

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

GABRIELA TOLENTINO AZEVEDO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 17 E ANEXINA A2 EM
MODELO CELULAR DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA ASSOCIADA AO
METABOLISMO**

PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2024

GABRIELA TOLENTINO AZEVEDO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 17 E ANEXINA A2 EM
MODELO CELULAR 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. Thaise
Gonçalves de Araújo**

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

PATOS DE MINAS – MG

FEVEREIRO DE 2024

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

A994 2024	Azevedo, Gabriela Tolentino, 1992- Perfil de expressão de Citoqueratina 17 e Anexina A2 em modelo celular da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo [recurso eletrônico] / Gabriela Tolentino Azevedo. - 2024. Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo. Coorientador: 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.2024.36 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Biotecnologia. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984-, (Orient.). II. Guerra, Joyce Ferreira da Costa, 1986-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título. CDU: 60
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	26/02/2024	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	16:15
Matrícula do Discente:	42212BTC003				
Nome do Discente:	Gabriela Tolentino Azevedo				
Título do Trabalho:	Perfil de expressão de Anexina A2 e Citoqueratina 17 em modelo celular da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo				
Área de concentração:	Biociências				
Linha de pesquisa:	Bioinformática e Biologia Molecular aplicada à genômica, transcriptômica e proteômica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Descoberta, caracterização e validação de marcadores e moléculas bioativas em doenças humanas, animais e vegetais				

Reuniu-se por webconferência do Microsoft Teams, aplicativo padrão da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, assim composta: Professores Doutores: Dra. Cristina Ribas Fürstenau (CCNH - UFABC), Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (IBTEC - UFU) e Thaise Gonçalves de Araújo (IBTEC - UFU) orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/02/2024, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/02/2024, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Ribas Fürstenau, Usuário Externo**, em 26/02/2024, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5210520** e o código CRC **20C548D4**.

GABRIELA TOLENTINO AZEVEDO

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOQUERATINA 17 E ANEXINA A2 EM
MODELO CELULAR 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.

Aprovada em 26 / 02 /2024

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU

Profª. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila – UFU

Profª. Dra. Cristina Ribas Fürstenau – UFABC

PATOS DE MINAS – MG

2024

Dedico esta dissertação à minha querida mãe Vanderleia que sempre caminhou comigo para a realização do meu sonho de seguir carreira acadêmica e não mediu esforços para me apoiar na busca de conhecimento.

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
e, de repente, você estará fazendo o impossível."*

- São Francisco de Assis

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota."*

- Madre Teresa de Calcutá

*"No meio de qualquer dificuldade
encontra-se a oportunidade."*

- Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por me guiar e por tornar mais um sonho possível.

À minha mãe Vanderleia Tolentino dos Santos, por ser minha amiga, minha maior incentivadora, por ser minha base, meu suporte e pela educação que me proporcionou o que possibilitou concluir mais essa fase da minha vida acadêmica.

À minha avó Emília Luísa dos Santos, por todo amor, carinho e dedicação durante todas as etapas da minha vida. Por ter me ensinado o bom caminho pelo exemplo.

À minha orientadora Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, pela oportunidade, pela dedicação em transmitir seus conhecimentos, pelo incentivo, paciência e por sempre estar pronta para ajudar no que for necessário. Obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho!

À minha co-orientadora Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra, e aos demais integrantes do Laboratório de Bioquímica, do departamento de Biotecnologia, pela oportunidade, ensinamentos, amizade e pela contribuição com a linhagem de células, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos tantos amigos que fiz ao longo desses dois anos obrigada pelo apoio, pelos sorrisos e pelas brincadeiras que tornaram a caminhada mais leve e agradável. Em especial, agradeço as amigas Bruna Cássia e Bruna Custódio, que compartilharam comigo conhecimento e momentos importantes desta fase.

Aos colegas do LBq, Vinicius, Maju e Júnior.

Aos colegas do Gbio, em especial Mateus Fernandes, Paulinha, André, Gislaine e Dayanne.

Ao técnico do nosso laboratório, Dr. Raoni. Pela organização dos nossos equipamentos, reagentes e protocolos, facilitando a execução dos experimentos. E por estar sempre disposto a colaborar com seu conhecimento.

As professoras Dra. Veridiana e Dra. Cristina, integrantes da banca, por dispor de seu precioso tempo para avaliarem este trabalho.

Aos professores e servidores da UFU.

Aos meus amigos e familiares.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A obesidade e a doença Hepática Gordurosa Associada ao Metabolismo (MAFLD) têm aumentado entre a população nos últimos anos, tornando-se um problema de saúde pública, incluindo no Brasil. O acúmulo excessivo de gordura corporal é um fator de risco para síndromes metabólicas, o que determina uma íntima relação entre as duas condições. Contudo, o perfil molecular da obesidade e MAFLD ainda é pouco conhecido e se mostra essencial para a compreensão de sua gênese e direcionamento terapêutico. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de expressão de dois novos marcadores Citoqueratina 17 (*KRT17*) e Anexina A2 (*ANXA2*) em modelo celular de MAFLD. Para isso, o acúmulo de lipídios foi induzido expondo células HepG2 à palmitato isolado a 0,7 mM (P), à mistura de ácidos oleico e palmítico a 2:1, sendo definido como OP1 na concentração final de 1 mM e OP2 na concentração final de 2 mM. Os lipídios foram conjugados com albumina sérica bovina (BSA) e mantidos por 24 h. Como controle, as células foram incubadas com veículo (DMEM conjugado com BSA contendo etanol). O acúmulo de lipídios foi avaliado colorimetricamente utilizando *Oil Red*. Ensaio de qRT-PCR e *Western Blotting* foram conduzidos para observar a modulação transcricional de *KRT17*, *ANXA2* e das citocinas *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3*. Os resultados revelaram que houve acúmulo intracelular de lipídios em todos os tratamentos. Em OP2, a expressão de *ANXA2* aumentou significativamente. Os transcritos de *IL-1 β* , *IL-17*, *IL-22*, *TGF- β* , *IL-6* e *STAT3*, também se mostraram significativamente aumentados apenas no grupo OP2, o que evidencia um processo inflamatório associado à MAFLD quando os ácidos oleico e palmítico são adicionados na concentração de 2 mM. Em nível proteico, houve uma maior expressão citoplasmática de ANXA2 em OP1 e OP2, sem diferença significativa no núcleo. Já os níveis de KRT17 foram reduzidos no citoplasma dos tratamentos OP1 e OP2. Portanto, em condições de esteatose por acúmulo de lipídios em células HepG2, ocorre um processo inflamatório acompanhado pelo aumento dos transcritos de *KRT17* e *ANXA2* e um comportamento proteico diferencial, com aumento de ANXA2 no citoplasma e diminuição de KRT17, que pode se translocar para o núcleo. Logo, o eixo citocinas-KRT17/ANXA2 pode ser um alvo promissor na compreensão de distúrbios metabólicos, especialmente MAFLD.

Palavras-chave: Síndrome metabólica; Obesidade; MAFLD; Esteatose hepática; Células HepG2; Citoqueratina 17 e Anexina A2.

