação negativa entre IRS-2 e os níveis de mRNA da G6Pase e PEPCK. Estes resultados sugerem que a expressão de 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. Além disso, em pacientes portadores da doença, foi constatado também que a expressão de IRS-1 está associada com níveis elevados de SREBP-1c, mas não com a expressão de IRS-2 (KOHJIMA *et al.*, 2008).

Além disso, desregulações na via PI3-K/Akt também estão associadas com a progressão da MAFLD (MICHELOTTI, MACHADO, DIEHL, 2013). Em um estudo de indução da expressão de PI3-K em animais transgênicos, Kudo *et al.* (2011) observaram uma alta expressão de Akt e mTOR, além do desenvolvimento de esteatose, esteato-hepatite e câncer hepático. Em outro estudo, pesquisadores comprovaram que a ativação de Akt pode levar ao estabelecimento da MAFLD associada a altos níveis de TAG, enquanto sua inibição era capaz de prevenir a esteatose hepática em camundongos obesos (LEAVENS *et al.*, 2009).

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 intermediários da síntese de TAG, os diacilgliceróis (DAG), no comprometimento da sinalização da insulina (PETERSEN, SHULMAN, 2017). 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 da proteína cinase tipo C épsilon (PKC- ϵ) que, por sua vez, inibe o receptor de insulina cinase, promovendo então, a diminuição da fosforilação de IRS-2 e da sinalização de insulina a jusante (PETERSEN *et al.*, 2016). Verificou-se também, que a expressão hepática da PKC ϵ em camundongos *knockout* alimentados com dieta hiperlipídica, foi capaz de prevenir a RI, apesar do desenvolvimento de esteatose hepática, determinando o papel específico e direto da PKC ϵ na aquisição da RI (FRANGIOUDAKIS *et al.*, 2009).

Assim, o acúmulo de metabólitos lipídicos específicos no fígado, muitas vezes em decorrência de dietas ricas em ácidos graxos, demonstra ser um importante mecanismo que leva à ineficiência na sinalização hepática da insulina e ao estabelecimento da MAFLD (BIRKENFELD, SHULMAN, 2014; SAMUEL, SHULMAN, 2012).

2.3.2 Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

Espécies reativas, especialmente as de oxigênio (ERO), são continuamente produzidos nas células como subprodutos do metabolismo energético. A depender de sua natureza, tipos celulares e ambiente tecidual, níveis basais de ERO são responsáveis por

desempenhar funções importantes em processos fisiológicos normais, como a ativação de proteínas cinase, estímulo à proliferação e diferenciação celular, defesa contra agentes infecciosos e morte celular por necrose ou apoptose (SARSOUR *et al.*, 2009; FORRESTER *et al.*, 2018). Muitas dessas atividades são geradas pela ativação de fatores de transcrição sensíveis a processos redox, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1, que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre outras funções (LUGRIN *et al.*, 2014).

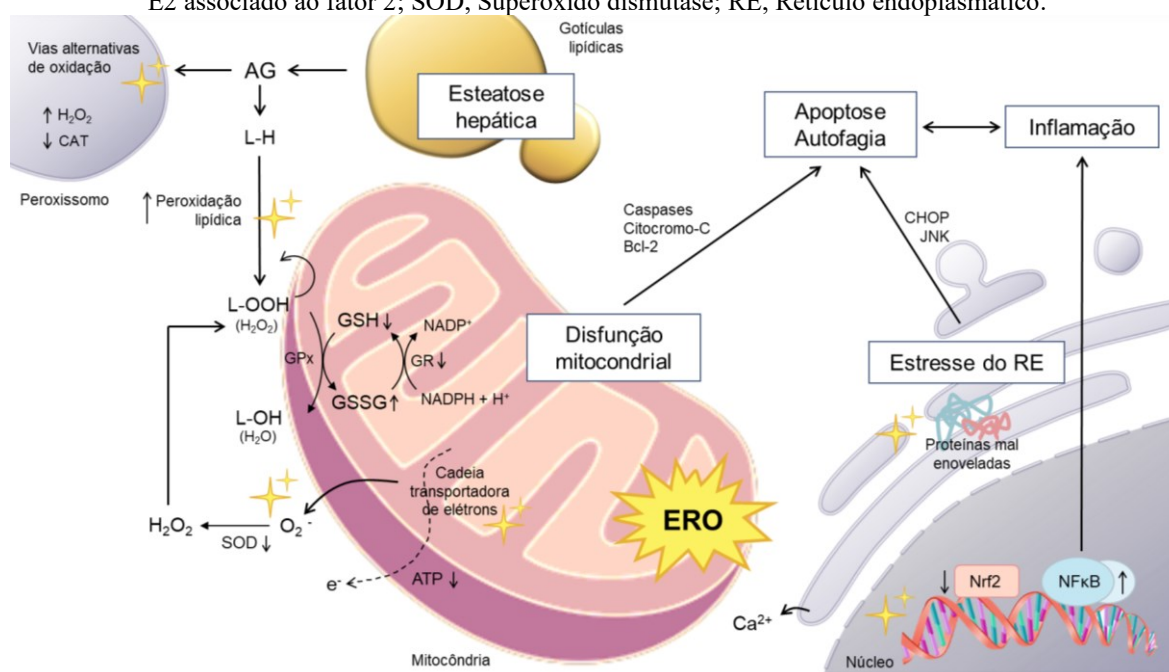
Diversas organelas, como mitocôndrias, peroxissomos e o retículo endoplasmático (RE), geram ERO durante processos fisiológicos. Na maioria das células, a mitocôndria é considerada a fonte mais quantitativamente relevante de ERO e especialmente importante devido à sua participação no metabolismo energético. Na cadeia respiratória mitocondrial, o oxigênio molecular é reduzido à água e esse processo leva à formação de intermediários reativos, como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil, correspondentes à redução de um, dois e três elétrons respectivamente (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A contínua produção de ERO durante os processos metabólicos, normalmente, é balanceada por mecanismos de defesa antioxidante, que mantêm a homeostase de oxirredução através da prevenção direta da formação de ERO, bloqueio ou captura dos radicais formados e processos de reparo, removendo biomoléculas danificadas antes que sua agregação desencadeie alterações no metabolismo celular (CHEESEMAN, SLATER, 1993). O sistema endógeno de defesa antioxidante inclui enzimas como glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e componentes não enzimáticos, proteínas, como transferrina e ferritina e sequestradores de baixo peso molecular, como o ácido úrico, coenzima Q e o ácido lipoico (AGUILAR, NAVARRO, PEREZ, 2016). Mais especificamente, por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-) é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD, e o H_2O_2 pode ser decomposto em H_2O e O_2 pela CAT. Além disso, H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos resultantes da peroxidação lipídica são decompostos pela GPx utilizando glutathione (GSH) como doadora de elétrons, e H_2O_2 é reduzido a H_2O pela peroxirredoxina 1-5 utilizando tioredoxina reduzida como doador de elétrons. Ademais, os xenobióticos são geralmente desintoxicados pela glutathione transferase (GST) (ZHANG *et al.*, 2019; FIGUEIRA *et al.*, 2013). Além da defesa endógena, moléculas antioxidantes exógenas também podem ser adquiridas da dieta, principalmente vitaminas C e E (ácido

ascórbico e α -tocoferol), carotenoides e compostos fenólicos (AGUILAR, NAVARRO, PEREZ, 2016).

No entanto, um desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante frequentemente leva à perda da homeostase redox, promovendo um estado deletério de estresse oxidativo (PARADIES *et al.*, 2014). Em altas concentrações, as ERO causam modificações primariamente em constituintes bioquímicos da célula, seja pela degradação ou simples alteração em estruturas e vias envolvidas, como a liberação de íons cálcio do retículo endoplasmático, desencadeamento da peroxidação lipídica em membranas celulares, mudanças conformacionais e consequente perda de função em peptídeos e a oxidação do DNA (ASHRAF, SHEIKH, 2015). Com isso, o estresse oxidativo muitas vezes promove lesão hepática e morte celular e está associado à patogênese e progressão de diversas doenças, incluindo a MAFLD (Figura 5) (MAULIK *et al.*, 2013).

Figura 5 – Representação esquemática do estado de estresse oxidativo na progressão da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). AG, Ácidos graxos; ATP, Adenosina trifosfato; Ca^{2+} , Íon cálcio; CAT, Catalase; CHOP, Proteína homóloga do fator de transcrição C; ERO, Espécies reativas de oxigênio; GSH, glutatona; GPx, Glutathiona peroxidase; GR, Glutathiona redutase; GSSG, Glutathiona dissulfeto; JNK, C-Jun N-terminal cinase; NF κ B, fator de transcrição nuclear *kappa* B; Nrf2, Fator nuclear E2 associado ao fator 2; SOD, Superóxido dismutase; RE, Retículo endoplasmático.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O papel central do estresse oxidativo na progressão da MAFLD é sustentado por estudos em modelos experimentais e clínicos que demonstram a associação da esteatose com a maior produção de ERO e a disfunção mitocondrial (SUMIDA *et al.*, 2013). Pacientes

portadores da MAFLD muitas vezes apresentam um estado antioxidante prejudicado, com níveis séricos diminuídos das vitaminas C e E, além de baixa atividade ou expressão de enzimas e demais componentes do sistema antioxidante endógeno, salvos os casos em que se encontram aumentados, provavelmente como parte de um mecanismo de resposta compensatória ao desequilíbrio de oxirredução. Junto a estes resultados, diversos estudos também revelam que as concentrações e atividades de biomarcadores do estresse oxidativo geralmente se encontram elevadas em pacientes e modelos da MAFLD, dentre eles o óxido nítrico, produtos da peroxidação lipídica (MDA, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), lipoperóxidos e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)) e produtos da oxidação de proteínas e do DNA (ORE, AKINLOYE, 2019; KOROGLU *et al.*, 2016; VILAR-GOMEZ *et al.*, 2020; BAHCECIOGLU *et al.*, 2005; GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007).

A maior disponibilidade de lipídios em células esteatóticas leva a desregulações nas vias reguladas pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa (PPAR- α), que aumentam a transcrição de genes envolvidos na β -oxidação. Assim, a oxidação de AGL frequentemente aumenta em vias alternativas, principalmente nos peroxissomos e microsomos do retículo endoplasmático (BROWNING; HORTON, 2004). Tais fatores conduzem a um aumento significativo da produção de ERO, citocinas pró-inflamatórias e de intermediários tóxicos.

Outro mecanismo importante do sistema antioxidante é a ativação da transcrição induzida pelo estresse oxidativo. O fator nuclear E2 associado ao fator 2 (Nrf2), por exemplo, é um fator de transcrição sensível ao estado de oxirredução e um dos maiores reguladores do balanço redox (GALICIA-MORENO *et al.*, 2020). Níveis elevados de ERO levam à liberação de Nrf2 e sua translocação para o núcleo para promover a transcrição de genes que codificam componentes antioxidantes (SMOLKOVÁ *et al.*, 2020). Entre outras respostas, o Nrf2 regula os níveis de glutathione e mantém a razão de glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG) adequada. Este fator ainda controla a expressão de diversas enzimas detoxificadoras capazes de eliminar espécies reativas, como H_2O_2 e radicais peróxido do citosol, mitocôndria e RE (HAYES, DINKOVA-KOSTOVA, 2014). Além disso, o Nrf2 está envolvido no metabolismo lipídico e pode desempenhar um papel importante na proteção contra o dano hepático durante o desenvolvimento da esteatose e esteato-hepatite. Alguns estudos *in vivo* da MAFLD usando modelos de dieta hiperlipídica ainda mostraram uma correlação negativa entre a transcrição induzida por Nrf2 e a lipogênese hepática, sugerindo que o Nrf2 pode diminuir a síntese de ácidos graxos e seu

acúmulo no citoplasma, além de aliviar a deposição intracelular de lipídios (ZHANG *et al.*, 2012).

Como citado anteriormente, as mitocôndrias são importantes contribuintes e alvos do estresse oxidativo encontrado no espectro da MAFLD. Nos hepatócitos, essas organelas estão envolvidas não somente na respiração celular, mas também em vias anapleróticas, como a gliconeogênese e outras atividades de biossíntese (GARCÍA-RUIZ, FERNÁNDEZ-CHECA, 2018). Durante a MAFLD, a oxidação aumentada de lipídios produz espécies reativas em excesso, levando a danos celulares que contribuem para o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, caracterizada pela perda da eficiência do metabolismo energético nas mitocôndrias (NICOLSON, 2014).

Alterações funcionais e estruturais características da disfunção mitocondrial contribuem consistentemente para a patogênese da MAFLD. Dentre essas alterações estão mudanças morfológicas, lesões ultraestruturais, depleção de DNA mitocondrial (mtDNA) e comprometimento da atividade de complexos da cadeia respiratória e da β -oxidação mitocondrial (PARADIES *et al.*, 2014). Na mitocôndria, os principais constituintes afetados pelas ERO são a membrana e o material genético. A membrana mitocondrial contém uma concentração substancial de fosfolipídios contendo ácidos graxos poli-insaturados, que são mais susceptivos ao dano oxidativo e levam à peroxidação lipídica (FERRAMOSCA, DI GIACOMO, ZARA, 2017). Por sua vez, a peroxidação desses componentes da membrana, especialmente o ácido docosahexanoico, levam a um maior comprometimento da atividade da cadeia respiratória, com a consequente superprodução de ERO (INFANTE, HUSZAGH, 2000). Esse ciclo vicioso ainda parece aumentar a proteólise pré-secretora de ApoB no retículo endoplasmático, contribuindo para o acúmulo de TAG no interior dos hepatócitos (CAO, KAUFMAN, 2014).

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 anormais (IBDAH *et al.*, 2005). Além disso, depleções e mutações no mtDNA de hepatócitos prejudicam a função mitocondrial podendo causar esteatose e outras lesões hepáticas, muitas vezes reforçadas pela expressão diminuída de produtos peptídicos codificados por mtDNA (SANTAMARIA *et al.*, 2003). Em decorrência de todas essas agressões, a disfunção mitocondrial também favorece vias alternativas de oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos e microssomos do retículo endoplasmático (ω -oxidação), resultando na formação adicional de ERO (BROWNING, HORTON, 2004).

Outro importante fator associado à disfunção mitocondrial encontrada na MAFLD é a ação do fator de necrose tumoral α (TNF- α). Foi observado que o TNF- α pode induzir perturbações mitocondriais como alterações morfológicas anormais na membrana e o inchaço da organela, promovendo sua ruptura e consequentes interferências entre complexos da cadeia respiratória. Além disso, a citocina também pode alterar a cadeia de transporte de elétrons promovendo a ativação do fator induzível por hipóxia-1 α , a ainda danos no mtDNA (CHEN *et al.*, 2012).

Além da disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo também pode provocar desregulações em outras organelas importantes, como o retículo endoplasmático (RE). O RE é uma organela membranosa que fornece um ambiente especializado para a produção e modificação pós-traducional de proteínas extracelulares e de membrana, biossíntese lipídica e manutenção da homeostase do Ca^{2+} intracelular. No lúmen do RE, proteínas recém-sintetizadas sofrem modificações pós-traducionais como a N-glicosilação, formação de ligações dissulfeto e oligomerização, o que requer a presença de proteínas chaperonas (ASHRAF, SHEIKH, 2015). Assim, o retículo é considerado um ponto de checagem e somente proteínas enoveladas corretamente podem ser transportadas para o aparato de Golgi. No entanto, como o fígado é alvo e palco de muitos distúrbios que vão além do estresse oxidativo (por exemplo, privação de nutrientes, hiperlipidemia, infecções virais, metabolismo de drogas, etc.), a homeostase do RE nos hepatócitos pode ser perturbada, levando a alterações no metabolismo lipídico e ao surgimento de doenças hepáticas (GENTILE, FRYE, PAGLIASSOTTI, 2011; ZHOU, LIU, 2014).

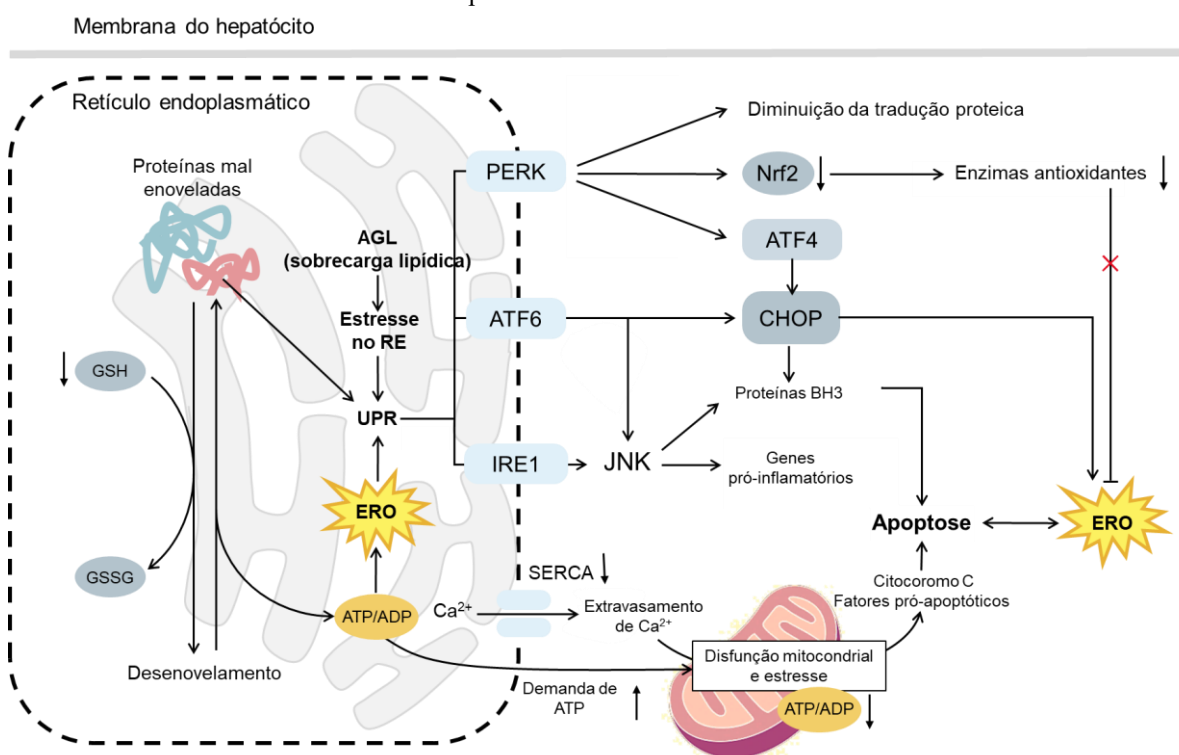
Diversas linhas de evidência sugerem uma estrita associação entre distúrbios no RE, denominados conjuntamente de estresse no RE, e o desenvolvimento da MAFLD. Esses distúrbios levam à ativação de várias vias de estresse intracelular que podem iniciar ou exacerbar a RI, o estresse oxidativo e a inflamação e, em alguns casos, culminar na morte dos hepatócitos e no dano hepático (FANG *et al.*, 2013).

Sob condições de estresse, como a superprodução de ERO e a lipotoxicidade características da esteatose hepática, proteínas não enoveladas ou mal enoveladas se acumulam no lúmen do RE, levando à ativação da resposta a proteínas não dobradas (UPR) para restaurar a homeostase da organela. De fato, estudos comprovam que a UPR está ativada em vários níveis no fígado de pacientes com MAFLD (PURI *et al.*, 2008). As ações dessa resposta envolvem reduzir a carga de proteínas secretoras, aumentar a transcrição de

chaperonas e dobrases para permitir o enovelamento apropriado de proteínas e promover a autofagia e degradação associada ao RE.

Mais especificamente, a atividade da UPR é regulada principalmente por três proteínas transdutoras de estresse que se localizam na membrana do RE: a proteína quinase RNA-activated protein Kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), o fator de transcrição 6 (ATF6) e a proteína-sinal IRE1 (inositol-requiring signaling protein 1). Por meio dessas vias, o estresse do RE ativa uma série de cascatas de sinalização *downstream* (Figura 6). Assim, a partir da ativação de fatores específicos, a PERK promove a transcrição de proteína homóloga do fator de transcrição C (CHOP), que também é um substrato de ATF6. O ATF6 regula positivamente a expressão de proteínas que medeiam as respostas inflamatórias através da via C-Jun N-terminal quinase (JNK). Por sua vez, IRE1 promove a ativação da via JNK, induzindo a expressão de proteínas próapoptóticas, reguladas positivamente também pela ativação de CHOP (LEBEAUPIN *et al.*, 2018; HETZ, CHEVET, HARDING, 2013).

Figura 6 – Papel do estresse no retículo endoplasmático e estresse oxidativo na progressão da MAFLD. ADP, Adenosina difosfato; AGL, Ácidos graxos livres; ATF4/6; ATP, Adenosina trifosfato; Ca^{2+} , Íon cálcio; CHOP, Proteína homóloga do fator de transcrição C; ERO, Espécies reativas de oxigênio; GSH, Glutathiona reduzida; GSSG, Glutathiona oxidada; JNK, C-Jun N-terminal cinase; IRE1, do inglês *Inositol-requiring signaling protein 1*; Nrf2, Fator nuclear E2 associado ao fator 2; PERK, do inglês *RNA-activated protein Kinase (PKR)-like ER kinase*; SERCA, Reticulo sarco/endoplasmático Ca^{2+} -ATPase; UPR, Resposta a proteínas não dobradas.



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2020.

O RE também é uma fonte importante de ERO. O aumento das ERO nessa organela, principalmente H_2O_2 , está por vezes relacionado à utilização excessiva de GSH para reduzir proteínas oxidadas e mal enoveladas (ZEESHAN *et al.*, 2016). Vários estudos ainda mostraram que o estresse prolongado do RE é responsável pelo aumento na produção de ERO mediada pela UPR, regulando positivamente a atividade de CHOP, cuja expressão está notavelmente elevada em modelos *in vivo* da esteato-hepatite. Em uma análise robusta realizada em vários modelos de ratos diabéticos, pesquisadores demonstraram que a deleção de CHOP foi capaz de melhorar a função das células β e aliviar o dano oxidativo, indicando que a ativação de CHOP poderia agravar o estado de estresse e contribuir para o desenvolvimento da MAFLD (SONG *et al.*, 2008).

Além disso, a ativação da UPR também está envolvida na produção de ERO, induzida por CHOP e na redução de mecanismos antioxidantes, como a depleção de glutatona (GSH) e a regulação negativa de Nrf2, que induz a expressão de genes contendo elementos da resposta antioxidante (COMINACINI *et al.*, 2015). Consistentemente, em camundongos alimentados com uma dieta deficiente em metionina e colina, a deleção de Nrf2 desencadeou o estresse oxidativo, levando a uma rápida progressão para esteato-hepatite (SUGIMOTO *et al.*, 2010).

Em um modelo com animais obesos, JO *et al.* (2013) observaram que o aumento dos níveis de VLDL hepático era sistematicamente estimulado pela via PERK. O mesmo estudo indicou que camundongos deficientes no receptor de VLDL (VLDLR) e apoE foram protegidos da esteatose hepática. Em conjunto, 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.

Outro importante efeito deletério exercido pelo acúmulo de lipídios e pela ação de ERO nos hepatócitos é a interrupção da homeostase do cálcio intracelular, armazenado abundantemente no lúmen do RE (SUGIMOTO *et al.*, 2010). A regulação do cálcio no interior das células é mediada principalmente pela enzima retículo sarco/endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), que o bombeia para as cisternas do retículo a partir do citoplasma. Porém, o estresse nessa organela e a sobrecarga de AGL saturados podem diminuir a atividade da SERCA, promovendo a interrupção do armazenamento do cálcio (WEI, WANG, GENTILE, 2009). Assim, esse extravasamento pode levar a alterações metabólicas

e à apoptose através do desenvolvimento de disfunções metabólicas (YIN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020).

Em um estudo recente, ZHENG *et al.* (2019) revelaram que a deficiência na enzima glicolítica glicerol-fosfato desidrogenase induz o estresse no RE, resultando em esteatose hepática. Além disso, o aumento da demanda de ATP por proteínas chaperonas durante a UPR gera uma pressão adicional sobre a fosforilação oxidativa, resultando no comprometimento das funções oxidativas de mitocôndrias potencialmente disfuncionais (CHEN *et al.*, 2020). Portanto, essa interação entre o estresse no RE e a disfunção mitocondrial gera um ciclo vicioso que promove o estresse oxidativo e a morte celular em um arcabouço associado ao estabelecimento e progressão da MAFLD.

2.3.4 Apoptose e inflamação

A apoptose é um mecanismo fisiológico altamente organizado, que ocorre naturalmente a taxas basais para manutenção da homeostase tecidual. Morfologicamente, esse processo é caracterizado pela condensação da cromatina, perda de volume e aumento da granulosidade celular, formação de pregas na membrana plasmática e fragmentação do conteúdo celular em corpos apoptóticos, que são então digeridos pelos macrófagos (ZHAO *et al.*, 2021). No entanto, sua desregulação está envolvida em várias patologias, incluindo doenças metabólicas. Diversos estudos indicam que ácidos graxos saturados, assim como o colesterol livre, encontrados em níveis elevados em pacientes com MAFLD, são os principais mediadores da lipotoxicidade, desencadeando vias de sinalização específicas do processo de morte celular (KUCHAY, CHOUDHARY, MISHRA, 2020). Além disso, a expressão aumentada de marcadores de apoptose nos hepatócitos de pacientes da MAFLD se correlacionam consistentemente com a severidade histológica dos componentes da doença (KANDA *et al.*, 2018).

A apoptose ocorre por duas vias moleculares distintas. A via extrínseca envolve a ativação de receptores induzida por ligantes de morte, resultando no complexo de morte celular. Por sua vez, a via intrínseca pode ser ativada por disfunção mitocondrial, estresse no RE, permeabilização lisossomal e danos no DNA nuclear. O estresse no RE e o estresse oxidativo podem induzir a apoptose através da via JNK e CHOP, que ativam a proteína pró-apoptótica Bax, levando à disfunção mitocondrial. Ambas as vias ativam proteases intracelulares, as caspases, que podem ativar outras caspases em uma cascata proteolítica

amplificando a via de sinalização da apoptose e resultando na morte celular (ZHAO *et al.*, 2021).

A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte localizados na membrana plasmática através de sinais externos. Esses receptores, das famílias Fas e TNF, possuem um domínio citoplasmático (denominado de domínio de morte) que permite a propagação do sinal apoptótico, e um domínio extracelular, responsável pela ligação do receptor com seu ligante específico (AKAZAWA *et al.*, 2007). Através de uma variedade de sinais *downstream*, o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) associado ao Fas recruta e ativa a caspase iniciadora 8, que por sua vez ativa as caspases executoras 3, 6 e 7, tanto diretamente, quanto indiretamente pelo envolvimento da via mitocondrial. Diversos estudos reportam que a expressão da proteína Fas se encontra aumentada no fígado de pacientes da esteato-hepatite (ALKHOURI, CARTER-KENT, FELDSTEIN, 2011; AKAZAWA *et al.*, 2007). No estudo de Feldstein *et al.* (2003), os pesquisadores observaram um aumento da sensibilidade à apoptose de hepatócitos mediada por Fas em camundongos com MAFLD induzida pela alimentação com uma dieta rica em carboidratos, que engloba muitas das características da doença em humanos, como obesidade, resistência à insulina, hiperleptinemia, níveis séricos elevados de AGL e esteatose hepática. Além disso, a exposição de células hepáticas humanas a AGL resultou em um aumento da expressão de Fas e da sensibilidade à apoptose mediada por esse receptor (ZOU *et al.*, 2007).

Outro constituinte importante da via extrínseca, o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos ativados e está envolvido em diversos aspectos fenotípicos da MAFLD, como abordado anteriormente. A partir da ligação aos seus receptores, o TNF- α promove a ativação do domínio de morte e a formação do complexo I. Este complexo se liga ao domínio de morte resultando na ativação da caspase 8, podendo também induzir a ativação da via JNK, que contribui para a morte celular (HUI *et al.*, 2004). A elevação da expressão de TNF- α e de seus receptores é comumente encontrada em fígados de pacientes portadores de esteato-hepatite, estando correlacionados a estágios mais avançados de fibrose. Mais estudos comprovam que o tratamento imunogênico contra o TNF- α e o silenciamento da expressão de seus receptores possuem um efeito protetor contra a esteatose e o dano hepático (ZHANG *et al.*, 2010). Além disso, em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol, foi observado que o TNF- α é capaz de induzir a liberação de complexos proteicos da membrana mitocondrial, ativação da

caspase 3 e geração de ERO, além de causar a depleção mitocondrial da glutathione (MARI *et al.*, 2006).

Por sua vez, as vias de sinalização induzidas pelo ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF (TRAIL) se sobrepõem em grande parte à via dependente de Fas, com a formação do DISC e a ativação da caspase 8. No estudo de Malhi *et al.* (2007), o tratamento de hepatócitos *in vitro* com ácido oleico promoveu a regulação positiva de receptores do TRAIL, estando associada à via JNK. Ademais, a expressão aumentada desses receptores pode ser observada no fígado de pacientes com esteato-hepatite.

Além disso, a apoptose pode ser iniciada pela mitocôndria na via intrínseca. Nos hepatócitos, a disfunção mitocondrial desempenha um importante papel ao amplificar o sinal de morte celular e integrar ambas as vias em uma via final comum. A disfunção mitocondrial resulta na liberação de várias proteínas pró-apoptóticas no citosol, incluindo o citocromo c (MARANZANA *et al.*, 2013). Essa hemoproteína forma então um complexo de ativação com o fator de ativação da protease apoptótica 1 e a caspase 9, conhecido como apoptossomo (PARADIES *et al.*, 2014). Este complexo ativa as caspases efetoras que executam as mudanças apoptóticas finais (RIEDL, SHI, 2004). Os eventos mitocondriais são regulados pelas proteínas da família Bcl-2, que compreende as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, as proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, e as proteínas BH3. No estudo de Li *et al.* (2014), os pesquisadores observaram um aumento significativo na expressão de Bax, enquanto a razão Bcl-2/Bax diminuía de maneira tempo dependente em relação à duração da dieta administrada em animais com MAFLD.

Muitas linhas de evidência sugerem que a alteração de outras formas de morte celular em hepatócitos pode contribuir para a progressão da MAFLD. A expressão de mediadores da necrose celular em pacientes com esteato-hepatite e em modelos animais da doença está consistentemente elevada em associação à inflamação. A autofagia é outro processo comum a pacientes com MAFLD. Por exemplo, Kwanten *et al.* (2016) mostraram que a deficiência de autofagia nos hepatócitos leva à apoptose e inflamação em camundongos por meio da UPR desencadeada no RE. Além disso, a inibição da sinalização da citocina IL-1 também foi capaz de reduzir a morte de hepatócitos, fibrose, inflamação e a esteatose hepática em modelos murinos da MAFLD (WANG *et al.*, 2021).