ABSTRACT

Obesity and metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) have increased, becoming a public health problem, including in Brazil. Excessive accumulation of body fat is a risk factor for metabolic syndromes, demonstrating a close relationship between the two conditions. However, the molecular profile of obesity and MAFLD is still poorly known and is essential for understanding their genesis and therapeutic targeting. Thus, the present study aimed to evaluate the expression profile of two new markers Cytokeratin 17 (KRT17) and Annexin A2 (ANXA2) in a cellular model of MAFLD. For this, lipid accumulation was induced by exposing HepG2 cells to isolated palmitate at 0.7 mM (P), to oleic and palmitic fatty acids in a 2:1 ratio, defined as OP1 at a final concentration of 1 mM and OP2 at final concentration of 2 mM. The lipids were conjugated with bovine serum albumin (BSA) for 24 hours. As a control, cells were incubated with vehicle (BSA-conjugated DMEM containing ethanol). qRT-PCR and Western Blotting assays were conducted to observe the transcriptional modulation of KRT17 ANXA2 and the cytokines IL1 β , IL17, IL22, TGF β , IL6 and STAT3. The results revealed that there was intracellular accumulation of lipids in all treatments. In OP2, ANXA2 expression increased significantly. IL-1 β , IL-17, IL-22, TGF- β , IL-6 and STAT3 transcripts were also significantly increased in the OP2 group, demonstrating an inflammatory process associated with MAFLD when fatty acids are added at the final concentration 2mM. There was an increase in the cytoplasmic protein expression of ANXA2 in OP1 and OP2, with no significant difference in the nucleus. The expression of KRT17 decreased significantly in the cytoplasm in OP1 and OP2 treatments. Thus, under conditions of steatosis due to lipid accumulation in HepG2 cells, an inflammatory process occurs accompanied by an increase in KRT17 and ANXA2 transcripts and a differential protein behavior, with an increase in ANXA2 in the cytoplasm and a decrease in KRT17, which can translocate to the nucleus. Therefore, the cytokines-KRT17/ANXA2 axis may be a promising target in understanding metabolic disorders, especially MAFLD.

Keywords: Metabolic syndrome; Obesity; MAFLD; Hepatic steatosis; HepG2 cells; KRT17 and ANXA2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) no organismo.....	21
Figura 2: Expansão do tecido adiposo branco (TAB) na obesidade.....	22
Figura 3: Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD).....	27
Figura 4: Fisiopatologia da doença hepática associada ao metabolismo (MAFLD) relacionada à disfunção do tecido adiposo.....	31
Figura 5: Principais biomarcadores circulantes relacionados à doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD).....	34
Figura 6: Organização estrutural de proteínas dos filamentos intermediários (FI).....	36
Figura 7: Organização estrutural da proteína Anexina A2.....	38
Figura 8: Proposta de mecanismo de regulação da expressão de Anexina A2 (ANXA2) nos hepatócitos que promove fibrose hepática esteato-hepatite não alcoólica (NASH).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG: Angiotensina
ANXA2: Anexina A2
AG: Ácidos graxos
AGL: Ácidos graxos livres
AIRE: Reguladores transcricionais como regulador autoimune
ALP: Fosfatase alcalina
ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
BSA: Albumina sérica bovina
B2M: Beta-2-microglobulina
CC: Circunferência da cintura
COVID-19: coronavírus SARS-CoV-2
COOH: Grupo carboxila
CRM1: Exportina1/região de manutenção cromossômica
CT: Colesterol total
DC: Células dendríticas
DCNT: Doenças crônicas não-transmissíveis
DCV: Doença cardiovascular
DM2: Diabetes *mellitus* tipo II
DMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: Ácido desoxirribonucleico: Lipogênese “de novo”
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT: epitélio-mesenquimal
Erk: Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FI: Filamentos intermediários
GGT: Gama glutamil transpeptidase
Gli: Homólogo do oncogene associado ao glioma
GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT4: Proteína transportadora de glicose 4
HCC: Carcinoma hepatocelular
HDL-c: Lipoproteína de alta densidade
HepG2: Linhagem celular de hepatocarcinoma
HSC: Células estreladas hepáticas
IgG: Imunoglobulina G
INF- γ : Interferon-gama
IL: Interleucina
LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade
LEP-R: Receptor de leptina
LmB: leptomicina B
KC: Células de Kupffer
kDa: Quilodalton
KRT17: Citoqueratina 17
MAFLD: Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MDA: Malondialdeído
 MPC-1: Exportina1/região de manutenção cromossômica 1
 MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88
 NAFLD: Doença hepática gordurosa não alcoólica
 NASH: Esteato-hepatite não alcoólica
 NES: Sinal de exportação nuclear
 NF- κ B: Fator de transcrição nuclear *kappa* β
 NLS: Sinal de localização nuclear
 NOX: Enzima NADPH oxidase
 NPC: Região interna do poro nuclear
 NRF: Fator nuclear eritróide
 OPD: Diclotidrato de o-fenilenodiamina
 OPN: Osteopontina
 ORO: Oil Red O
 pb: Pares de bases
 PBS: Tampão fosfato salino
 PCR: Proteína-C reativa
 PKC: Proteína C quinase
 PNS: Pesquisa Nacional de Saúde
 PVAT: Tecido adiposo perivascular
 qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
 RCQ: Relação cintura quadril
 RE: Retículo endoplasmático
 RI: Resistência à insulina
 SDS: Dodecil sulfato de sódio
 Ser: Serina
 SFB: Soro fetal bovino
 SM: Síndrome metabólica
 SNC: Sistema nervoso central
Spp1: Gene fosfoproteína 1 secretada
 SREBP-1: Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1
 STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição
 SUS: Sistema único de saúde
 TA: Tecido adiposo
 TAB: Tecido adiposo branco
 TAG: Triacilgliceróis
 TAM: Tecido adiposo marrom
 TBS: Solução salina tamponada com tris
 TCD8: Linfócito T CD8
 TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
 TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta
 TLR4: Receptor do tipo toll 4
 TNF- α : Fator de necrose tumoral *alfa*
 Treg: Células reguladoras T
 TRIF: Interferon- β contendo domínio TIR
 Tyr: Tirosina
 UV-A: Ultravioleta-A
 VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade
 μ g: Micrograma(s)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Problema	15
1.2 Hipótese	16
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo geral.....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	17
1.4 Justificativa	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Obesidade	17
2.1.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos.....	18
2.1.2 Diagnóstico	20
2.1.3 Patogênese	21
2.1.4 Tratamento.....	27
2.2 MAFLD	28
2.2.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos.....	28
2.2.2 Diagnóstico	31
2.2.3 Patogênese	32
2.2.4 Tratamento.....	35
2.2.5 Modelo experimental de MAFLD	36
2.3 Biomarcadores	38
2.4 Citoqueratina 17	40
2.5 Anexina A2	42
CAPÍTULO 2	46
Modulação da expressão de Anexina A2 e Citoqueratina 17 em modelo celular da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo	46
CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	76
Normas da revista escolhida para submissão do artigo científico	76

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problema

Nas últimas décadas, a mudança no estilo de vida influenciou na transição nutricional entre os brasileiros, de modo que a população diminuiu o consumo de alimentos *in natura* e aumentou a ingestão de alimentos ultraprocessados. O excesso de calorias e gorduras saturadas tem se tornado alarmante em todo o mundo, pois está relacionado com o desenvolvimento de doenças metabólicas como diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), obesidade e doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) (Godoy-Matos *et al.*, 2020). Essas doenças crônicas estão intimamente associadas, de modo que a MAFLD está presente em 80 a 90% dos indivíduos obesos, 30 a 50% dos pacientes diabéticos e 90% naqueles que apresentam dislipidemias (Bellentani *et al.*, 2010).

A MAFLD é uma condição clínica que abrange um espectro amplo de alterações hepáticas, caracterizada pelo aumento superior a 5% de gordura nos hepatócitos, sendo definida como esteatose simples, quando não há inflamação, e como esteato-hepatite não alcoólica (NASH), quando apresenta inflamação lobular, balonização de hepatócitos e fibrose (Chua *et al.*, 2022; Kaya; Yilmaz, 2022). Está entre as causas mais comuns de doença hepática crônica no mundo, atingindo, aproximadamente, 25% da população e considerada uma das principais indicações para transplante de fígado (Clare *et al.*, 2022). É uma doença metabólica assintomática e de difícil diagnóstico, de modo que não existe um método assertivo não invasivo de detecção, nem tratamento medicamentoso específico. Até o momento, a melhor estratégia consiste na reversão dos fatores de risco como sobrepeso e obesidade (Godoy-Matos *et al.*, 2020).

Quando o tecido adiposo subcutâneo expande até seu limite, há uma mobilização de ácidos graxos livres (AGL), causando maior deposição visceral e acúmulo ectópico de gordura. O tecido adiposo disfuncional aumenta a liberação de adipocinas inflamatórias, além de promover estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial (Godoy-

Matos *et al.*, 2020). Fisiologicamente, os hepatócitos não armazenam lipídeos. Quando estes se acumulam, há uma desregulação e morte celulares, acompanhadas do desenvolvimento da esteatose. Esse fenômeno é conhecido como lipotoxicidade e pode ter um importante papel no dano tecidual, além de diminuir a sensibilidade à insulina e conduzir e/ou agravar o quadro de MAFLD. Os triglicerídeos são os principais envolvidos na patogênese hepática e o ácido palmítico (ácido graxo saturado) e o ácido oleico (ácido graxo monoinsaturado) são os ácidos graxos mais abundantes na dieta e conhecidamente associados à MAFLD (Ricchi *et al.*, 2009). Portanto, a relação entre obesidade e MAFLD é evidente, mas seus mecanismos moleculares permanecem pouco compreendidos.

Não há biomarcadores específicos para o diagnóstico diferencial de MAFLD. Clinicamente, é utilizada a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamil transferase (GGT) plasmáticos, sendo estas ferramentas extremamente úteis para diagnóstico de doenças no fígado em sua fase precoce (Abenavoli *et al.*, 2017). Contudo, a microbiota intestinal, marcadores inflamatórios, adipocinas e microRNAs vêm sendo amplamente estudados (Di Mauro *et al.*, 2021). A desregulação dessas proteínas já foi descrita em tumores (Chen *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021; Wang; Lin, 2014; Mei *et al.*, 2021), mas ainda é pouco compreendida na obesidade e/ou MAFLD. Recentemente, alguns pesquisadores sugeriram que ANXA2 pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico de MAFLD, NASH e fibrose hepática (Tavirani *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). A interação entre KRT17 e ANXA2 também já foi descrita, sugerindo um *crosstalk* entre as duas proteínas na regulação de eventos-chave como a inflamação (Chung *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019).

1.2 Hipótese

KRT17 e ANXA2, em níveis proteicos e transcricionais, estão alteradas em modelo celular de MAFLD.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Caracterizar a expressão de KRT17 e ANXA2 em modelo celular de MAFLD.

1.3.2 Objetivos específicos

- Induzir o acúmulo de lipídeos em células HepG2 para estabelecer o modelo *in vitro* de MAFLD;
- Quantificar os transcritos dos genes *KRT17*, *ANXA2*, *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3* no modelo celular de MAFLD;
- Analisar a expressão proteica de KRT17 e ANXA2 no modelo celular de MAFLD;

1.4 Justificativa

A obesidade e a MAFLD estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade na população brasileira e mundial. O tratamento dessas doenças e, conseqüentemente, das alterações metabólicas associadas impacta os sistemas de saúde, tornando-se um grande desafio. Essas patologias têm se mostrado prevalentes devido, principalmente, ao desequilíbrio entre consumo calórico e gasto energético. De fato, há um aumento no consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em açúcares e gorduras, além da manutenção de um estilo de vida sedentário. Para o controle da obesidade e da MAFLD a mudança dos hábitos, incluindo uma alimentação equilibrada, e a prática de exercícios físicos regulares são preponderantes. Em relação à MAFLD não há medicação específica para impedir a evolução da doença. Além disso, as alterações moleculares associadas ao seu surgimento e progressão não foram completamente elucidadas. Torna-se justificável desenvolver estudos dedicados à caracterização de novos biomarcadores, como KRT17 e ANXA2, e a sua associação com parâmetros clínicos, sendo essenciais para a otimização das ferramentas de diagnóstico e de tratamento dessas doenças, direcionando e otimizando políticas públicas em consonância com o Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 da Organização das Nações Unidas (ONU).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal localizada ou generalizada, oferecendo inúmeros riscos à saúde geral do indivíduo. Claramente, compromete toda a homeostase, afetando coração, rins, fígado, sistema reprodutivo e articulações. Além disso, é um dos principais fatores de risco para câncer e doenças cardiovasculares (DCV), contribuindo diretamente para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e inflamação (Freitas Jr *et al.*, 2018; OMS, 2022). Além disso, alguns estudos associaram indivíduos com sobrepeso e obesidade ao risco aumentado de quadros graves de COVID-19 (De Leeuw *et al.*, 2021; Wiechert; Holzapfel, 2022).

A obesidade é uma doença definida como uma desordem metabólica crônica de etiologia multifatorial. Está associada, principalmente, a insegurança alimentar e nutricional da população, condicionada pelo aumento no consumo de alimentos ultra processados, ricos em sódio, açúcares e gorduras saturadas. Esses alimentos contêm alta densidade energética e quando em grandes quantidades, especialmente em indivíduos sedentários, podem desregular o balanço energético, conduzindo ao aumento no número (hiperplasia) e no tamanho (hipertrofia) dos adipócitos (Dias *et al.*, 2017; OMS, 2022). Estas células armazenam o excesso de energia na forma de triglicerídeos e compõem o tecido adiposo, o qual pode constituir cerca de 2 a 70% do peso corpóreo (Freitas Jr *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2021).

A obesidade é uma condição que se relaciona com o declínio na qualidade e expectativa de vida (Freitas Jr *et al.*, 2018; OMS, 2022; Wiechert; Holzapfel, 2022). Contudo, alguns indivíduos podem ter obesidade sem complicações de saúde relacionadas, com sensibilidade à insulina, menos gordura visceral intra-abdominal e um menor grau de inflamação sistêmica. Já os que apresentam DM2, síndrome metabólica (SM), DCV, podem manifestar resistência insulínica, inflamação sistêmica e maior acúmulo de gordura visceral intra-abdominal e ectópica. Adicionalmente, a obesidade impacta na doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), uma desregulação metabólica grave (Lonardo *et al.*, 2020).

2.1.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos

A obesidade é resultante da interação entre diversos fatores de risco, destacando-se aspectos genéticos e epigenéticos. De fato, encontram-se descritos na literatura científica

cerca de 32 genes de predisposição ou que influenciam a obesidade, afetando o armazenamento de gordura corporal e a metabolização dos alimentos. Distúrbios metabólicos e endócrinos também aumentam o risco para a obesidade. Além disso, a alimentação dos pais e o ambiente em que estão inseridos podem imprimir padrões herdáveis de metilação no DNA (ácido desoxirribonucleico). Durante a gestação, os hábitos alimentares maternos podem alterar a metilação do DNA do feto, influenciando seu peso no futuro (Ahmed *et al.*, 2021).

A idade é um fator de risco estabelecido, uma vez que o envelhecimento é decisivo na mudança da composição corporal do indivíduo, com o aumento da proporção de gordura em relação à massa muscular. Após os 20 anos, a taxa metabólica de repouso, que representa a quantidade mínima de energia que o organismo necessita para sobreviver, diminui aproximadamente de 2 a 3% a cada década de vida, o que predispõe à uma redução de 40% da massa muscular esquelética e ao maior acúmulo de gordura abdominal. Com o envelhecimento, a regularidade nos exercícios físicos também diminui, o que favorece a redução do gasto energético total (Ahmed *et al.*, 2021). Finalmente, destacam-se os aspectos ambientais e o fácil acesso da população a alimentos com alta densidade calórica. Seu baixo custo impacta no orçamento familiar, especialmente entre a população de nível socioeconômico baixo. Aliado ao sedentarismo, esse cenário compõe um ambiente favorável ao desenvolvimento da obesidade (Godoy-Matos *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2021).