Consequentemente, a morte de hepatócitos, em seus diferentes mecanismos, é um dos principais gatilhos da inflamação hepática na progressão da MAFLD. Estudos sobre o papel da apoptose mostram que o aumento da liberação de fragmentos de material genético

e de corpos apoptóticos estimula a ativação da fibrose e promove o recrutamento de células do sistema imune, ativando o processo inflamatório. Além disso, algumas dessas células, como as células de Kupffer, produzem ligantes de TNF, TRAIL e Fas por meio da fagocitose de corpos apoptóticos, promovendo posteriormente a apoptose de hepatócitos em um ciclo vicioso de morte celular e inflamação.

Como visto anteriormente, o tecido adiposo desempenha um papel fundamental na regulação do desenvolvimento da esteato-hepatite, secretando adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como adiponectina, leptina, TNF e IL-6. Além disso, algumas moléculas lipídicas, como o ácido palmítico e ceramidas, liberadas pelos adipócitos também prejudicam a função do RE e das mitocôndrias, causando o estresse celular e até mesmo a morte dos hepatócitos, o que contribui duplamente para a inflamação (SAKURAI *et al.*, 2021). A expressão de IL-6 e TNF- α é profundamente aumentada em adipócitos de pacientes obesos e insulinoresistentes e consequentemente de portadores da MAFLD, promovendo a elevação dos níveis séricos de tais citocinas.

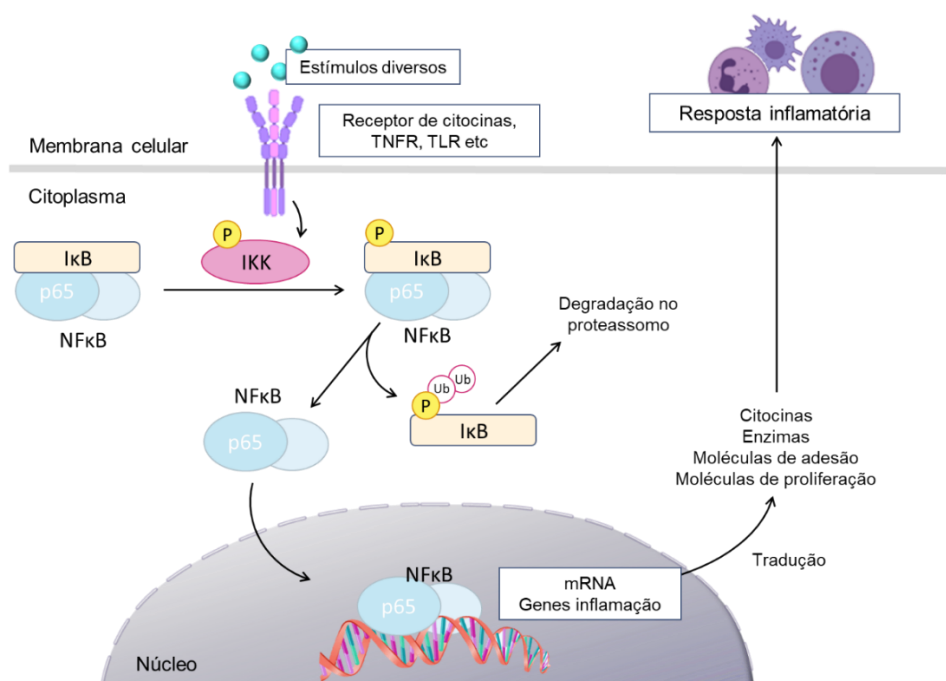
No estudo de Moschen *et al.* (2010), os pesquisadores constataram que a expressão de IL-6 era mais de 100 vezes maior no tecido adiposo (subcutâneo e visceral) quando comparado à expressão hepática, sugerindo que na obesidade severa, o tecido adiposo é de fato a maior fonte dessa citocina. No entanto, o fígado constitui o principal alvo de citocinas derivadas do tecido adiposo, visto que a exposição contínua a IL-6/TNF α afeta diretamente a RI hepática, sugerindo também que a inflamação no tecido adiposo pode preceder a inflamação no fígado (TILG, MOSCHEN, 2010).

Uma variedade de estudos experimentais e clínicos mostram o envolvimento de citocinas no espectro da MAFLD, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e os interferons γ e α (IFN- γ e IFN- α) (HADINIA *et al.*, 2019; MRIDHA *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2013). Níveis séricos aumentados de IL-1 β e IL-6, por exemplo podem ser encontrados em pacientes com esteato-hepatite e fibrose (KAR *et al.*, 2019). Em um estudo do dano hepatocelular e da inflamação em pacientes com esteato-hepatite, a expressão transcricional de TNF- α também se mostrou elevada no tecido adiposo e hepático, revelando uma clara correlação entre os níveis de aminotransferases e a severidade histológica da MAFLD. Diante destes resultados, os níveis e expressão de tais citocinas constituem importantes biomarcadores da progressão da doença (LAMADRID *et al.*, 2021).

Diversos fatores de transcrição nucleares e vias intracelulares estão envolvidas na regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, no entanto, o fator NF- κ B desempenha

um papel especialmente importante na doença (BAKER, HAYDEN, GOSH, 2010). Por exemplo, os altos níveis de AGL circulantes em pacientes com MAFLD induzem a ativação da via hepática do NF- κ B (BODEN *et al.*, 2005). A atividade do NF- κ B é controlada pela sinalização de estímulos intra e extracelulares. Moléculas inibidoras de NF- κ B (I κ B) sequestram este fator de transcrição no citosol de células em homeostase e previnem sua destinação nuclear e, portanto, a ativação de sua função transcricional (Figura 7). No processo inflamatório, porém, citocinas e padrões moleculares associados a patógenos estimulam receptores de superfície celular como os receptores associados ao TNF (TNFR) e do tipo toll (TLR), que iniciam cascatas de sinalização convergindo na ativação do complexo quinase do I κ B (IKK) (LIU *et al.*, 2017). A fosforilação do I κ B catalisada pelo complexo promove sua degradação e libera o NF- κ B, que se transloca para o núcleo e pode enfim promover a transcrição de genes alvo (HAYDEN, GOSH, 2008). Os genes regulados pelo NF- κ B direcionam a diferenciação e proliferação de diferentes tipos de células imunes. Dentre elas, macrófagos ativados produzem citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e induzem a geração de mais citocinas por outras células desencadeando o processo de inflamação (PEISELER, TACKE, 2021).

Figura 7 – Representação esquemática do mecanismo de ação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B). IKK, Complexo quinase do I κ B; I κ B, Inibidor de NF- κ B; mRNA, Ácido ribonucleico mensageiro; P, Grupo fosfato; p65, Subunidade do NF- κ B; TNFR, Receptor associado ao fator de necrose tumoral; TLR, Receptor do tipo toll; Ub, Ubiquitina.



Fonte: Elaborado pelo autor

Assim, devido à elevada produção de citocinas pro-inflamatórias, ERO, produtos de peroxidação lipídica e o desencadeamento da apoptose e de lesões hepáticas, células fibrogênicas como as células estreladas do fígado, são estimuladas. Com o aumento dessas células ocorre também o acúmulo progressivo de proteínas cicatrizantes, que são então substituídas por uma matriz rica em colágeno formador de fibrila, desencadeando a fibrogênese hepática (TSUCHIDA, FRIEDMAN, 2017; URTASUN, NIETO, 2007). Quadros de lesões hepáticas e fibrose podem expandir o espectro da MAFLD para um estágio terminal cirrótico, que aumenta consideravelmente os riscos do estabelecimento de complicações severas como o carcinoma hepatocelular (GE, RUNYON, 2016; ZHOU, ZHANG, QIAO, 2014; BERTOT, ADAMS, 2016).

2.4 Modelos de estudo da MAFLD

Nas últimas décadas, alguns modelos experimentais tem sido desenvolvidos e aplicados em estudos pré-clínicos para elucidar mecanismos fisiopatológicos da MAFLD e na busca de alternativas terapêuticas eficazes. Nesse sentido, ao investigar a esteatose hepática, McMillian *et al.* (2001) foram pioneiros na utilização da cultura de células. No estudo, o acúmulo de lipídios foi induzido em células da linhagem HepG2 através da adição de compostos conhecidamente esteatogênicos, como estrogênio e outros esteroides, e analisado por método fluorimétrico baseado no corante lipofílico *Nile red*. No entanto, os modelos mais bem estabelecidos são baseados na exposição a uma mistura de ácidos graxos, após a qual o acúmulo de lipídios resultante é considerado uma referência fenotípica da doença. Geralmente, o ácido oleico (AO) (18:1) e o ácido palmítico (AP) (16:0) são empregados para este fim, visto que são os ácidos graxos mais abundantes na dieta e organismo humanos (ABDELMAGID *et al.*, 2015). A exposição à mistura de AO e AP é capaz de simular condições dietéticas frequentemente observadas *in vivo* e assim induzir diversos *hallmarks* da MAFLD, como o acúmulo citoplasmático de TAG, estresse no retículo endoplasmático, inflamação e morte celular.

No estudo de Ricchi *et al.* (2009), a indução da esteatose foi testada em três linhagens de células hepáticas (HepG2, WRL-68 e HuH7) após 24 horas de exposição ao AO, AP e à mistura de ambos em diferentes concentrações. Os dados revelaram que a intensidade do

acúmulo de lipídios foi mais eficaz em células tratadas com oleato em contraposição àquelas expostas ao palmitato, que por sua vez foi responsável por promover a morte celular por apoptose, confirmando a lipotoxicidade associada a lipídios saturados. Em um modelo semelhante, Yao *et al.* (2011) induziram a esteatose utilizando a combinação de AO e AP nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 mM em células HepG2. No estudo, os pesquisadores observaram que os tratamentos mais concentrados (2,0 e 3,0 mM) apresentaram lipotoxicidade após períodos de 12, 24 e 36 horas, sugerindo que outros mecanismos do espectro da doença podem estar envolvidos.

Culturas primárias de hepatócitos humanos ou murinos também são utilizados em modelos *in vitro* da MAFLD. No estudo de Gómez-Lechón *et al.* (2007), além de verificarem um efeito dose e tempo-dependente da exposição de células HepG2 com oleato e palmitato, os pesquisadores também cultivaram hepatócitos isolados de organismos humanos para avaliar o acúmulo de lipídios. Os resultados indicaram similaridades entre ambas as células testadas e também em comparação a dados obtidos de pacientes da MAFLD.

Desse modo, muitos esforços têm sido empregados no desenvolvimento de abordagens *in vitro* baseados em tecidos humanos, com grande destaque para novas tecnologias, como o uso de modelos de tecido tridimensionais. Dentre outras vantagens, estes modelos permitem o estabelecimento de um ambiente hepático mais semelhante ao fisiológico, de vascularização e a interação entre diferentes tipos celulares (GATZIOS *et al.*, 2021). Entretanto, apesar da tentativa de recriarem a complexidade fisiológica humana, essas tecnologias ainda não foram bem estabelecidas e apresentam limitações que envolvem a baixa reprodutibilidade e disponibilidade em associação ao elevado custo, complexidade e a inviabilidade de execução em larga escala (BENAM *et al.*, 2015).

Assim, os modelos *in vitro* baseados na cultura bidimensional convencional, como culturas de células primárias e de linhagens imortalizadas, continuam sendo amplamente empregadas na pesquisa de doenças hepáticas. Culturas primárias de hepatócitos e outros tipos celulares representam modelos fisiologicamente relevantes para condições clínicas, porém devido a questões éticas, pouca disponibilidade de amostras hepáticas humanas, baixa estabilidade e grande susceptibilidade à contaminação, esse método se torna dispendioso (DAMBACH, ANDREWS, MOULIN, 2005). Alternativamente, o cultivo de linhagens celulares imortalizadas demonstra uma alta capacidade replicativa, fenótipo estável, com maior facilidade de padronização e manutenção e tempo de vida prolongado (KANURI, BERGHEIM, 2013).

Diante disso, a linhagem HepG2 é a mais amplamente empregada no estudo de função e doenças hepáticas. Derivadas de biópsias de um tipo diferenciado de carcinoma hepatocelular, as células HepG2 apresentam características altamente proliferativas e não tumorigênicas, além de desenvolverem morfologia epitelial quando crescida em superfície sólida (ADEN *et al.*, 1979). A partir de extensas caracterizações, constatou-se que essa linhagem expressa funções hepáticas diferenciadas, como a síntese e secreção de proteínas plasmáticas, metabolismo do colesterol e TAG, metabolismo e transporte de lipoproteínas, síntese de ácidos biliares, sinalização da insulina e síntese de glicogênio (JAVITT, 1990; MEIER *et al.*, 2007). Células HepG2 também são muito utilizadas no estudo dos mecanismos de defesa antioxidante e do estresse oxidativo, porém poucos estudos investigam este papel no desenvolvimento da MAFLD (KNASMÜLLER *et al.*, 2004).

Além disso, são empregados também diversos modelos animais, em sua maioria murinos, que contemplam características fisio e histopatológicas da MAFLD. Modelos induzidos por dieta, como a dieta rica em gordura (HFD) e a deficiente em metionina e colina (MCD) são os mais comuns no estudo da doença. Camundongos alimentados com HFD desenvolvem obesidade com aumento da adiposidade e síndrome metabólica e apresentam esteatose hepática grave a partir do acúmulo de lipídios micro e macrovesicular e aumento de TAG hepático total, junto aos níveis de colesterol e aminotransferases, mas geralmente sem desenvolvimento de fibrose (SPEAKMAN, 2019; CLAPER *et al.*, 2013).

Na dieta de MCD, há uma deficiência em metionina e colina, que são essenciais para a β -oxidação hepática e para a exportação de TAG na forma de VLDL. Neste tipo de intervenção, os animais desenvolvem inflamação severa, estresse oxidativo, dano mitocondrial, apoptose e fibrogênese, porém o perfil metabólico se diferencia em muito do espectro encontrado em humanos (KOŘÍNKOVÁ *et al.*, 2020; TAKAHASHI, SOEJIMA, FUKUSATO, 2012). Outros modelos comumente utilizados envolvem manipulação genética que permite estudar diferentes vias do metabolismo lipídico e da glicose durante o desenvolvimento da esteatose e fibrose. Os mais comuns são aqueles que tem a função da leptina prejudicada, seja por uma deficiência no próprio gene da adipocina (ob/ob) ou em seus receptores (db/db). Animais com este painel genético, desenvolvem obesidade e alguns aspectos da MAFLD podem ser observados (WANG *et al.*, 2014).

Entretanto, as incompatibilidades fenotípicas, a duração do período de administração e conteúdo da dieta, sexo, espécie, e o *background* genético e metabólico destes modelos podem dificultar o estudo da MAFLD (YU *et al.*, 2010; SEOK *et al.*, 2013). Desse modo,

certas abordagens *in vivo* falham em mimetizar algumas das comorbidades tipicamente observadas em humanos portadores da doença, como vias metabólicas e moleculares que inexistem nos animais de estudo. Além disso, a preocupação da comunidade científica é crescente diante da consideração ética do uso de animais em pesquisas, que se torna cada vez mais restrito (KORÍNKOVÁ *et al.*, 2020). Nesse sentido, a utilização do cultivo celular representa uma importante alternativa para a redução do uso de animais em face das novas diretrizes e políticas de sustentabilidade, além de permitirem a investigação de mecanismos moleculares que não são possíveis em modelos *in vivo*, devido a incompatibilidades em vias bioquímicas e alterações moleculares após a eutanásia.

Outro fator que reforça a importância do desenvolvimento de modelos de estudos da MAFLD é a dificuldade de se realizar análises em humanos, já que a avaliação da gravidade histológica da doença requer a observação de achados patológicos do fígado. Porém, a biópsia hepática repetida é extremamente invasiva, de alto custo e, em última análise, impraticável. Dessa forma, os estudos da MAFLD em humanos se limitam a amostras sorológicas, não permitindo a investigação de mecanismos moleculares mais robustos (TANAKA *et al.*, 2019). Assim, modelos *in vitro* são, em muitos aspectos, uma alternativa adequada para o estudo da MAFLD, devido à maleabilidade, curta escala de tempo e à capacidade de abordar várias características da doença.

CAPÍTULO 2

Differential effect of oleic and palmitic acids on hepatic steatosis and oxidative stress in HepG2 cells

Vinícius Marques Arruda¹, Maria Júlia Maia Gonçalves Granato¹, Marcelo Eustáquio Silva², Maria Lúcia Pedrosa², Thaise Gonçalves de Araújo³, Joyce Ferreira da Costa Guerra^{1 2}

Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Patos de Minas, Brazil

Corresponding author: Joyce F. C. Guerra, Laboratory of Metabolic Biochemistry and Redox Processes, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Rua Major Jerônimo, 566, Sala 501, 38700-002, Patos de Minas, MG, Brazil. Phone: +55 34 38142027. joyceguerra@ufu.br.

Affiliation

¹ Laboratory of Metabolic Biochemistry and Redox Processes, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Patos de Minas, MG, Brazil;

²Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil;

³Laboratory of Genetics and Biotechnology, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Patos de Minas, MG, Brazil.

Differential effect of oleic and palmitic acids on hepatic steatosis and oxidative stress in HepG2 cells

A cell model of metabolism-associated fatty liver disease is presented. The biochemical analysis carried out on HepG2 cells exposed to oleic and palmitic acids in different concentrations reveals consistent increase in intracellular lipid droplet content. Along with that, higher doses of fatty acids can lead to a state of oxidative stress verified by alterations in markers of lipid peroxidation, protein carbonylation and levels of antioxidant components. Activation of inflammation, indicated by increased NF- κ B expression might be associated to redox imbalance. On the other hand, palmitic acid overload leads to more expressive reductions on cell viability in correlation to significantly higher expression of pro-caspase-3, reinforcing the lipotoxic effect of saturated fatty acids. Therefore, the proposed model constitutes a useful and relevant tool for the investigation of molecular mechanisms and therapeutic approaches for MAFLD.

Keywords NAFLD; HepG2 cells; antioxidants; inflammation; apoptosis.

Introduction

Metabolism associated fatty liver disease (MAFLD), formerly known as Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is a clinical pathological liver condition characterized by excessive lipid accumulation within hepatocytes, especially in the form of triglycerides. It has a potential progressive course, involving simple steatosis and steatohepatitis, characterized by inflammation and cell death which leads to fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular cancer (GALLEGO-DURÁN *et al.*, 2021).

MAFLD is the most common chronic liver disease affecting over 25% of population worldwide and its high prevalence is strictly associated with conditions such as obesity, insulin resistance and dyslipidemia (YOUNOSSI *et al.*, 2016; INOUE *et al.*, 2018).

Due to this relation, MAFLD has been considered to be the hepatic manifestation of the metabolic syndrome (YOSHIOKA *et al.*, 2020). However, there are no approved therapies nor established treatment prescriptions for MAFLD. Current prophylactic treatments are based on improving physical activity, reducing fat intake and controlling associated metabolic disorders (HAJIGHASEM, FARZANEGI and MAZAHARI, 2018).

Although the exact molecular mechanisms that drive the pathogenesis of the disease are still not completely understood, several lines of evidence suggest the occurrence of

assorted molecular events, or multiple hits, acting synergistically in the establishment and progression of MAFLD (KUPČOVÁ *et al.*, 2019). Such hits consist of varied factors in metabolically predisposed individuals, like oxidative stress, nutritional and epigenetic aspects, inflammatory intermediates, hormones derived from adipose tissue and abnormal gut microbiota (MARCHISELLO *et al.*, 2019; BUZZETTI, PINZANI and TSOCHATZIS, 2016).

Oxidative stress is one the most critical contributors in the development of MAFLD (BRAUD *et al.*, 2017). In this mechanism, the saturation of lipid metabolism caused by its overload, leads to alterations in the mitochondrial function and to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) allied to a loss of antioxidant system efficiency (ASHRAF and SHEIKH, 2015; GARCÍA-RUIZ and FERNÁNDEZ-CHECA, 2018). The resulting oxidative stress can also cause cell injury through lipid peroxidation and damage to molecular components, such as DNA, proteins and enzymes leading to modifications in cellular processes (ORE and AKINLOYE, 2019). Thus, this lack on redox balance is closely related to cell death activation and recruitment of immune cells. The central role of oxidative stress in MAFLD progression is supported by studies conducted in experimental and clinical models that demonstrate a clear association between steatosis and increased ROS production and mitochondrial dysfunction (SUMIDA *et al.*, 2013; VILAR-GOMEZ *et al.*, 2020).

Moreover, given the difficulty of carrying out analyzes in humans, which require the observation of invasive pathological findings in the liver, clinical studies of MAFLD are limited to serological samples, not allowing the investigation of more robust molecular mechanisms (TANAKA *et al.*, 2019). Thereby, in the past few decades, *in vitro* models of MAFLD have been used to study the hepatocellular consequences of steatosis in cell lines. In this regard, the best-established models are based on the exposure to a mixture of fatty acids (FFAs), after which the resulting lipid accumulation is considered a phenotypic benchmark of the disease (GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007). The lipoapoptosis and stress mediated by FFAs often correlate with observations found in *in vivo* and clinical studies. Thereafter, well settled models are essential tools for the biochemical and molecular investigation of fat accumulation within liver cells.

Although there are different FFAs based *in vitro* models, there is little consensus regarding standardization and even scarcer studies evaluating the impact of lipid accumulation on the oxidative stress associated with the establishment of MAFLD. Thus, the present study aims to evaluate the effect of a cell model of steatosis with a lipid

overaccumulation profile in which the oxidative stress, inflammation and apoptosis could be investigated. For that purpose, multiple data sources show that distinct FFAs have different effects on lipotoxicity, inflammation and stress. Oleic (C18:1) and palmitic (C16:0) acids are the most abundant FFAs in human diet and in liver triglycerides of both normal individuals and patients with steatosis (ABDELMAGID *et al.*, 2015). Therefore, HepG2 cells, a well-characterized and widely used human hepatoma cell line in the study of liver function, were incubated with mixtures with different proportions of oleate and palmitate to induce fat accumulation.

Materials and methods

Cell culture

HepG2 cell line was obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich, MO, EUA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich) under a 5% CO₂ humid atmosphere at 37°C. For subculturing purpose, HepG2 cells were detached with 0.25% trypsin-EDTA at 37°C at a frequency of 2 to 3 days. Cultures were used at 80% confluency.

Induction of steatosis in MAFLD cell model

To induce lipid accumulation, HepG2 cells were seeded in appropriate dishes (flasks or plates, according to the amount of cell needed) in supplemented media for adhesion. After starvation with unsupplemented media for 24 h, cells were exposed to different ratios of long-chain FFAs conjugated to fatty-free bovine serum albumin 4,5% (palmitic at 0.7mM (P) or oleic and palmitic acids at final concentrations of 1 (OP1) and 2mM (OP2) in a 2:1 ratio). For this purpose, stock solutions of the oleate and palmitate were prepared at concentrations of 150 mM diluted in ethanol and stored at -20°C until usage, when they were diluted to working solutions of 3 mM in DMEM conjugated to BSA. Ethanol was used as vehicle solution in control group (C). After incubation for 24 and 48h, steatotic or control cells were collected and used in the following assays.

Oil Red O staining and intracellular lipid content

To assess intracellular lipid content, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and then stained with Oil Red O (ORO) 60% for 50 min at room temperature. For qualitative analysis, the stained cells were washed with distilled water and incubated with 60% isopropanol to dissolve the ORO reagent, which solution was measured at 510 nm. For microscopic analysis, after staining with ORO, the cells were also stained with Hematoxylin for better visualization of the nuclei. Photomicrographs were then captured under a light microscope at 400× magnification.

Cell viability and cell damage

Cell viability was determined by the colorimetric assay based on the reduction of MTT salt by viable cells (MOSMANN, 1983). HepG2 cells were seeded in a 96-well culture plate, treated as previously described for 24 and 48 h and incubated with 0.5 mg/ml MTT reagent that was diluted in DMEM. After 1 h of metabolization, the solution was replaced with 100 µl of DMSO to solubilize formazan crystals. The intensity was measured in plates at 570 nm absorbance using and the results are expressed in comparison to control group.

For the determination of cytotoxicity and cell damage, the activity of lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate (AST) and alanine aminotransferases (ALT) were measured. Both assays were performed by commercial kits (Labtest Diagnostica). For that purpose, HepG2 cells were cultured in phenol-red free media as well the dilution of oleic and palmitic acids. After 24 and 48 h of lipid exposure, the supernatant was aspired and used as sample.

Lipid peroxidation

The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was estimated by the method of Buege and Aust (1978) as an index of lipid peroxidation. For that purpose, the model was performed in T75 flasks for each group and after 24 and 48 h the cells were harvested, lysed and mixed with TCA (28% w/v in 0.25 N HCl), TBA (1% in 0.25 M acetic acid) and BHT (125 mM in ethanol), heated for 15 min at 95°C and then placed in an ice

bath. Precipitated material was removed by centrifugation, and the absorbance of the clear supernatant was read at 535 nm.

Glutathione levels

To assess endogenous antioxidant system, total (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) content was determined using a kinetic assay by Rahman *et al.* (2007) with modifications. Briefly, cells harvested from T75 flasks were solubilized in extraction buffer (0.1% Triton-X and 0.6% sulfosalicylic acid in 0.1 M potassium phosphate buffer (KPE) with 5 mM EDTA disodium salt). After freeze-thaw cycles, the cells were centrifuged at 3 000 g for 4 min at 4°C and the supernatant used in the assay. The samples (20 µL) were added to a 96 well microplate, followed by 150 µL of working mixture (KPE, DTNB and glutathione reductase) and 50 µL of NADPH (0.16 mg/mL) for an absorbance reading at 405 nm every 30 s for 4 min in total.

For GSSG, 2 µL of 2-vinylpyridine (1:10) was added to 100 µL of the cell homogenate followed by 4 µL of triethanolamine (1:6) after 1 h of incubation, then the derivative samples were assayed as described above. Oxidized and reduced glutathione salts were used to build standard curves.

Western blotting

Total protein extraction was performed by harvesting treated cells in lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris pH 8.0, 0.1% protease inhibitor cocktail) and incubated for 30 min at 4°C. The homogenates were then centrifuged at 16 000 g for 20 min and the resulting supernatant was taken as a protein sample. Total protein concentration was measured by the Bradford reagent assay. After protein separation by a 12% SDS-PAGE, protein bands were transferred electrophoretically to 0.2 (Amersham Biosciences) or 0.45 µm (BIO-RAD Laboratories) nitrocellulose membranes for detection of caspase-3 (Casp-3) and NF-κB, respectively. Levels of proteins of interest were quantified by Western Blotting with the primary rabbit monoclonal antibody against Casp-3 (1:1000; Cell Signaling) and NF-κB p65 (1:1000; Cell Signaling) at 4°C overnight. As the normalizing control, primary mouse monoclonal antibody against β-actin (1:3000; Sigma) at room temperature for 1 h.

HRP conjugated secondary antibodies were then incubated at room temperature for 1 h followed by ECL detection and densitometric analysis.

Oxyblot

Protein samples were derivatized in a solution containing 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine-10% trifluoroacetic acid, as described by Levine *et al.* The reaction was stopped immediately after 20 min of incubation by neutralization with 2 M Tris base and 30% glycerol, then separated by 10% SDS-PAGE with 5 µg of protein load per track. For immunodetection by western blotting, gel was incubated with a primary rabbit anti-2,4-dinitrophenol antibody (1:2000; Sigma) and a secondary anti-rabbit IgG-HRP antibody (1:5000; Santa Cruz Biotech). After revelation with ECL, carbonylated proteins were measured by densitometry as described above.

Statistical analysis

Data normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. Parametric data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test and expressed as the mean ± standard deviation (SD). Non-parametric data were analyzed using the Kruskal–Wallis test and Dunn post hoc test. Differences were considered significant for $p < 0.05$. All analyses were conducted using GraphPad prism version 8.0.1 software for Windows (San Diego, CA, USA).

Results

Lipid accumulation

To validate the *in vitro* model of MAFLD, we first analyzed the development of lipid accumulation in HepG2 cells after 24 and 48 h exposure to oleic and palmitic acids in different concentrations indicated by ORO staining (Figure 1A to J). In untreated control cells, ORO staining revealed almost absence of intracellular lipid droplets. On the other hand, after treatment with the different concentrations of FFA, lipids accumulated in the cytoplasm of HepG2 cells, particularly and more expressively in those exposed to oleate and

palmitate combined at 1 and 2 mM. However, lower fat levels were found in cells treated with palmitate alone at 0.7 mM, reinforcing the greater steatogenic effect of oleate. The optical density analysis demonstrates a dose dependent manner increase of fat accumulation.

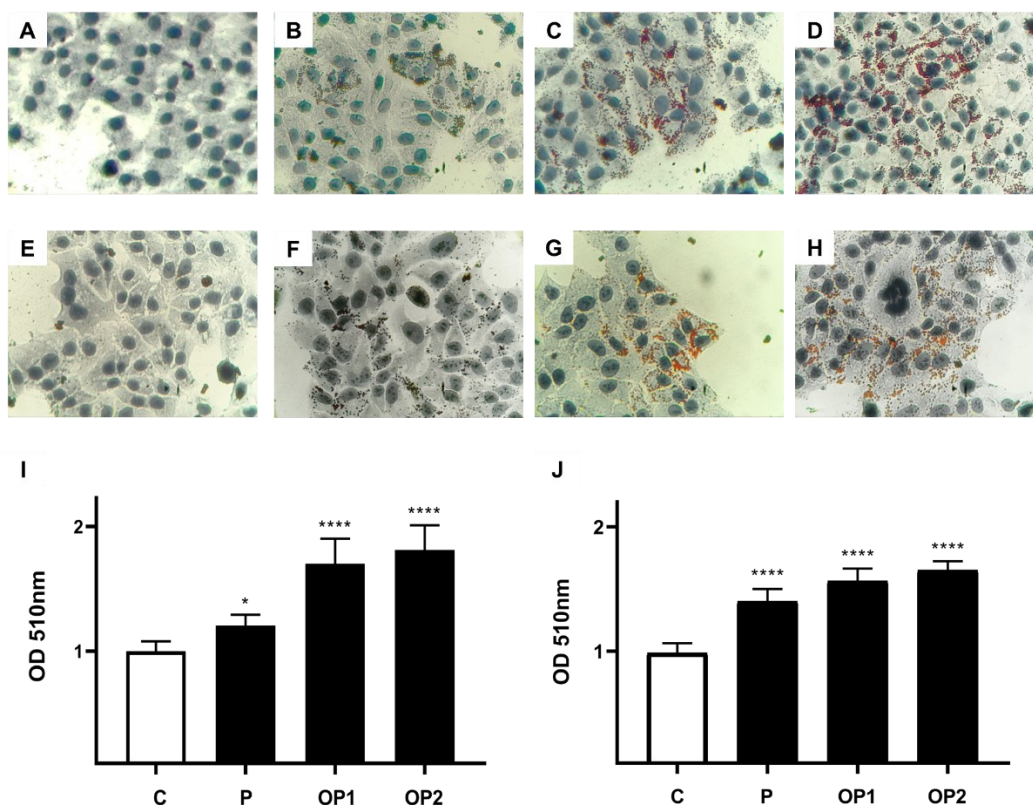


Figure 1. FFA-induced steatosis in HepG2 cells determined by Oil Red O (ORO) staining and ORO-based colorimetric assay. Representative photomicrographs of ORO and Hematoxylin staining in HepG2 cells exposed to lipid overload for 24 hours in (A) C; (B) P; (C) OP1; (D) OP2 and for 48 hours in (E) C; (F) P; (G) OP1; (H) OP2. 400x magnification. Optical density quantification of intracellular lipids at 510 nm after ORO staining in cells exposed to lipid overload for (I) 24 and (J) 48 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). *p<0.05, ****p<0.0001. C, control; P, 0.7mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

Cell viability and cytotoxicity

As Figure 2 shows, the various concentrations of FFA did not affect the cell viability when compared to the control group at 24 h in MTT assay. These results followed within 48 h, except for cells treated with palmitate at 0.7 mM, which promoted a significant reduction in viable cells, indicating a palmitate-time dependent manner cytotoxicity.