A prevalência de sobrepeso e obesidade entre adultos tem crescido nas últimas décadas, sendo apontado como um dos principais fatores de risco para diferentes doenças. A Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou mais de 4 milhões de mortes por ano relacionadas a obesidade no mundo, sendo, portanto, um sério problema de saúde pública. De fato, o número de óbitos relacionados à obesidade supera os de desnutrição e dados mostraram que até 2016 mais de 1,9 bilhão de indivíduos em todo o mundo se encontravam em situação de sobrepeso. Destes, cerca de 650 milhões de adultos eram obesos, o que corresponde a 13% da população, totalizando 11% dos homens e 15% das mulheres. Entre os anos de 1975 a 2016 a prevalência de obesidade no mundo triplicou e dados da OMS evidenciam que até 2030 mais de 2,3 bilhões (57,8%) de indivíduos terão a saúde comprometida devido ao sobrepeso e obesidade (OMS, 2022).

No Brasil o mesmo padrão tem sido observado. Dados epidemiológicos da VIGITEL (2019) demonstraram um aumento na prevalência da obesidade de 72% nos

últimos 13 anos, saindo de 11,8% em 2006, para 20,3% em 2019. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do IBGE apontaram que em 2019, 55,4% dos brasileiros apresentaram excesso de peso, sendo essa frequência maior entre homens (57,1%) do que entre mulheres (53,9%). Em relação à obesidade para o mesmo ano, 20,3% dos adultos brasileiros eram obesos, sendo 18,7% dos homens e 20,7% das mulheres (BRASIL, 2019). Além do crescente número de casos a obesidade impacta na economia do país. Nilson *et al.*, (2020), apontaram que, em 2018, os gastos com internações no Sistema Único de Saúde (SUS) relacionadas às principais Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) foram de R\$ 3,84 bilhões. Nesse cenário, a obesidade se mostrou como principal fator de risco para DM2 e HAS, com gastos de R\$ 699 milhões em hospitalizações e serviços ambulatoriais e de R\$ 722 milhões em medicamentos, totalizando R\$ 1,39 bilhão nesse mesmo ano (Nilson *et al.*, 2020).

2.1.2 Diagnóstico

O parâmetro para o diagnóstico de obesidade é o Índice de Massa Corpórea (IMC= kg/m^2) superior ou igual a 30kg/m^2 (Tabela 1). Este é o preditor internacional de obesidade utilizado pela OMS e, apesar de vantajoso para estudos epidemiológicos pela sua simplicidade, não consegue distinguir entre gordura corporal e massa magra. Por isso, são necessários outros critérios auxiliares como a circunferência da cintura (CC), tendo como referência para mulheres $\text{CC} > 88\text{cm}$ e para homens $\text{CC} > 102\text{cm}$ e a relação cintura quadril (RCQ) (OMS, 2022; Rakvaag *et al.*, 2019). Quando esses valores estão aumentados podem indicar a obesidade central, também conhecida como visceral, em que a gordura é armazenada na região superior do corpo e no abdome, aumentando o risco de desenvolver complicações metabólicas (Freitas Jr *et al.*, 2018; Mayoral *et al.*, 2020). Na obesidade periférica, há um acúmulo de gordura na região inferior do corpo como, glúteos, quadril e coxas, com menor risco de complicações metabólicas (Mayoral *et al.*, 2020).

Tabela 1 – Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC=kg/m²) e Circunferência da cintura (CC) em adultos e sua relação com o desenvolvimento de comorbidades.

Classificação	IMC (Kg/m ²)	Circunferência da cintura	Risco de comorbidades
Baixo peso	<18.5		Baixo
Peso normal	18.5 a 24.9	Homem < 94 cm Mulher < 80 cm	Médio
Sobrepeso	25 a 29.9	Homem > 94 cm Mulher > 80 cm	Pouco aumentado
Obesidade Grau I	30 a 34.9	Homem ≥ 102 cm Mulher ≥ 88 cm	Moderado
Obesidade Grau II	35 a 39.9		Grave
Obesidade Grau III (Obesidade mórbida)	>ou igual a 40		Muito grave

Fonte: Adaptado de ABESO, 2009, 2016.

2.1.3 Patogênese

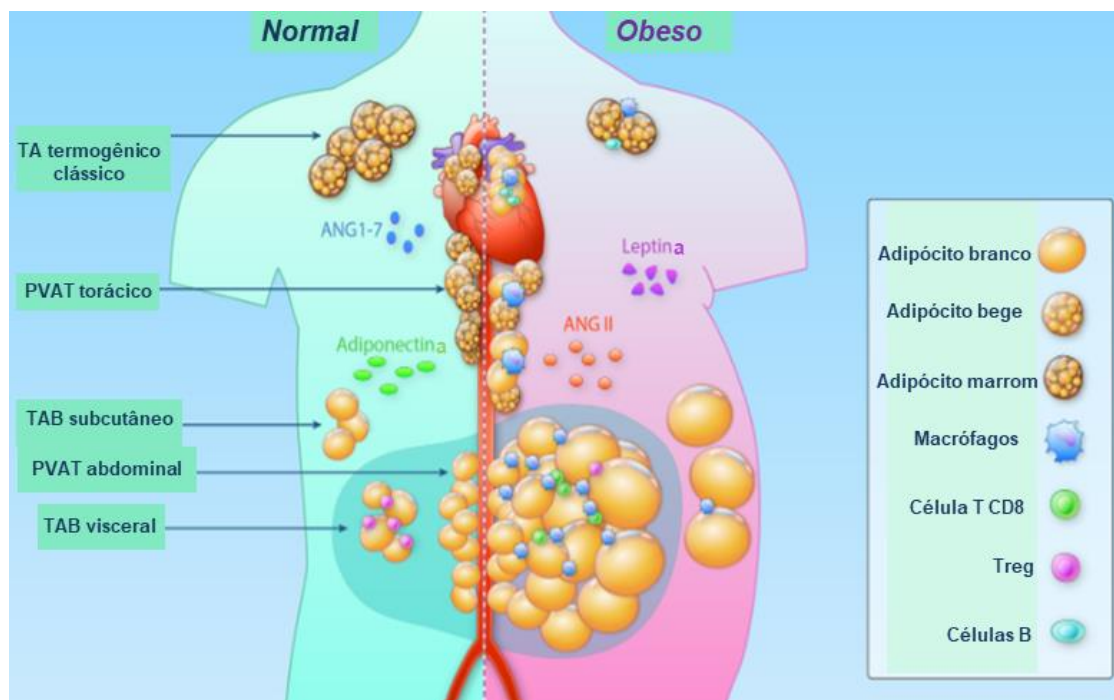
O tecido adiposo é responsável pelo armazenamento de energia do organismo na forma de triacilglicerídeos (TAG) e sua liberação na forma de ácidos graxos (AG). Pode ser diferenciado em tecido adiposo branco (TAB) ou marrom (TAM), sendo ambos relacionados com o balanço energético. O TAB é caracterizado por adipócitos brancos que armazenam energia, ou com função endócrina. O TAM é formado por adipócitos marrons ricos em mitocôndrias e altamente vascularizados, com função termogênica, ou seja, são responsáveis pela manutenção da temperatura corporal, de acordo com a temperatura do ambiente ou dieta, principalmente em recém-nascidos (Cheng *et al.*, 2021; Kawai *et al.*, 2021).

O TAB é o mais abundante e não apenas estoca energia e promove proteção mecânica, mas também se encontra envolvido em processos fisiológicos e metabólicos, modulando a resposta imunológica e a inflamação. Pode estar distribuído em diferentes locais, como no tecido subcutâneo (TAB subcutâneo) abdominal, glúteos e femorais.