To further assess the effects of FFA-induced steatosis on HepG2 cells cytotoxicity, we also analyzed the activity of LDH released in the culture media. The results show that all treatments lead to an increase in LDH activity at 24 h of incubation, with P and OP2 groups having more significant differences in comparison to the control. Similar findings were obtained for P when incubated for 48 h whereas no statistical difference was found in the supernatant of cells treated with both oleic and palmitic acids when compared to the control.

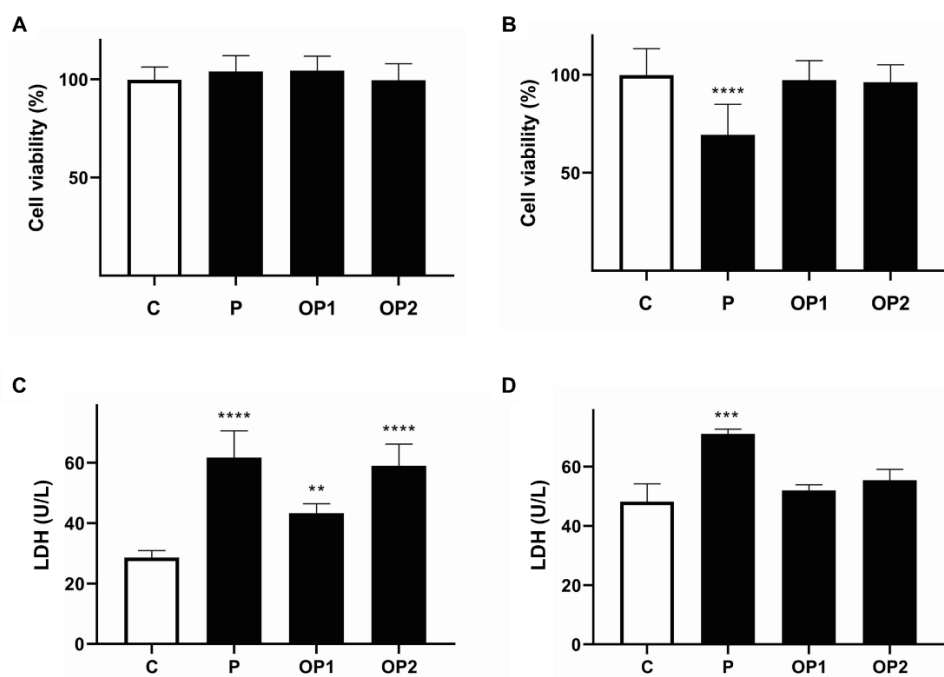


Figure 2. Effect of lipid accumulation on cell viability and cytotoxicity in HepG2 cells. MTT assay conducted in HepG2 cells exposed to lipid overload for (A) 24 and (B) 48 hours. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in supernatant of HepG2 cells exposed to lipid overload for (C) 24 and (D) 48 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. C, control; P, 0.7mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

Aminotransferases release from hepatocytes has been a traditional marker for liver cell injury and are frequently elevated in MAFLD phenotypes. To determine if FFA-induced steatosis could result in direct liver cell injury that might count for decreased cell proliferation, we measured ALT and AST activities in the culture media of treated cells. As shown in Figure 3, higher concentrations of lipid overload promoted significant increases in the activity of enzymes in OP2 group after 24 h. Similar results were found at a period of 48 h, however in addition to OP2, OP1 group also showed elevated activity values of ALT and AST in comparison to the control (Figure 3C and D).

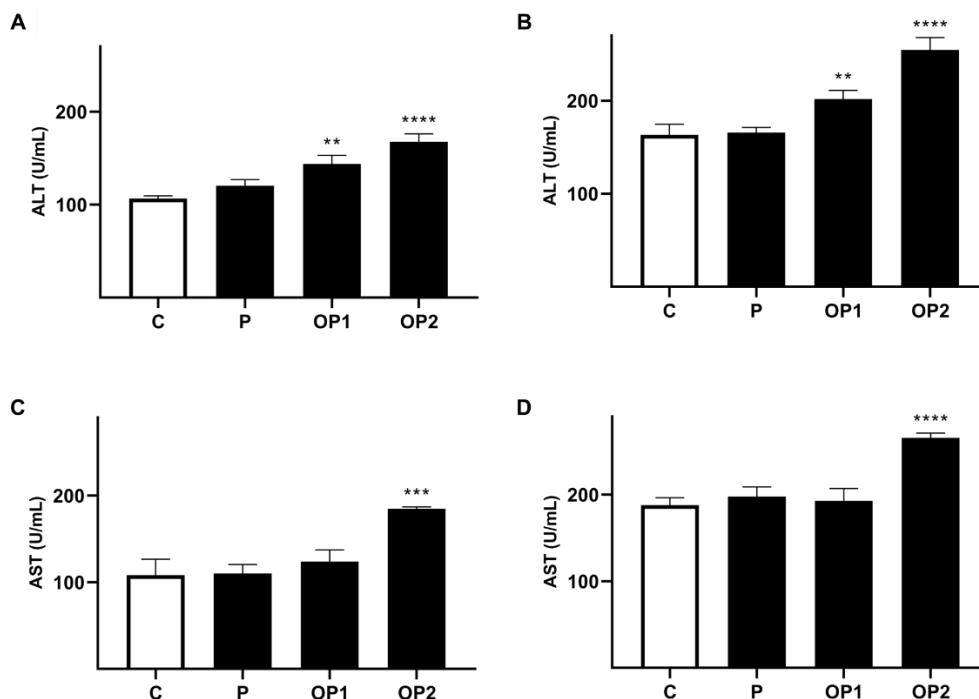


Figure 3. Effect of lipid accumulation on aminotransferases release in HepG2 cells. Alanine aminotransferase (ALT) activity in supernatant of HepG2 cells exposed to lipid overload for (A) 24 and (B) 48 hours. Aspartate aminotransferase (AST) activity in supernatant of HepG2 cells exposed to lipid overload for (C) 24 and (D) 48 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. C, control; P, 0.7mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

Oxidative stress

To evaluate the effect of induced steatosis on oxidative stress, we measured the levels of lipid peroxidation and oxidized protein by carbonylation, assayed by TBARS and Oxyblot methods, respectively. The results, presented in figure 4, show that the lipid overload induced by OP2 led to a significantly increase in TBARS levels (Figure 4A and B) as well as in carbonylated proteins (Figure 4C). In the other groups, TBARS and Oxyblot values remained similar to those of the control group.

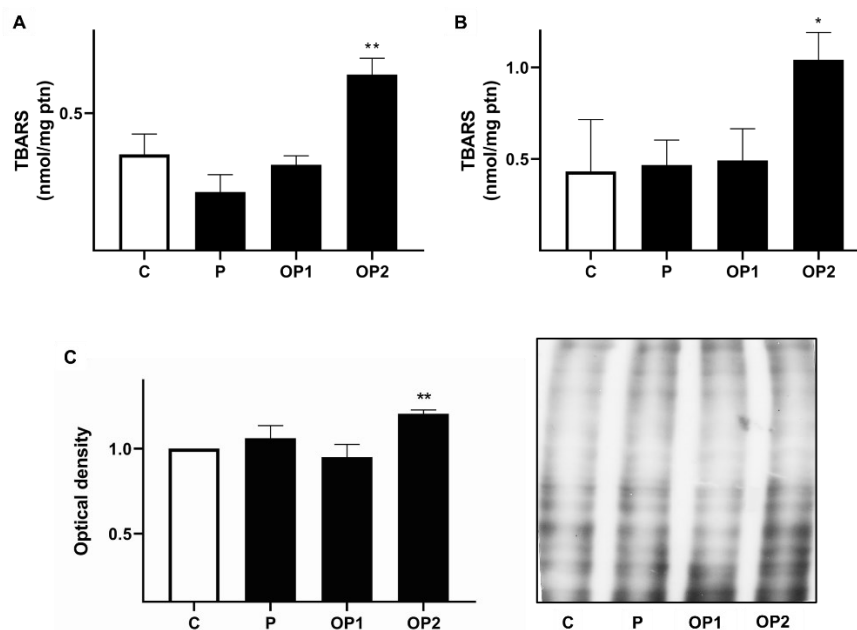


Figure 4. Effect of lipid accumulation on lipid peroxidation and protein carbonylation in HepG2 cells. Thiobarbituric reactive substances (TBARS) levels in cells exposed to lipid overload for (A) 24 and (B) 48 hours. (C) Total carbonylated protein expression in cells exposed to lipid overload for 24 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01. C, control; P, 0.7 mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

It is important to mention that Oxyblot data refer to tests carried out in cells after 24 h of exposure to FFAs, due to the fact that in this period the results were found to be more promising than at the period of 48 h. Therefore, the following experiments were continued only in 24 h and are presented below (glutathione levels and western blotting analysis).

Higher levels of lipid peroxidation and oxidative damage are regularly associated with a depletion in the antioxidant system in MAFLD patients and models. However, in our study, lipid overload did not lead to significant changes in total glutathione (GSH) concentration (Figure 5A). Nevertheless, when assessed, oxidized glutathione (GSSG) levels were found to be elevated in cells treated with higher doses of FFA of OP2 group (Figure 5B). On the other hand, palmitic acid stimulation significantly reduced GSSG concentration when in comparison to the control. Both results provide a convenient resource to a better understanding of the redox state of the cells by getting to know its proportions. In this sense, higher concentrations of FFA exposure resulted in a decrease on GSH:GSSG ratio (Figure 5C), showing a clear association to a pro-oxidant cellular state promoted by oleate and palmitate overload at its highest concentration.

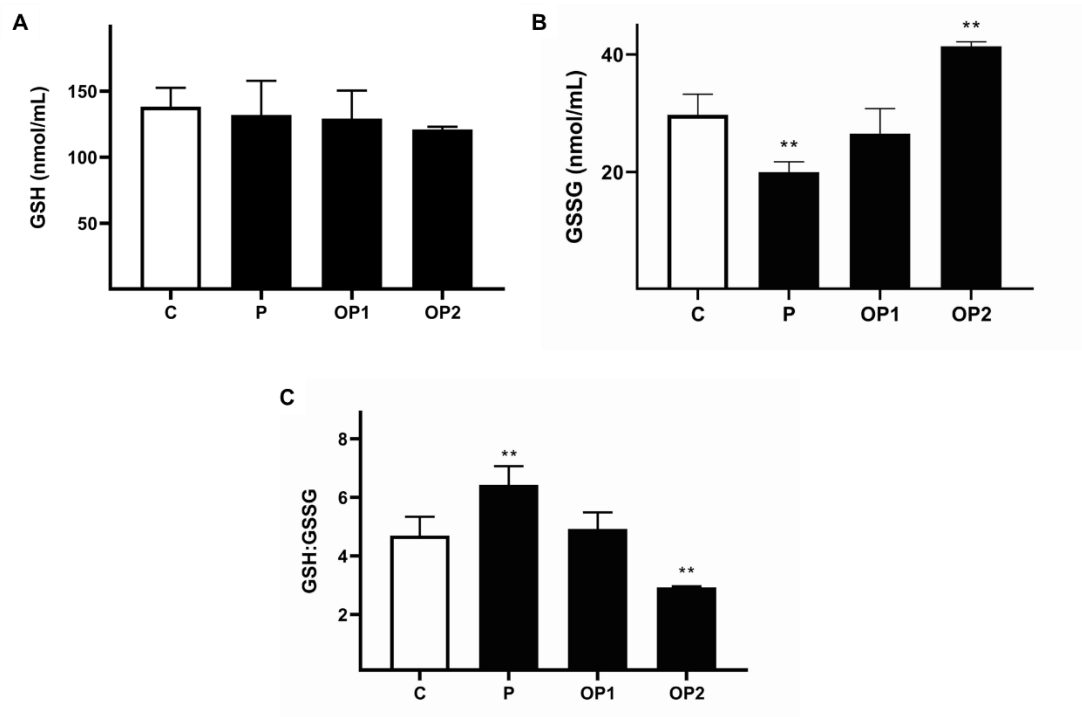


Figure 5. Effect of lipid accumulation on glutathione levels in HepG2 cells. (A) Total (GSH) and (B) oxidized glutathione (GSSG) levels in cells exposed to lipid overload for 24 and hours. (C) GSH:GSSG ratio in cells exposed to lipid overload for 24 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=1). **p<0.01. C, control; P, 0.7 mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

Western Blot

Clinical studies report that steatohepatitis and more severe stages of MAFLD are associated with altered apoptosis activity and activation of inflammatory processes. Therefore, to evaluate the effects of FFA-induced steatosis on apoptosis activity and inflammation in HepG2 cells, protein intermediates of both mechanisms were analyzed by western blotting. The results reveal an increase in procaspase-3 levels in cells exposed to palmitic acid at 0.7 mM, in opposition to OP2 group, which demonstrated a significant reduction, whereas Casp-3 expression in OP1 was not statistically different from control (Figure 6A). The expression of cleaved Casp-3 was not observed in the experimental conditions evaluated. On the other hand, the expression of the NF- κ B transcription factor found to be significantly increased in OP2, indicating that higher concentrations of FFA can induce an inflammatory state in cells *in vitro* (Figure 6B).

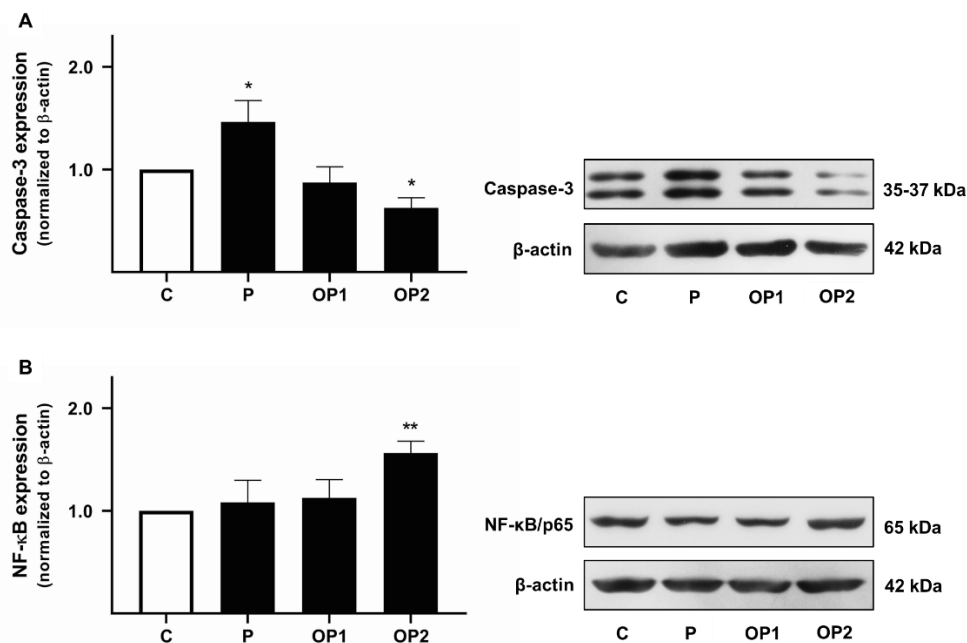


Figure 6. Protein expression of markers of apoptosis and inflammation in cell model of MAFLD. Relative expression of (A) caspase-3 and (B) NF- κ B in cells exposed to lipid overload for 24 hours. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). *p<0.05, **p<0.01. C, control; P, 0.7 mM Palmitate; OP1, 1 mM Oleate and Palmitate 2:1; OP2, 2 mM Oleate and Palmitate 2:1.