Ademais, podem se depositar nas vísceras (TAB visceral), como no omento, no mesentério e perirrenal, predispondo o indivíduo a quadros graves de doenças, especialmente metabólicas (Ahmed *et al.*, 2021). O TAB subcutâneo tem a função de secretar mais de 50 substâncias com relevantes efeitos biológicos como hormônios, fatores de crescimento, enzimas, citocinas, adipocinas e RNAs não codificantes encontrados em vesículas extracelulares. Metabolicamente, é responsável pela maior expressão de adipocinas se comparado ao TAB visceral. Este último é considerado mais ativo, por apresentar maior liberação de AG e estar relacionado ao aumento de citocinas e fatores que desregulam o metabolismo lipídico e da glicose, causando maior resistência insulínica. Portanto, o TAB visceral é um fator de risco para DCV (Cheng *et al.*, 2021; Freitas Jr *et al.*, 2018; Lustig *et al.*, 2022; Mayoral *et al.*, 2020).

O TAB é adaptado para o acúmulo de gordura. Portanto, os adipócitos brancos possuem um vacúolo de gordura expansivo e poucas mitocôndrias. Um TAB saudável apresenta adipócitos menores em maior número, secreção de adiponectina, baixa lipólise, oxidação normal das mitocôndrias, sensibilidade à insulina, poucos macrófagos com perfil inflamatório e localizado na região subcutânea. Já um TAB não saudável em um indivíduo obeso, apresenta maior secreção de adipocinas, como leptina e resistina, e diminuição na secreção de adiponectina. Além disso, há resistência insulínica, hipertrofia dos adipócitos, aumento dos macrófagos com perfil pró-inflamatório e localização visceral (Figura 1) (Lustig *et al.*, 2022).

Figura 1 – Representação do tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) no organismo. Quando o peso corpóreo está normal (à esquerda), são notados adipócitos termogênicos marrons (ricos em mitocôndrias) circundando a aorta torácica e adipócitos brancos circundando a aorta abdominal e vasculatura mesentérica, sendo identificados em depósitos subcutâneos e viscerais. No tecido magro o tecido adiposo mantém diferentes células imunes importantes para a homeostase. Em indivíduos obesos (à direita), diminuem as células reguladoras T (Treg) no tecido adiposo visceral, aumentando as células TCD8 inflamatórias. Os macrófagos se infiltram em maior proporção nos tecidos adiposos viscerais e mesentéricos. A secreção de angiotensina (ANG 1-7) e adiponectina (fatores dilatadores dos adipócitos) são diminuídas e a secreção de leptina e angiotensina II (ANG II) são aumentadas na obesidade, o que aumenta a pressão arterial. TA, tecido adiposo; PVAT, tecido adiposo perivascular; TCD8, linfócito T CD8.



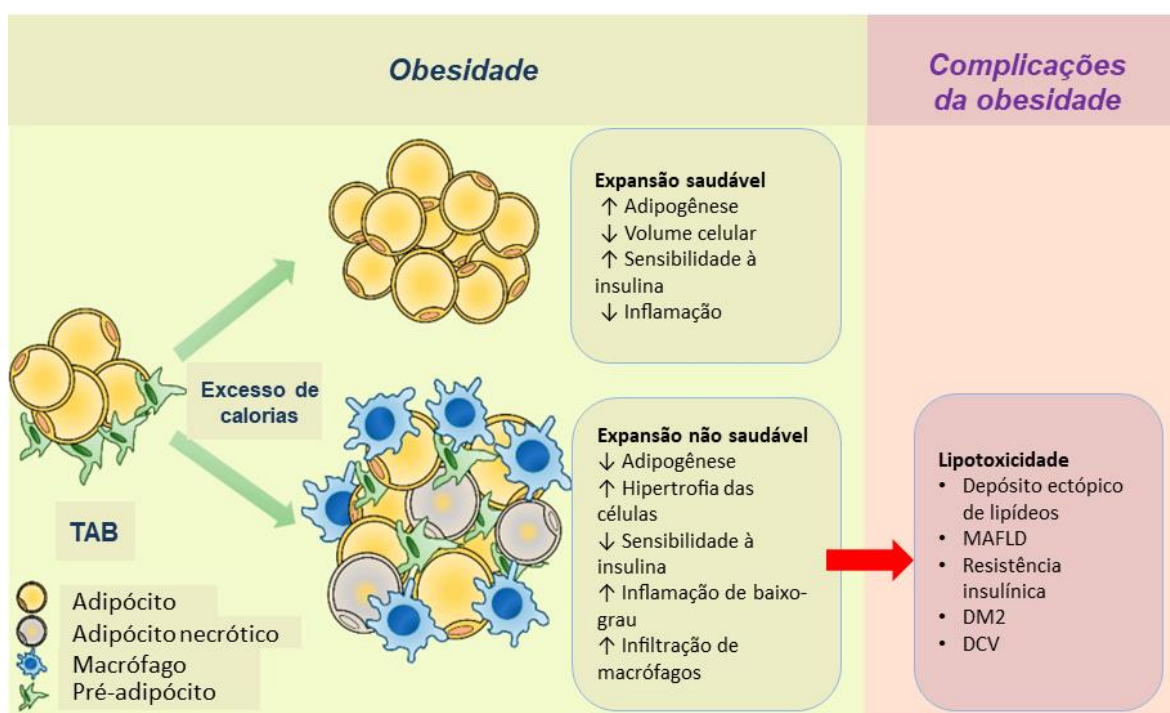
Fonte: Adaptado de Koenen *et al.*, 2021.

Quando os triglicerídeos são ingeridos em excesso e os adipócitos não conseguem absorvê-los, ocorre a adipogênese, ou seja, a formação de novos adipócitos. O armazenamento de TAG nos adipócitos representa cerca de 85 a 90% de seu tamanho celular, tendo a capacidade de aumentar em 20 vezes (Hammarstedt *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2021). Durante o ganho de peso, com o aumento dos adipócitos, o TAB adquire perfil secretor pró-inflamatório de baixo grau, com o aumento na liberação de ácidos graxos livres (AGL), espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas pró-inflamatórias. Os AG podem desencadear essas alterações, pois ativam proteínas que respondem a estímulos de estresse, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). AG também ativam receptor do tipo toll 4 (TLR4) em adipócitos e macrófagos residentes por meio de vias mediadas por proteínas adaptadoras como fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e interferon-β contendo domínio TIR (TRIF). Essa

ativação aumenta o estresse do Retículo endoplasmático (RE) que produz ERO e secreta as citocinas pró-inflamatórias (Ahmed *et al.*, 2021).

De fato, a disfunção do tecido adiposo em obesos e a supernutrição crônica leva a produção aumentada de mediadores inflamatórios, o que pode gerar complicações (Figura 2). Esse perfil pró-inflamatório crônico é fundamental para o processo de hipertrofia dos adipócitos. O TAB em expansão gera um ambiente de hipóxia e a consequente morte de adipócitos, que juntamente à liberação de citocinas pró-inflamatórias, levam a maior inflamação e ao aumento da presença de macrófagos, em um sistema de *feedback* positivo (Longo *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2021).

Figura 2 – Expansão do tecido adiposo branco (TAB) na obesidade. O excesso de calorias, pode, ou não, acarretar uma expansão saudável de TAB. Uma expansão saudável dos adipócitos protege o organismo contra as complicações metabólicas associadas à obesidade. Já na expansão não saudável ocorre a hipertrofia desses adipócitos, causando complicações metabólicas como depósito ectópico de gordura, MAFLD (doença hepática gordurosa associada ao metabolismo), resistência insulínica, DM2 (diabetes *mellitus* tipo 2) e DCV (Doenças cardiovasculares).