Discussion

Excessive lipid accumulation within hepatic cells is the major hallmark of MAFLD. Even though it is a reversible stage, steatosis represents a vulnerable state for the development of steatohepatitis and more severe or end-stage liver diseases (HU *et al.*, 2018). In the present study, we evaluated an *in vitro* model of steatosis in HepG2 cells, a well-characterized and widely used human hepatoma cell line, by its incubation with oleic and palmitic acids in different concentrations. As distinct FFAs have different effects on cell biochemistry, we aimed to determine the best concentration and time conditions to induce steatosis as well as other features of MAFLD. To the best of our knowledge, no other study has investigated the role of oxidative stress in association to other features of MAFLD progression.

The results show that the different FFAs concentrations induced a dose-dependent increase in lipid droplets content, however, the mixture of oleic and palmitic acids seems to be more efficient than the individual palmitate overload, as observed in previous studies (GOMÉZ-LECHÓN *et al.*, 2007; RICCHI *et al.*, 2009). These FFAs act as precursors in the

synthesis of triglycerides, which are stored in the cytosol in the form of micro or macrovesicular steatosis. Along with that, triglycerides are the main fat species in lipid droplets and their formation is considered to be a mechanism that protects hepatocytes from lipotoxicity (CHEN *et al.*, 2020). The greater increase on fat accumulation found in cells treated with the mixture of oleate and palmitate seems to lie on the more effective steatogenic property of oleate, as unsaturated fatty acids are more easily esterified in triglycerides. Moreover, other studies have indicated a clear association between the presence of oleate and specific expression patterns of PPAR- α , PPAR- γ and SREBP-1 genes, which are related to the regulation of lipid metabolism (YE *et al.*, 2019; RICCHI *et al.*, 2009).

When the lipid storage capacity of hepatocytes is exceeded, the FFAs may enter deleterious pathways, causing cell damage and death. Therefore, we evaluated the viability and potential damage of cells treated with FFAs. Our results show no alterations in cell viability assayed by MTT method, except for cells exposed to palmitate alone and at a higher period of time, indicating a time-dependent cytotoxicity of this particular FFA. These findings are consistent with preceding reports showing that none or less changes were observed in the cell viability of cells treated with oleate and palmitate in a 2:1 ratio at final concentrations of 1 and 2 mM. Moreover, mixtures with higher proportions or palmitate alone promote significant reductions in cell viability, suggesting a cytotoxic effect related to the concentration of palmitate taken up by HepG2 cells (GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007; RICCHI *et al.*, 2009).

Cell leakage of LDH may occur as a result of disruption of cytoplasmic membrane integrity and is a feature of cell death. In our study, the exposure of HepG2 cells to all combinations of oleic and palmitic acids caused increase in LDH leakage at a period of 24 h. However, major differences were obtained when palmitate was used individually, which followed within 48 h. These findings confirm the cytotoxic effect of palmitic acid reported in the scientific literature. Other studies have consistently demonstrated the association between palmitate and cell death in a wide of concentrations and towards different cell lines and even human and rat hepatocyte primary cultures (MEI *et al.*, 2011; GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007; RICCHI *et al.*, 2009; MORAVCOVÁ *et al.*, 2015).

ALT and AST are intracellular enzymes found in many organs, but especially in the human liver and their leakage from the intracellular space is indicative of hepatocellular damage and death. Therefore, analysis of serum ALT and AST levels is often used in non-invasive diagnosis of liver diseases, including MAFLD (MA *et al.*, 2020; BROTOS,

SIKARIS, 2013). Although theoretically similar to LDH release method, our findings reveal different patterns in the activity of aminotransferases released in culture media of cells exposed to FFAs.

Several lines of evidence show that ALT is more particularly associated with the MAFLD spectrum, whose patients have higher ALT/AST ratios (ZOU *et al.*, 2020). Although the results indicate ratios very close to 1 between both aminotransferases, ALT levels were significantly higher in combined treatments of oleic and palmitic acids when compared to the control, which indicates possible hepatocellular damage promoted by FFAs exposure at higher concentrations. Furthermore, ALT is present exclusively in the cytosol of hepatocytes, while AST is found both in the cytosol and within the mitochondria (GLINGHAMMAR *et al.*, 2009). This differential location suggests that ALT can be more easily released, since lysis of the plasma membrane alone is enough for it to reach the extracellular space and, therefore, result in higher levels when compared to AST.

Moreover, all treatments showed significantly higher rates at a period of 48 h than those found after 24 h, suggesting that the enzymes release is dependent on the time of exposure to FFAs. In another model of MAFLD induced by hyperglycemic conditions in HepG2 cells, researchers observed that levels of ALT and ALP (alkaline phosphatase), another enzyme that is a marker of liver damage, were significantly elevated when compared to the normoglycemic condition. Yet in this study, cytotoxicity and metabolic activity were also evaluated through MTT and LDH release methods, in which no significant difference was observed in both treatments (SU *et al.*, 2019).

Along cytotoxicity, hepatocyte apoptosis is a known feature of fatty liver disease, which may decrease cell proliferation. Current knowledge indicates that saturated fatty acids like palmitic acid, as well as free cholesterol, found at higher levels in patients with MAFLD, are the main mediators of lipotoxicity, triggering specific signaling pathways of the cell death process (KUCHAY, CHOUDHARY, MISHRA, 2020). In agreement with these data, we found that palmitic acid leads to increased pro-caspase expression in HepG2 cells, unlike those in which the monounsaturated oleate was incorporated to the mixture of FFAs. Somehow, oleic acid seems to inhibit or attenuate apoptosis mediated by palmitic acid, as reported by previous data. These results suggest that Casp-3, and consequently the mitochondrial pathway of cell death, may be involved in apoptosis induced by saturated lipid accumulation. In similar *in vitro* models (GÓMEZ-LECHÓN *et al.*, 2007; MORAVCOVÁ *et al.*, 2015), Casp-3 and Casp-9 activation was observed only in human and rat primary

hepatic cells exposed to higher proportions of palmitate even when these treatments did not indicate a reduction in cell viability. Furthermore, the highest rates of caspase activation were found when palmitate was used alone. The proapoptotic character of palmitate can be further confirmed through flow cytometry, revealing a caspase-dependent mechanism.

Unsaturated fatty acids, such as oleate, exhibit low toxicity towards hepatocytes, most likely due to a greater triglyceride incorporation capacity, which is an inert and less toxic form of lipids, and to the increased stability of lipid droplets containing higher rates of unsaturated chains. In turn, saturated fatty acids such as palmitate have greater toxicity, given their poor conversion into triglyceride-enriched lipid droplets (AKAZAWA, NAKAO, 2018). Furthermore, it is known that saturated fatty acids can induce apoptosis through several pathways, including decrease of mitochondrial membrane potential and its release of cytochrome c, endoplasmic reticulum stress, cell death receptors, dysregulation of the autophagy process, among others (CAO *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012; BELOSLUDTSEV *et al.*, 2014; NATARAJAN *et al.*, 2017).

The increased availability of lipids in steatotic cells often leads to a boost in lipid oxidation, whether in mitochondrial or alternative pathways, that occur mainly in peroxisomes and microsomes of the endoplasmic reticulum (BROWNING; HORTON, 2004). Such factors drive to a significant increase in the ROS production and consequently to the establishment of a state of oxidative stress. Thus, lipid overload and, consequently, oxidative stress, often trigger lipid peroxidation in steatotic cells, causing damage to several cellular components, like genetic material and proteins. To further investigate if the fat accumulation in HepG2 cells could promote oxidative stress, we analyzed markers of lipid peroxidation and protein oxidation by carbonylation. Our results reveal that higher concentrations of FFAs can indeed lead to an increase in products levels of lipid peroxidation. Consistent with these data, the patterns of protein oxidation were also found to be elevated in cells treated with greater concentrations of both oleic and palmitic acids. These findings also support the pathogenic role and codependence of lipid peroxides and oxidative stress in the steatotic cells homeostasis.

Malondialdehyde (MDA) levels, measured by TBARS assay, are usually found to be increased in several experimental and clinical studies of MAFLD. Patients with the disease frequently have higher serum and liver levels of TBARS than those found in healthy subjects (LEGHI, DOMENICI, VANNUCCHI, 2015; KOROGLU *et al.*, 2016), which is also observed in many animal experimentation models (LI and LU, 2018; ELSHAZLY, 2015;

SCHRODER *et al.*, 2016). Along with these results, several studies also reveal that not only concentrations of MDA but levels of 4-hydroxy-2-nonenal, other important product of lipid peroxidation, are generally high in patients and models of MAFLD, as well as oxidation products of proteins and DNA (ORE, AKINLOYE, 2019; VILAR-GOMEZ *et al.*, 2020).

Multiple bodies of evidence report the deleterious effect of lipid peroxides on molecular targets, causing a variety of damage in the intra and extracellular space. As one of the main targets of these peroxides and other reactive species, proteins are widely involved in structural components and reactions of the cellular metabolism. In this sense, the formation of carbonyl groups in protein side chains by its reaction with pro-oxidants and lipid peroxidation intermediates, especially in proline, arginine, lysine and threonine residues is a common biochemical marker of oxidative stress (BACHI, DALLE-DONNE, SCALONI, 2013). These findings are consistent with previous studies conducted with *in vivo* models of MAFLD. After induced hepatic steatosis with a high-fat diet for 6 weeks, mice showed a significant increase in the hepatic protein carbonylation profile assessed by the Oxyblot method (CARVALHO *et al.*, 2019). In the study, researchers also found elevated levels of TBARS in association with changes in the antioxidant system.

One of the most important components of this endogenous antioxidant defense, glutathione (GSH) is a tripeptide particularly concentrated in the liver. In order to neutralize reactive species, as ROS and lipid peroxides, GSH is oxidized into glutathione disulfide (GSSG) by the enzyme glutathione peroxidase (GPx), and reconverted into GSH by the NADPH-dependent enzyme glutathione reductase (GR) (LUSHCHAK, 2012). As different proportions of GSH and GSSG can coexist depending on the redox necessities, the GSH:GSSG ratio is used as a marker of cellular toxicity, which under stress is often decreased (ZITKA *et al.*, 2012; VAIRETTI *et al.*, 2021). Consistent with that, our findings reveal an expressive imbalance in GSH:GSSG ratio of cells exposed to FFAs. In fact, the results show a dose-dependent manner in GSSG levels, as long as in GSH:GSSG, as higher concentrations of oleic and palmitic acids lead to increased glutathione levels in its oxidized form.

The high availability of fatty acids in the liver is also associated with inflammatory processes through the activation of NF- κ B pathway, which seems to play an essential role in the establishment of steatohepatitis (BODEN *et al.*, 2005). In this sense, researchers have discovered new targets and genes involved with NF- κ B in HepG2 cells, indicating that this may be an important parameter in the development of new models of MAFLD (ZHOU *et*

al., 2017; DAI *et al.*, 2017; YUAN *et al.*, 2020). Furthermore, it is known that lipid peroxidation products, such as TBARS, are involved in NF- κ B activation. Thus, the significant increase in lipid peroxidation along with protein oxidation and the depletion in GSH:GSSG ratio in cells exposed to oleate and palmitate at 2 mM may be associated with the greater resultant expression of NF- κ B.

Several studies associate the establishment of steatosis and insulin resistance to the activation of inflammatory pathways through the action of pro-inflammatory cytokines, whose expression is influenced by NF- κ B. Consistent with these data, significant increases in the cytokine levels, such as TNF α and IL-6, can be found in steatotic HepG2 cells after 48 hours of exposure to oleic and palmitic acids (HE *et al.*, 2020). In addition, many other *in vivo* models of MAFLD also demonstrate the activation of inflammation through TNF α , IL-1 β and IL-6 (SHEN *et al.*, 2020).

In conclusion, these results highlight the efficiency of the proposed model in inducing hepatic steatosis in HepG2 cells by its incubation with oleic and palmitic acids. Interestingly, despite the fact that both FFAs can be used in the induction of lipid accumulation, different experimental outcomes were obtained. On the one hand, steatosis promoted by palmitic acid alone is associated to major toxic and apoptotic effects, but almost no changes in cellular redox homeostasis. On the other hand, a high proportion of oleic acid, even though in the presence of palmitate, have major steatogenic effect which might lead to a pro-oxidant state verified by an augmentation in oxidative stress biomarkers. Furthermore, the resulting oxidative stress seems to mediate the activation of inflammation in cells exposed to high concentrations of FFAs, consistent with the mechanisms underlying the progression of MAFLD. Therefore, the hepatic cellular model presented here proved adequate to the experimental investigation of MAFLD features as well as the prospection of new effective therapeutic strategies.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflicts of Interest: The authors report no declarations of interest.

References

ABDELMAGID, S. A.; CLARKE, S. E.; NIELSEN, D. E.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A.; MUTCH, D. M.; MA, D. W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116195.

AKAZAWA, Y.; NAKAO, K. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 893–906, 2018. DOI: 10.1007/s00535-018-1451-5.

ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, v. 49, n.12, p. 1405–1418, 2015. DOI: 10.3109/10715762.2015.1078461.

BACHI A, DALLE-DONNE I, SCALONI A. Redox Proteomics: Chemical Principles, Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises. **Chem Rev**, v.113, p. 596-698, 2013. DOI: 10.1021/cr300073p

BELOSLUDTSEV, K. N.; BELOSLUDTSEVA, N. V.; AGAFONOV, A.V.; ASTASHEV, M.E.; KAZAKOV, A. S.; SARIS, N. E.; MIRONOVA, G. D. Ca(2+)-dependent permeabilization of mitochondria and liposomes by palmitic and oleic acids: a comparative study. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 10, p. 2600-2606, 2014. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.06.017

BODEN, G.; SHE, P.; MOZZOLI, M.; CHEUNG, P.; GUMIREDDY, K.; REDDY, P.; XIANG, X.; LUO, Z.; RUDERMAN, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. **Diabetes**, v. 54, n., p. 3458–3465, 2005. DOI: 10.2337/diabetes.54.12.3458

BRAUD, L., BATTAULT, S., MEYER, G., NASCIMENTO, A., GAILLARD, S., DE SOUSA, G., RAHMANI, R., RIVA, C., ARMAND, M., MAIXENT, J. M., REBOUL, C. Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 40, p. 95–104, 2017. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.012.

BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The de ritis ratio: the test of time. **The Clinical Bbiochemistry Reviews**, v. 34, n. 3, p. 117–130, 2013.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 147-152, 2004. DOI: 10.1172/JCI22422

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods of Enzymology**, v. 52, n., p. 302-310, 1978. DOI: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012

CAO, J.; DAI, D. L.; YAO, L.; YU, H. H.; NING, B.; ZHANG, Q.; CHEN, J.; CHENG, W. H.; SHEN, W.; YANG, Z. X. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 115-129, 2012. DOI: 10.1007/s11010-011-1211-9.