Fonte: Adaptado de Longo *et al.*, 2019.

Nesse contexto, principalmente na obesidade central, verifica-se um aumento na expressão de proteína quimioatraente de monócitos-1 (MPC-1), interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína C-reativa (PCR) e na secreção de adipocinas como leptina, angiotensinogênio e resistina (Dias *et al.*, 2017; Nelson; Cox, 2019; Rakvaag *et al.*,

2019). A MPC-1 é uma adipocina responsável por recrutar monócitos para o tecido adiposo, onde se diferenciam em macrófagos. O macrófago residente polariza de um fenótipo anti-inflamatório M2 para um fenótipo pró-inflamatório M1. Este é responsável por fagocitar, liberar fatores inflamatórios e combater os agentes patógenos. Logo, há a liberação de TNF- α , IL-6, IL-1 β , resistina e AGL pelo tecido adiposo e a redução de adiponectina, o que pode levar ao quadro de resistência insulínica periférica, muito comum em indivíduos obesos. Os adipócitos, miócitos e hepatócitos não respondem adequadamente a insulina e, para manter a homeostase glicêmica, as células β -pancreáticas produzem mais insulina gerando a hiperinsulinemia. Essa sobrecarga pode levar a falência das células β -pancreáticas e, como consequência, desenvolver o DM2. Cerca de 80% dos indivíduos obesos poderão desenvolver DM2 em algum momento da vida. Contudo, 10 a 25% de pessoas com obesidade são metabolicamente saudáveis, mas, ainda assim, permanecem como um grupo de risco de DCV (Longo *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2021).

Existe um crescente interesse na compreensão dos mecanismos neurofisiológicos reguladores da massa corpórea e do armazenamento de gordura. Esses processos podem envolver, além do Sistema Nervoso Central (SNC) e do sistema digestivo, outros sistemas reguladores da homeostase energética, estando todos associados à progressão da obesidade e liberação de adipocinas (Freitas Jr *et al.*, 2018; Mayoral *et al.*, 2020). Estas são secretadas pelos adipócitos e são responsáveis pela sinalização intercelular, com funções autócrina, parácrina e endócrina. Dentre as principais adipocinas estão a leptina, resistina e adiponectina (Nelson; Cox, 2019).

A leptina está entre um dos principais hormônios peptídicos envolvidos na homeostase energética. É uma adipocina responsável por controlar a saciedade, enviando estímulos ao hipotálamo, com um papel importante na regulação da ingestão alimentar e no gasto de energia. Portanto, sinaliza para o SNC como estão as reservas energéticas do organismo. Pessoas obesas secretam maiores quantidades de leptina, a qual inibe o apetite e a síntese de gordura, ativando a oxidação de AG. Quando o tecido adiposo diminui e a leptina é liberada em menores quantidades, a fome é estimulada e a oxidação de AG é diminuída (Lustig *et al.*, 2022; Nelson; Cox, 2019). Assim, em indivíduos obesos, a leptina encontra-se superexpressa, podendo diminuir na fase inicial de perda de peso, mas aumenta novamente à medida que a perda de peso se mantém. Essa alteração na expressão desse hormônio e a diminuição na sensibilidade de seus receptores (LEP-R) pode levar à resistência à leptina. Esse evento contribui para o aumento da fome, levando ao aumento

do peso e outras complicações da obesidade. Por isso, mesmo sendo um dos principais supressores de apetite, ainda não existe um tratamento para obesidade em que a leptina seja uma droga viável, pois seus mecanismos que regulam a massa corpórea precisam ser mais bem compreendidos (Obradovic *et al.*, 2021).

A resistina é outra adipocina produzida nos adipócitos e macrófagos presentes no tecido adiposo e associada ao risco aumentado de doenças metabólicas. Na obesidade, com o aumento da gordura intra-abdominal, ocorre maior liberação de AGL através da veia porta, o que aumenta a síntese hepática de TAG. Esse desequilíbrio leva ao aumento da secreção de resistina, a qual desregula a cascata de insulina e prejudica a translocação do transportador de glicose 4 insulino-sensível (GLUT4) para a membrana. Com isso, a entrada da glicose na célula é bloqueada, promovendo a resistência insulínica. O quadro de hiperinsulinemia atua no SNC aumentando a atividade do sistema nervoso simpático e elevando, principalmente, a resistência vascular periférica e a retenção de sódio, o que predispõe a HAS e DM2 (Landecho *et al.*, 2019).

A adiponectina pode ser produzida no tecido adiposo (adipocina) ou no tecido muscular esquelético (miocina). Ela sensibiliza outros órgãos à insulina e exerce ação anti-inflamatória. Está presente na corrente sanguínea, sendo a grande responsável pelo metabolismo de AG e carboidratos no músculo e fígado. Com a liberação de adiponectina, os miócitos captam mais AG e glicose da corrente sanguínea e aumentam sua β -oxidação nos músculos. Pacientes obesos tem os níveis plasmáticos de adiponectina reduzidos, o que pode comprometer a sensibilidade à insulina e a captação/oxidação de glicose. Nesse contexto, ocorre a resistência insulínica, o que prejudica a manutenção da massa magra, uma vez que a sinalização para as vias de síntese proteica nos miócitos diminui. Além disso, em menores concentrações, seu efeito anti-inflamatório também reduz, deixando o indivíduo mais suscetível a doenças como câncer, DM2, HAS e MAFLD (Landecho *et al.*, 2019; Nelson; Cox, 2019).

A grelina é uma adipocina. É um hormônio peptídico que age no hipotálamo, sendo produzido pelo estômago e, em menores níveis, na porção superior do intestino. Está envolvida na regulação de curto prazo do balanço energético e, é associada ao aumento da adiposidade. Além disso, possui outras funções no organismo como regular o metabolismo da glicose, o comportamento de recompensa, o sistema imune e a motilidade intestinal. Possui efeito antagônico da leptina, ou seja, é responsável por sinalizar a sensação de fome. Está elevada, principalmente, em períodos de jejum e, após ingestão alimentar, seus

níveis caem novamente. Indivíduos com menos tecido adiposo produzem mais grelina para estimular a fome e manter o equilíbrio do tecido. Ao contrário, pessoas obesas possuem níveis plasmáticos baixos de grelina. Essa alteração na expressão de grelina tem se apresentado como um mecanismo de adaptação fisiológica ao balanço energético positivo que ocorre na obesidade (Landecheo *et al.*, 2019; Francisco *et al.*, 2022; Lustig *et al.*, 2022).

Por fim, a obesidade pode acarretar dislipidemia, um importante fator de risco cardiovascular, principalmente quando existe excesso de gordura visceral, sendo caracterizada pelo excesso dos níveis de lipídeos no sangue. Há um aumento do colesterol total (CT) devido à desregulação das frações lipídicas, aumentando lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e diminuindo lipoproteínas de alta intensidade (HDL-c). Além disso, pode ocorrer um aumento dos TAG circulantes e dos níveis de moléculas pró-coagulantes. Na obesidade, os altos níveis circulantes de LDL-c, da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e TAG são altamente aterogênicos (Civeira *et al.*, 2022).

2.1.4 Tratamento

Por ser uma doença com fisiopatologia complexa, o tratamento para a obesidade é desafiador, uma vez que depende de mudanças no comportamento dos indivíduos. A base para o tratamento é o balanço energético negativo, sendo fundamentais a supervisão e regularidade da alimentação saudável, apoio emocional e prática de exercícios físicos. Estes podem estar associados a terapias medicamentosas ou não. Outra solução recorrente tem sido a cirurgia bariátrica, indicada, geralmente para pacientes com IMC acima de 40kg/m² (obesidade mórbida). O tratamento da obesidade, de forma geral, pode gerar um alto custo, especialmente quando acompanhada por outras patologias (Godoy-Matos *et al.*, 2020; OMS, 2022; Wiechert; Holzapfel, 2022).

O exercício físico intenso tem sido a forma mais eficaz para o tratamento, de modo que entender, principalmente, como essa prática pode impactar na saúde metabólica é fundamental para melhorar a sensibilidade insulínica. É conhecido que a prática dos exercícios em um dia melhora a sensibilidade insulínica no dia seguinte. Além disso, alguns dias sem exercícios altera o quadro de melhora. Já o exercício de longo prazo pode elevar as enzimas metabólicas no músculo esquelético e a densidade mitocondrial (Ryan *et al.*, 2020).

2.2 MAFLD

A MAFLD é a doença hepática crônica mais prevalente no mundo, sendo a causa mais comum de disfunção hepática. Foi anteriormente designada como “doença hepática gordurosa não alcoólica” (NAFLD) ao ser considerado apenas o acúmulo excessivo de gordura (superior a 5%) na forma de TAG no interior dos hepatócitos, sem associação ao consumo de álcool. Contudo, essa terminologia foi questionada por pesquisadores, uma vez que a expressão “não-alcoólica” não reflete com precisão a patogênese envolvida na doença. Portanto, em 2020 especialistas entraram em consenso e a consideraram uma doença associada ao metabolismo (Kaya; Yalmaz, 2022; Gofton *et al.*, 2023; WGO, 2022).

Essa nova definição permitiu uma abordagem mais precisa para identificar pacientes com alto risco de progressão da MAFLD. Assim, para o diagnóstico dessa doença, é necessária a evidência de esteatose hepática por exames de imagem, análise histológica do tecido hepático ou quantificação de biomarcadores sanguíneos, além de correlação com um ou mais dos seguintes fatores: sobrepeso ou obesidade, DM2 e síndrome metabólica. A MAFLD também pode apresentar associação com doenças extra-hepáticas (Sakurai *et al.*, 2021; Kaya; Yalmaz, 2022; Gofton *et al.*, 2023).

2.2.1 Etiologia e aspectos epidemiológicos

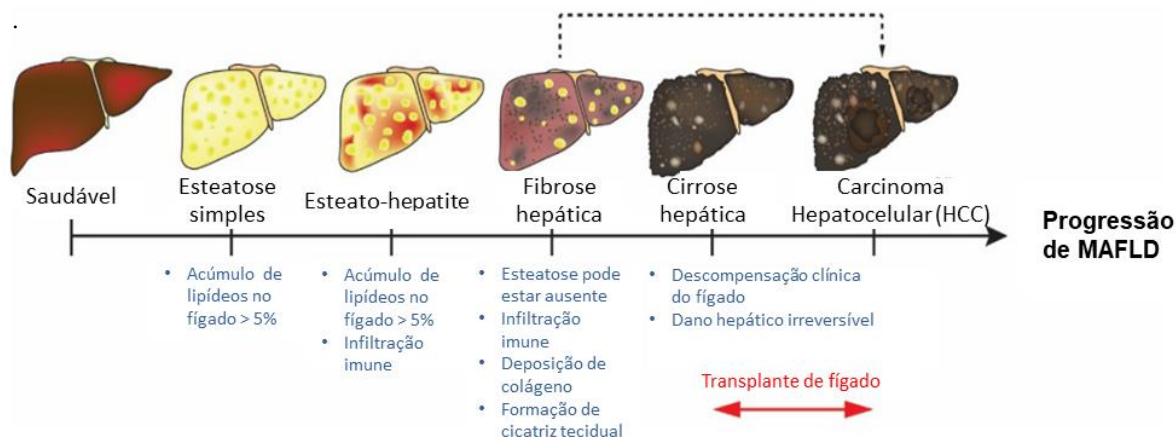
A pré-disposição genética e os fatores ambientais são os principais fatores de risco da MAFLD. Sabe-se que o acúmulo intra-hepático de TAG pode acontecer por diversas fontes, como captação hepática de AG não esterificados do plasma (59%), gordura dietética (15%) e através da lipogênese “*de novo*” (DNL) (26%) (Ferguson *et al.*, 2021; Clare *et al.*, 2022). A fisiopatologia de MAFLD é multifatorial (Baltieri *et al.*, 2018; Godoy-Matos *et al.*, 2020) de modo que a obesidade se destaca, uma vez que o acúmulo excessivo de gordura corporal pode ultrapassar o tecido adiposo, sendo armazenado em outros órgãos como o fígado. Esse excesso de gordura nos hepatócitos pode desencadear estresse oxidativo a partir da geração de EROs, processos inflamatórios, necrose celular e, por fim, fibrose (Abenavoli *et al.*, 2017; WGO, 2022). Cerca de 90% dos indivíduos com a doença apresentam obesidade central, hipercolesterolemia, níveis baixos de HDL-c, alteração da glicose ou HAS e aproximadamente 33% preenchem os critérios para o

diagnóstico de síndrome metabólica. Logo, o diagnóstico de MAFLD está aumentando paralelamente a obesidade (Francisco *et al.*, 2022).

Apesar dos estudos genéticos serem escassos, pelo menos cinco genes distintos foram descritos como associados à MAFLD, sendo estes codificadores para fosfolipase contendo domínio semelhante a patatina 3 (*PNPLA3*), membro 2 da superfamília da transmembrana 6 (*TM6SF2*), proteína reguladora de glucoquinase (*GKRP*), domínio de O-aciltransferase ligado à membrana contendo 7 (*MBOAT7*) e 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 13 (*17 β HSD13*). Variações nos genes associados à obesidade em conjunto com o aumento da gordura corporal podem aumentar o risco para MAFLD (Kaya; Yalmaz, 2022).

Na MAFLD devem ser excluídas outras causas secundárias de acúmulo de gordura hepática como alcoolismo, hepatites e uso de medicamentos, sendo uma patologia sem indícios de lesão hepatocelular. Contudo, pode evoluir para a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) na qual, além do acúmulo de gordura, ocorre a inflamação com lesão nos hepatócitos, com ou sem fibrose, ou presença de balonização hepatocelular. Quando não for tratada, pode progredir para cirrose e, em casos extremos, insuficiência hepática, ou carcinoma hepatocelular (HCC) (Figura 3). Estimativas indicam que a MAFLD será, em um curto prazo, a principal indicação para transplante de fígado (Bellentani *et al.*, 2010; Chalasani *et al.*, 2018; Unsal *et al.*, 2022; WGO, 2022). Essa progressão de NASH com cirrose hepática a HCC envolve mecanismos complexos com a importante participação de mediadores inflamatórios e disfunção metabólica (Chua *et al.*, 2022; Sakurai *et al.*, 2021).

Figura 3 – Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). Caso a esteatose simples persista, ocorre infiltração de células imune desenvolvendo a esteato-hepatite não alcoólica (NASH). A MAFLD não tratada gera alterações metabólicas graves e comprometimento de múltiplos órgãos podendo apresentar lesão hepática crônica. Além disso, pode evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (HCC). Nesses últimos estágios o dano é irreversível, com necessidade de transplante de fígado.



Fonte: Adaptado de Chua *et al.*, 2022.

Assim como a obesidade, a MAFLD também é considerada um problema de saúde pública, acometendo aproximadamente 25% dos adultos da população mundial. É mais prevalente na América do Sul e Oriente Médio, seguidos pela Ásia, Estados Unidos da América (EUA) e Europa (Clare *et al.*, 2022; Godoy-Matos *et al.*, 2020). A dismorfia sexual em torno das regulações metabólicas corrobora com evidências de lesões hepáticas induzidas pela MAFLD serem mais graves no sexo masculino. Porém, há controvérsias, uma vez que a estimativa é incerta, principalmente pela dificuldade em se estabelecer o diagnóstico (Chalasani *et al.*, 2018). Pode ocorrer em todas as idades, porém acomete menos crianças quando comparadas a adultos (13 a 15%), aumentando seu risco quanto maior for o peso do indivíduo (30 a 80%). Essa prevalência se agrava com o aumento da idade e pode ser maior em homens entre 40 a 65 anos (Bellentani *et al.*, 2010). Sabe-se que entre 50,7% dos adultos com MAFLD apresentam sobrepeso/obesidade, com maior prevalência em homens (59%) do que em mulheres (47,5%) (Liu, *et al.*, 2022).