CARVALHO, M. M. F., LAGE, N. N., PAULINO, A. H. S., PEREIRA, R. R., ALMEIDA, L. T., SILVA, T. F., MAGALHÃES, C. L. B.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; GUERRA, J. F. C. Effects of açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44563-y.

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.

DAI, W.; WU, J.; ZHANG, S.; SHI, B.; XU, X.; WANG, D.; WANG, J. Genes directly regulated by NF- κ B in human hepatocellular carcinoma HepG2. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 89, n., p.157–170, 2017. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.031.

ELSHAZLY, S. M. Ameliorative effect of nicorandil on high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. **European journal of pharmacology**, v. 748, p. 123–132, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.12.017

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GALLEGO-DURÁN, R.; MONTERO-VALLEJO, R.; MAYA-MILES, D. LUCENA, A.; MARTIN, F.; AMPUERO, J.; ROMERO-GÓMEZ, M. Analysis of Common Pathways and Markers From Non-Alcoholic Fatty Liver Disease to Immune-Mediated Diseases. **Frontiers in immunology**, 12, 667354, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.667354.

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. DOI: 10.1002/hep4.1271

GLINGHAMMAR, B.; RAFTER, I.; LINDSTRÖM, A. K.; HEDBERG, J. J.; ANDERSSON, H. B.; LINDBLOM, P.; BERG, A. L.; COTGREAVE, I. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. **International journal of molecular medicine**, v. 23, n. 5, p. 621–631, 2009. DOI: 10.3892/ijmm_00000173.

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. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.11.004.

HE, Y.; YANG, W.; GAN, L.; LIU, S.; NI, Q.; BI, Y.; HAN, T.; LIU, Q.; CHEN, H.; HU, Y.; LONG, Y.; YANG, L. Silencing HIF-1 α aggravates non-alcoholic fatty liver disease *in vitro* through inhibiting PPAR- α /ANGPTL4 singling pathway. **Gastroenterologia y hepatologia**, v. 44, n. 5, p. 355–365, 2021. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2020.09.014

INOUE, Y., QIN, B., POTI, J., SOKOL, R., GORDON-LARSEN, P. Epidemiology of obesity in adults: latest trends. **Current obesity reports**, v. 7, p. 276-288, 2018.

KÖROĞLU, E., CANBAKAN, B., ATAY, K., HATEMI, İ., TUNCER, M., DOBRUCALI, A., SONSUZ, A., GÜLTEPE, I., ŞENTÜRK, H. Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease. **The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology**, v. 27, n. 4, p. 361–366, 2016. DOI: 10.5152/tjg.2016.16106

KUCHAY, M. S.; CHOUDHARY, N. S.; MISHRA, S. K. (2020). Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1875–1887, 2020. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.09.026.

KUPČOVÁ, V.; FEDELEŠOVÁ, M., BULAS, J., KOZMONOVÁ, P., TURECKÝ, L. Overview of the Pathogenesis, Genetic, and Non-Invasive Clinical, Biochemical, and Scoring Methods in the Assessment of NAFLD. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 19, p. 3570, 2019. DOI: 10.3390/ijerph16193570

LEGHI, G. E., DOMENICI, F. A., VANNUCCHI, H. Influence of oxidative stress and obesity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 52, n. 3, p. 228–233, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032015000300014>

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, p. 346–357, 1994.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **Journal of amino acids**, 736837, 2012. DOI: 10.1155/2012/736837

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. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 8, p. 1948, 2019. DOI: 10.3390/ijms20081948

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. DOI: 10.33549/physiolres.933224

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. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NATARAJAN, S. K.; STRINGHAM, B. A.; MOHR, A. M.; WEHRKAMP, C. J.; LU, S.; PHILLIPPI, M. A.; HARRISON-FINDIK, D.; MOTT, J. L. FoxO3 increases miR-34a to cause palmitate-induced cholangiocyte lipoapoptosis. **Journal of Lipid Research**, v. 58, n. 5, p. 866-875, 2017. DOI: 10.1194/jlr.M071357.

ORE, A.; AKINLOYE, O. A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Medicina**, v. 55, n. 2, p. 26, 2019. DOI:10.3390/medicina55020026.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2006.378

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.

SCHRÖDER, T.; KUCHARCZYK, D.; BÄR, F.; PAGEL, R.; DERER, S.; JENDREK, S. T.; SÜNDERHAUF, A.; BRETHACK, A. K.; HIROSE, M.; MÖLLER, S.; KÜNSTNER, A.; BISCHOF, J.; WEYERS, I.; HEEREN, J.; KOCZAN, D.; SCHMID, S. M.; DIVANOVIC, S.; GILES, D. A.; ADAMSKI, J.; FELLERMANN, K.; SINA, C. Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. **Molecular metabolism**, v. 5, n. 4, p. 283–295, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.010>

SHARMA, M.; URANO, F.; JAESCHKE, A. Cdc42 and Rac1 are major contributors to the saturated fatty acid-stimulated JNK pathway in hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 1, p. 192-198, 2012. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.03.019.

SHEN, B.; FENG, H.; CHENG, J.; LI, Z.; JIN, M.; ZHAO, L.; WANG, Q.; QIN, H.; LIU, G. Geniposide alleviates non-alcohol fatty liver disease via regulating Nrf2/AMPK/mTOR signalling pathways. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 00, n., p. 1-12, 2020. DOI:10.1111/jcmm.15139

SU, R. C.; LAD, A.; BREIDENBACH, J. D.; BLOMQUIST, T. M.; GUNNING, W. T.; DUBE, P.; ... KENNEDY, D. J. Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the Leprdb/J mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p., 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0225604.

SUMIDA, Y.; NIKI, E.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. **Free Radic Res**, v. 47, p. 869-880, 2013. DOI: 10.3109/10715762.2013.837577.

VAIRETTI M, DI PASQUA LG, CAGNA M, RICHELMI P, FERRIGNO A, BERARDO C. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. **Antioxidants** (Basel). v. 10, n. 3, p. 364, 2021. DOI: 10.3390/antiox10030364.

VILAR-GOMEZ, E.; VUPPALANCHI, R.; GAWRIEH, S.; GHABRIL, M.; SAXENA, R.; CUMMINGS, O.W.; CHALASANI, N. Vitamin E Improves Transplant-Free Survival and Hepatic Decompensation among Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis. **Hepatology**, v. 71, n., p. 495–509, 2020.

YE, G., GAO, H., WANG, Z. et al. PPAR α and PPAR γ activation attenuates total free fatty acid and triglyceride accumulation in macrophages via the inhibition of Fatp1 expression. *Cell Death Dis*, v. 10, p. 39 2019. DOI: 10.1038/s41419-018-1135-3

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M.. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. **Hepatology**, v. 64, p. 73–84, 2016.

YUAN, S.; LIU, H.; YUAN, D.; XU, J.; CHEN, Y.; XU, X.; LIANG, H. (2019). PNPLA3 I148M mediates the regulatory effect of NF- κ B on inflammation in PA-treated HepG2 cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 2, p. 1541-1552, 2019. DOI:10.1111/jcmm.14839.

ZHOU, F.; XU, X.; WANG, D.; WU, J.; WANG, J. Identification of novel NF- κ B transcriptional targets in TNF α -treated HeLa and HepG2 cells. **Cell Biology International**, v. 41, n. 5, p. 555-569, 2017. DOI: 10.1002/cbin.10762.

ZITKA, O., SKALICKOVA, S., GUMULEC, J., MASARIK, M., ADAM, V., HUBALEK, J., TRNKOVA, L., KRUSEOVA, J., ECKSCHLAGER, T., KIZEK, R. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology letters**, v. 4, n. 6, p. 1247–1253, 2012. DOI: 10.3892/ol.2012.931

ZOU, B.; YEO, Y. H.; NGUYEN, V. H.; CHEUNG, R.; INGELSSON, E.; NGUYEN, M.H. Prevalence, characteristics and mortality outcomes of obese, nonobese and lean NAFLD in the United States, 1999-2016. **Journal of International Medicine**, v. 288, n., p. 139–151, 2020.

CONCLUSÃO

O presente estudo destaca a eficiência do modelo proposto em induzir a esteatose hepática em células HepG2 através de sua incubação com os ácidos oleico e palmítico. Os resultados obtidos sugerem fortemente que a exposição combinada a oleato e palmitato a 2,0 mM (OP2) seja a intervenção mais eficaz na indução da MAFLD em células da linhagem HepG2. Expostas a essa concentração, as células apresentaram um maior acúmulo de gotículas lipídicas no espaço citoplasmático, a principal evidência patológica da MAFLD. Além disso, a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas se mostrou substancialmente elevada, em associação a altos níveis de glutathione oxidada, reforçando o estado pró-oxidante induzido pela sobrecarga lipídica no modelo. Consistente a esses resultados, a expressão de NF- κ B se encontra aumentada, indicando uma possível ativação do processo inflamatório decorrente do estresse oxidativo. Por outro lado, a esteatose promovida individualmente pelo ácido palmítico está associada a um efeito tóxico e apoptótico mais expressivo, mas sem alterações na homeostase redox.

Portanto, o uso deste modelo experimental da MAFLD representa uma ferramenta de grande utilidade para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na doença e a definição de alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAGID, S. A.; CLARKE, S. E.; NIELSEN, D. E.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A.; MUTCH, D. M.; MA, D. W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116195.
- ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, v. 282, n. 5739, p. 615–616, 1979. DOI:10.1038/282615a0.
- AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. **Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. Em: A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2.** 2016. DOI: 10.5772/65715.
- 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. DOI: 10.1111/1440-1681.12886.
- AKAZAWA, Y.; CAZANAVE, S.; MOTT, J. L.; ELMI, N.; BRONK, S. F.; KOHNO, S.; CHARLTON, M. R.; GORES, G. J. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 4, p. 586-593, 2010. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.003.
- AKAZAWA, Y.; GORES, G. Death Receptor-Mediated Liver Injury. **Seminars in Liver Disease**, v. 27, n. 4, p. 327–338, 2007. DOI:10.1055/s-2007-991510.
- AKAZAWA, Y.; NAKAO, K. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 53, n. 893–906, 2018. DOI: 10.1007/s00535-018-1451-5.
- ALKHOURI, N.; CARTER-KENT, C.; FELDSTEIN, A. E. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 2, p. 201–212, 2011. DOI:10.1586/egh.11.6.
- AL SHARIF, M.; ALOV, P., VITCHEVA, V., PAJEVA, I., & TSAKOVSKA, I. Modes-of-Action Related to Repeated Dose Toxicity: Tissue-Specific Biological Roles of PPAR γ Ligand-Dependent Dysregulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **PPAR research**, v. 2014, n. p. 432647, 2014. DOI: 10.1155/2014/432647
- ANGULO, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221–1231, 2002. DOI: 10.1056/nejmra011775.
- ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, v. 49, n.12, p. 1405–1418, 2015. DOI: 10.3109/10715762.2015.1078461.

BAHCECIOGLU, I. H.; YALNIZ, M.; ILHAN, N.; ATASEVEN, H.; OZERCAN, I. H. Levels of serum vitamin A, alpha-tocopherol and malondialdehyde in patients with non-alcoholic steatohepatitis: Relationship with histopathologic severity. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, n., p. 318–323, 2005. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2004.00312.x.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell metabolism**, v. 13, n.1, p. 11–22, 2011. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.12.008

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. DOI: 10.3390/ijms17050774

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. DOI: 10.1002/hep.26672

BODEN, G.; SHE, P.; MOZZOLI, M.; CHEUNG, P.; GUMIREDDY, K.; REDDY, P.; XIANG, X.; LUO, Z.; RUDERMAN, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. **Diabetes**, v. 54, n., p. 3458–3465, 2005. DOI: 10.2337/diabetes.54.12.3458

BORLAK, J.; CHOUGULE, A.; SINGH, P. K. How useful are clinical liver function tests in *in vitro* human hepatotoxicity assays?. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 5, p. 784–795, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.006>

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 147-152, 2004. DOI: 10.1172/JCI22422

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 2016. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012

CAO, J.; DAI, D. L.; YAO, L.; YU, H. H.; NING, B.; ZHANG, Q.; CHEN, J.; CHENG, W. H.; SHEN, W.; YANG, Z. X. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 115-129, 2012. DOI: 10.1007/s11010-011-1211-9.

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. DOI: 10.1089/ars.2014.5851

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M.; CUSI, K.; RINELLA, M.; HARRISON, S. A.; BRUNT, E. M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American

Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 328–357, 2018. DOI: 10.1002/hep.29367.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 481–493, 1993. DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

CHEN, Y.; CHOI, S. S.; MICHELOTTI, G. A.; CHAN, I. S.; SWIDERSKA-SYN, M.; KARACA, G. F.; DIEHL, A. M. (2012). Hedgehog Controls Hepatic Stellate Cell Fate by Regulating Metabolism. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1319–1329, 2012. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.115.

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. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519–1523, 2011. DOI: 10.1126/science.1204265

COMINACINI, L.; MOZZINI, C.; GARBIN, U.; PASINI, A.; STRANIERI, C.; SOLANI, E.; VALLERIO, P.; TINELLI, I. A.; FRATTA PASINI, A. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n., p. 233–242, 2015. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.027.

DAMBACH, D.M.; ANDREWS, B.A.; MOULIN, F. New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: Use of *in vitro* models. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n., p. 17–26, 2005. DOI: 10.1080/01926230590522284

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842–845, 1998. DOI: 10.1159/000016909

ESLAM, M., SANYAL, A. J., GEORGE, J. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. **Gastroenterology**, 2020. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.11.312.

ESLAM, M.; NEWSOME, P. N.; SARIN, S. K.; QUENTIN, M. A.; TARGHER, G.; GOMEZ, M. R.; SAGI, S. Z.; WONG, V. W. S.; DUFOUR, J. F.; SCHATTENBERG, J. M.; KAWAGUCHI, T.; ARRESE, M.; VALENTI, L.; SHIHA, G.; TIRIBELLI, C.; YKI-JÄRVINEN, H.; FAN, J. G.; GRØNBÆK, H.; YILMAZ, Y.; PINTO, H. C.; OLIVEIRA, C. P.; BEDOSSA, P.; ADAMS, L. A.; ZHENG, M. H.; FOUAD, Y.; CHAN, W. K.; SANCHEZ, N. M.; AHN, S. H.; CASTERA, L.; BUGIANESI, E.; RATZIU, V.; GEORGE, J. A new definition for metabolic associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. **Journal of Hepatology**, v. 73, n., p. 202–209, 2020. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.

ESTES, C.; RAZAVI, H.; LOOMBA, R.; YOUNOSSI, Z.; SANYAL, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. **Hepatology**, v. 67, 1, p. 123–133, 2017. DOI: 10.1002/hep.29466

FANG, D. L.; WAN, Y.; SHEN, W.; CAO, J.; SUN, Z. X.; YU, H. H.; ZHANG, Q.; CHENG, W. H.; CHEN, J.; NING, B. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 381, n. 1-2, p. 127-137, 2013. DOI: 10.1007/s11010-013-1694-7.

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. DOI: 10.3748/wjg.v23.i23.4146

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. DOI: 10.1590/S0104-42301997000100014

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health, **Antioxidants Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029–2074, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4729>

FORRESTER, S. J.; KIKUCHI, D. S.; HERNANDES, M. S.; XU, Q.; GRIENDLING, K. K. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 2018. DOI: 10.1161/circresaha.117.311401.

FRANGIOUDAKIS, G.; BURCHFIELD, J. G.; NARASIMHAN, S.; COONEY, G. J.; LEITGES, M.; BIDEN, T. J.; SCHMITZ-PEIFFER, C. Diverse roles for protein kinase C δ and protein kinase C ϵ in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C δ . **Diabetologia**, v. 52, n. 12, p. 2616-2620, 2009. DOI: 10.1007/s00125-009-1543-0

GALLEGO-DURÁN, R.; MONTERO-VALLEJO, R.; MAYA-MILES, D. LUCENA, A.; MARTIN, F.; AMPUERO, J.; ROMERO-GÓMEZ, M. Analysis of Common Pathways and Markers From Non-Alcoholic Fatty Liver Disease to Immune-Mediated Diseases. **Frontiers in immunology**, 12, 667354, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.667354.

GALICIA-MORENO, M.; LUCANO-LANDEROS, S.; MONROY-RAMIREZ, H. C.; SILVA-GOMEZ, J.; GUTIERREZ-CUEVAS, J.; SANTOS, A.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Roles of NRF2 in liver diseases: Molecular, pharmacological, and epigenetic aspects. **Antioxidants**, v. 9, n., p. 980, 2020. DOI: 10.3390/antiox9100980

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. DOI: 10.1002/hep4.1271

GATZIOS, A.; ROMBAUT, M.; BUYL, K.; DE KOCK, J.; RODRIGUES, R.M.; ROGIERS, V.; VANHAECKE, T.; BOECKMANS, J. From NAFLD to MAFLD:

Aligning Translational *In vitro* Research to Clinical Insights. **Biomedicines**, v. 10, n., p. 161, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10010161

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. DOI: 10.1056/NEJMra1504367

GENTILE, C. L.; FRYE, M. A.; PAGLIASSOTTI, M. J. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. **Biofactors**, v. 37, n. 1, p. 8-16, 2011. DOI: 10.1002/biof.135

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. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.11.004.

HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n., p. 199–218, 2014. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.020

HETZ, C.; CHEVET, E.; HARDING, H. Targeting the unfolded protein response in disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, p. 703-719, 2013. DOI: 10.1038/nrd3976

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. DOI: 10.1038/s41366-018-0062-9

IBDAH, J. A.; PERLEGAS, P.; ZHAO, Y.; ANGDISSEN, 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. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.02.001

INFANTE, J. P.; HUSZAGH, V. A. Secondary carnitine deficiency and impaired docosahexaenoic (22: 6n-3) acid synthesis: a common denominator in the pathophysiology of diseases of oxidative phosphorylation and beta-oxidation. **FEBS Letters**, v. 468, n., p. 1-5, 2000. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01083-8

JAVITT, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **FASEB J**, v. 4, n., p. 161–168, 1990. DOI: 10.1096/fasebj.4.2.2153592

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. DOI: 10.1002/hep.26126

KANDA, T.; MATSUOKA, S.; YAMAZAKI, M.; SHIBATA, T.; NIREI, K.; TAKAHASHI, H., ... MORIYAMA, M. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 25, p. 2661–2672, 2018. DOI: 10.3748/wjg.v24.i25.2661.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. *In vitro* and *in vivo* models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11963–11980, 2013. DOI: 10.3390/ijms140611963.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.; HOELZL, C.; MAJER, B. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315–328, 2004. DOI: 10.1016/j.tox.2004.02.008.

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. DOI: 10.3892/ijmm.21.4.507

KOŘÍNKOVÁ, L.; PRAŽIENKOVÁ, V.; ČERNÁ, L.; KARNOŠOVÁ, A.; ŽELEZNÁ, B.; KUNEŠ, J.; MALETÍNSKÁ, L. Pathophysiology of NAFLD and NASH in Experimental Models: The Role of Food Intake Regulating Peptides. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n., p., 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.597583.

KUCHAY, M. S.; CHOUDHARY, N. S.; MISHRA, S. K. (2020). Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 6, p. 1875–1887, 2020. DOI: 10.1016/j.dsx.2020.09.026.

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. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 8, p. 1948, 2019. DOI: 10.3390/ijms20081948

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. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.06.008

LI, C. P.; LI, J. H.; HE, S. Y.; LI, P.; ZHONG, X. L. Roles of Fas/FasI, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n., p. 3991–3999, 2014. DOI: 10.4238/2014.May.23.10

LONARDO, A.; LORIA, P. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 36, n., p. 514-515. DOI: 10.1053/jhep.2002.34443.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R.; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem**, v. 395, n. 2, p. 203-230. 2014. DOI: 10.1515/hsz-2013-0241

MALHI, H.; BARREYRO, F. J.; ISOMOTO, H.; BRONK, S. F.; GORES, G. J. FREE fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. **Gut**, v. 56, n. 8, p. 1124–1131, 2007. DOI: 10.1136/gut.2006.118059

MARANZANA, E.; BARBERO, G.; FALASCA, A. I.; LENA, Z., G.; GENOVA, M. L. Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 13, p. 1469–1480, 2013. DOI: 10.1089/ars.2012.4845.

MARÍ, M.; CABALLERO, F.; COLELL, A.; MORALES, A.; CABALLERIA, J.; FERNANDEZ, A.; GARCÍA-RUIZ, C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 3, p. 185–198, 2006. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.07.006

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; MORSELLI-LABATE, A. M.; BIANCHI, G.; BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 107, n. 5, p. 450–455, 1999. DOI:10.1016/s0002

MAULIK, N.; MCFADDEN, D.; OTANI, H.; THIRUNAVUKKARASU, M.; PARINANDI, N. L. Antioxidants in Longevity and Medicine. Editorial, 3 p. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013. DOI:10.1155/2013/820679.

MCCARTHY, E. M.; RINELLA, M. E. The role of diet and nutrient composition in nonalcoholic Fatty liver disease. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 3, p. 401–409, 2012. DOI: 10.1016/j.jada.2011.10.007

MCMILLIAN, M. K.; GRANT, E. R.; ZHONG, Z.; PARKER, J. B.; LI, L.; ZIVIN, R. A.; BURCZYNSKI, M. E.; JOHNSON, M. D. (2001). Nile red binding to HepG2 cells: an improved assay for *in vitro* studies of hepatosteatosis. **In vitro & molecular toxicology**, v. 14, n. 3, p. 177–190, 2001. DOI:10.1089/109793301753407948

MEIER, M.; KLEIN, H. H.; KRAMER, J.; DRENCKHAN, M.; SCHUTT, M. Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n.1, p. 45–51, 2007. DOI:10.1677/joe.1.07087.

MICHELOTTI, G. A.; MACHADO, M. V.; DIEHL, A. M. NAFLD, NASH and liver cancer. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 11, p. 656–665, 2013. DOI: 10.1038/nrgastro.2013.183

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. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9330

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. **Annual review of medicine**, v. 62, n., p 361–380, 2011. DOI: 10.1146/annurev-med-012510-175505

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. DOI: 10.3390/ijms141121240

NICOLSON, G. L. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. **Integrative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 35-43, 2014. PMID: 26770107

ORE, A.; AKINLOYE, O. A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Medicina**, v. 55, n. 2, p. 26, 2019. DOI:10.3390/medicina55020026.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967. PMID: 6066618

PARADIES, G.; PARADIES, V.; RUGGIERO, F. M.; PETROSILLO, G. Oxidative stress, cardioplipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14205-14218, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i39.14205.

PAREKH, S.; ANANIA, F. A. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2191–2207, 2007. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.055

PEISELER, M.; TACKE, F. Inflammatory Mechanisms Underlying Nonalcoholic Steatohepatitis and the Transition to Hepatocellular Carcinoma. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 730, 2021. DOI: 10.3390/cancers13040730

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 7, p. 649–665, 2017. DOI: 10.1016/j.tips.2017.04.004

PURI, P.; MIRSHAHI, F.; CHEUNG, O.; NATARAJAN, R.; MAHER, J. W.; KELLUM, J. M.; SANYAL, A. J. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 568–576, 2008. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.10.039.

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. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x

RIEDL, S.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n., p, 897–907, 2004. DOI: 10.1038/nrm1496.

- RINELLA, M.; CHARLTON, M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. **Hepatology** (Baltimore, Md.), v. 64, n. 1, p. 19–22, 2016. DOI: 10.1002/hep.28524
- SAKURAI, Y.; KUBOTA, N.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4156, 2021. DOI: 10.3390/ijms22084156
- 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. DOI: 10.1172/JCI77812
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852–871, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.017
- SANTAMARIA, E.; AVILA, M. A.; LATASA, M. U.; RUBIO, A.; MARTIN-DUCE, A.; LU, S. C.; MATO, J. M.; CORRALES, F. J. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n., p. 3065–3070, 2003. DOI: 10.1073/pnas.0536625100
- SARSOUR, E. H.; KUMAR, M. G.; CHAUDHURI, L.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C. Redox control of the cell cycle in health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n., p. 2985–3011, 2009. DOI: 10.1089/ars.2009.2513
- SEOK, J.; WARREN, H. S.; CUENCA, A. G.; MINDRINOS, M. N.; BAKER, H. V.; XU, W. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 2013. DOI:10.1073/pnas.1222878110.
- SMOLKOVÁ, K.; MIKÓ, E.; KOVÁCS, T.; LEGUINA-RUZZI, A.; SIPOS, A.; BAI, P. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in regulating cancer metabolism. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 33, n., p. 966–997, 2020. DOI: 10.1089/ars.2020.8024
- 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. DOI: 10.1172/JCI34587
- SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 43, n., p. 1491–1492, 2019. DOI: 10.1038/s41366-019-0363-7.
- 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. DOI: 10.1152/ajpgi.00296.2009

SUMIDA, Y.; NIKI, E.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. **Free Radic Res**, v. 47, p. 869-880, 2013. DOI: 10.3109/10715762.2013.837577.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n., p. 2300–2308, 2012. DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2300.

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. DOI: 10.3748/wjg.v25.i2.163.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology** (Baltimore, Md.), v. 52, n. 5, p. 1836–1846, 2010. DOI: 10.1002/hep.24001

TORRES, P.; MOTTA, B. M.; SCIORIO, R.; MASARONE, M.; PERSICO, M. Inflammation and Fibrogenesis in MAFLD: Role of the Hepatic Immune System. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n., p., 781567, 2021. DOI: 10.3389/fmed.2021.781567.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397-411, 2017. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38

URTASUN, R.; NIETO, N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 99, n. 4, p. 223-230, 2007. DOI: 10.4321/s1130-01082007000400007

VAZQUEZ I. N.; VELEDO, S. F.; KRAMER, D. K.; BEDMAR, R. V.; GUERRA, L. G.; LORENZO, L. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Arch Physiol Biochem**, v. 114, n. 3, p. 183–194, 2008. DOI: 10.1080/13813450802181047

VILAR-GOMEZ, E.; VUPPALANCHI, R.; GAWRIEH, S.; GHABRIL, M.; SAXENA, R.; CUMMINGS, O.W.; CHALASANI, N. Vitamin E Improves Transplant-Free Survival and Hepatic Decompensation among Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis. **Hepatology**, v. 71, n., p. 495–509, 2020. DOI: 10.1002/hep.30368

WANG, B.; CHANDRASEKERA, P. C.; PIPPIN, J. J. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: Relevance for human type 2 diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 10, n., p. 131–145, 2014. DOI: 10.2174/1573399810666140508121012

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. DOI: 10.1007/s11010-009-0142-1

WANG, V. W.; WONG, G. L.; WOO, J.; ABRIGO, J. M.; CHAN, C. K.; SHU, S. S.; LEUNG, J. K.; CHIM, A. M.; KONG, A. P.; LUI, G. C.; CHAN, H. L.; CHU, W. C. Impact of the New Definition of Metabolic Associated Fatty Liver Disease on the Epidemiology of the Disease. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 19, n. 10, p. 2161–2171, 2021. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.10.046.

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. PMID: 21654881

YIN, X.; ZHENG, F.; PAN, Q.; ZHANG, S.; YU, D.; XU, Z.; LI, H. Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 55, n. 3, p. 169–181, 2015. DOI:10.1530/jme-15-0101

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. **Hepatology**, v. 64, p. 73–84, 2016. DOI: 10.1002/hep.28431

YU, Y.; PING, J.; CHEN, J.; JIAO, L.; ZHENG, S.; HAN, Z. G.; HAO, P.; HUANG, J. A comparative analysis of liver transcriptome suggests divergent liver function among human, mouse and rat, **Genomics**, v. 96, n., p. 281- 289, 2010. DOI: 10.1016/j.ygeno.2010.08.003

ZEESHAN, H.; LEE, G.; KIM, H.-R.; CHAE, H.-J. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 327, 2016. DOI: 10.3390/ijms17030327.

ZHANG, L.; WANG, X.; CUETO, R.; EFFI, C.; ZHANG, Y.; TAN, H.; QINA, X.; JIE, Y.; YANG, X.; WANG, H. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox Biology**, v. 26, n., 101284, 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101284.

ZHANG, W.; KUDO, H.; KAWAI, K.; FUJISAKA, S.; USUI, I.; SUGIYAMA, T.; TSUKADA, K.; CHEN, N.; TAKAHARA, T. Tumor necrosis factor- α accelerates apoptosis of steatotic hepatocytes from a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 4, p. 1731-1736, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.144.

ZHANG, Y. -K. J.; WU, K. C.; LIU, J.; KLAASSEN, C. D. Nrf2 deficiency improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, n., p. 305–314, 2012. DOI: 10.1016/j.taap.2012.09.014

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. DOI: 10.1002/hep.30507

ZHOU, F.; XU, X.; WANG, D.; WU, J.; WANG, J. Identification of novel NF- κ B transcriptional targets in TNF α -treated HeLa and HepG2 cells. **Cell Biology International**, v. 41, n. 5, p. 555-569, 2017. DOI: 10.1002/cbin.10762.

ZHOU, H.; LIU, R. ER stress and hepatic lipid metabolism. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n., 112, 2014. DOI:10.3389/fgene.2014.00112

ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7312-7324, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7312

ZOU, B.; YEO, Y. H.; NGUYEN, V. H.; CHEUNG, R.; INGELSSON, E.; NGUYEN, M.H. Prevalence, characteristics and mortality outcomes of obese, nonobese and lean NAFLD in the United States, 1999-2016. **Journal of International Medicine**, v. 288, n., p. 139–151, 2020. DOI: 10.1111/joim.13069

ZOU, C.; MA, J.; WANG, X.; GUO, L.; ZHU, Z.; STOOPS, J.; ... ZARNEGAR, R. Lack of Fas antagonism by Met in human fatty liver disease. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1078–1085, 2007. DOI: 10.1038/nm1625.

ANEXOS

Normas da revista escolhida para submissão do artigo científico

About the Journal

Archives of Physiology and Biochemistry is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Archives of Physiology and Biochemistry accepts the following types of article: Original papers, Reviews and Editorials.

[...]

Preparing Your Paper

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use British (-ise) spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”.

Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise UK English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language please ensure the manuscript

has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.

2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicised.

3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.

4. “US” is preferred to “American”, “USA” to “United States”, and “UK” to “United Kingdom”.

5. Double quotation marks rather than single are used unless the “quotation is „within” another”.

6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: “e.g.”; “i.e.”; “cf.”. Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.

7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.

8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: “The 1980s [not the 1980”s] saw ...”. Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: “The APU”s findings that ...” but note that the plural is “APUs”.

9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. “The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ...” and subsequently, “The APU studies of achievement ...”, in a reference “(Department of Education and Science [DES] 1989a)”.

[...]

Fonte: Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=iarp20>>. Acesso em: 13 fev. 2023.