Contudo, nem todos os acometidos apresentam aumento de peso, mas cerca de 80 a 90% dos adultos obesos são diagnosticados com MAFLD. Estima-se que a incidência da doença aumente em cerca de 56% na próxima década (Bellentani *et al.*, 2010; Chalasani *et al.*, 2018; Unsal *et al.*, 2022). Em relação aos óbitos, 40% dos casos de MAFLD morrem em decorrência de DCV. Cerca de 4 a 8% apresentam complicações como cirrose e um percentual mínimo, entre 1 a 5%, morrem por HCC (Maurice; Manousou, 2018; Vandel *et*

al., 2021). O Brasil ainda carece de dados epidemiológicos relacionados à MAFLD. Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia (2022), utilizando ultrassonografia como método diagnóstico, pode-se constatar que 20% da população nacional apresenta esteatose hepática (SBH, 2022).

2.2.2 Diagnóstico

Não há sintomas definidos. Alguns pacientes se queixam, apenas, de desconforto no quadrante superior direito e mal estar, podendo apresentar hepatomegalia no exame físico. Por isso, é um distúrbio que ainda demanda um diagnóstico preciso e uma terapia otimizada. Sua identificação pode ser realizada por biópsia hepática, sendo esta uma ferramenta mais invasiva, pois podem causar hemorragia interna. Porém, é considerada padrão-ouro, por ser capaz de estadiar a doença. Contudo, é recomendada em situações específicas como, para pacientes com suspeita de NASH, ou com confirmação de MAFLD e alto risco para NASH e/ou fibrose avançada. Essa condição é observada na alteração de biomarcadores hepáticos por mais de três meses e na presença de SM não controlada (Cotrim *et al.*, 2016). Além da biópsia hepática, o diagnóstico requer confirmação histológica de balonamento de hepatócitos, infiltrados inflamatórios e fibrose (Ferguson *et al.*, 2021).

Para a detecção são utilizados exames de imagem como ultrassom, tomografia computadorizada, ressonância magnética e espectroscopia de ressonância magnética. Contudo, esses métodos não diferenciam a MAFLD de NASH (Abenavoli *et al.*, 2017; Chalasani *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2017). A partir desses exames, é estabelecido o escore de Hamaguchi, no qual é observado o percentual do acúmulo de gordura hepática, sendo grau 0 ou ausente quando < 5%, grau 1 ou leve quando de 5 a 33%, grau 2 ou moderado quando > 33 até 66% e grau 3 ou grave quando > 66% (Abenavoli *et al.*, 2017; Hamaguchi *et al.*, 2005). Por fim, análises bioquímicas podem ser utilizadas para avaliar o perfil hepático, como aminotransferases, γ -glutamil-transpeptidase (GGT), albumina, bilirrubinas, fosfatase alcalina e tempo de protrombina. O valor de referência de alanina aminotransferase (ALT) para mulheres é até 31U/L e para homens é até 41U/L. A razão entre aspartato aminotransferase (AST)/ALT geralmente é menor que um, mas mudanças nesses valores não são um diagnóstico preciso para MAFLD (Abenavoli *et al.*, 2017; Laursen *et al.*, 2022). Em 50% dos casos de MAFLD, os pacientes apresentam níveis de

aminotransferases normais, o que demonstra que as enzimas hepáticas não substituem biomarcadores específicos da doença (Bellentani *et al.*, 2010).

2.2.3 Patogênese

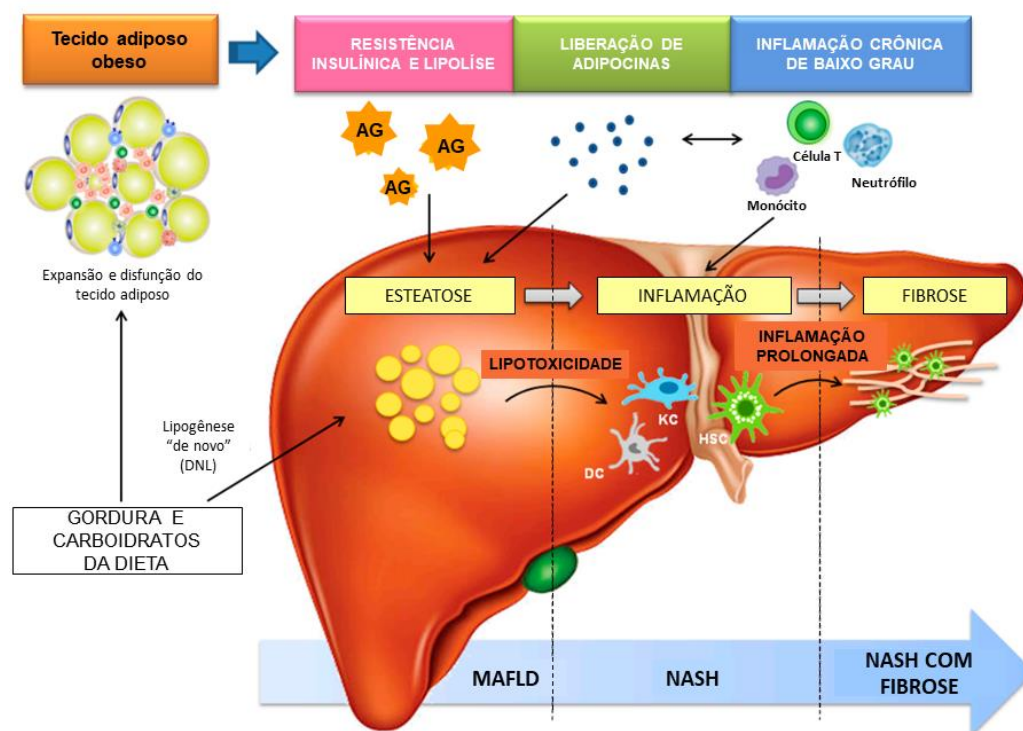
Os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento e progressão da MAFLD ainda não estão bem esclarecidos, apesar de estar claro o desequilíbrio entre o eixo tecido adiposo obeso e fígado (Chua *et al.*, 2022; Francisco *et al.*, 2022). A teoria dos “dois *hits*” é o modelo inicial de patogênese aceito. Neste, o “primeiro *hit*” inclui o acúmulo de gordura hepática (TAG > 5%) seguido de diminuição da sensibilidade à insulina. O “segundo *hit*” consiste no desenvolvimento de uma resposta inflamatória no fígado esteatótico associada ao estresse oxidativo, estresse do RE e secreção de citocinas pró-inflamatórias, seguida de apoptose, fibrose e, finalmente, a NASH (Day; James, 1998; Godoy-Matos *et al.*, 2020). Porém, diante dos avanços científicos, essa teoria se tornou simplista e obsoleta. Atualmente, sabe-se que o mecanismo para o desenvolvimento e progressão da MAFLD é multifatorial e complexo. Em 2010, foi proposto um modelo de “múltiplos *hits*” em que vários fatores interagem de maneira sinérgica, sequencial ou paralela induzindo à MAFLD. Alguns desses fatores de risco são a peroxidação lipídica, estresse oxidativo devido à disfunção mitocondrial, dieta e epigenética (Chao *et al.*, 2019; Godoy-Matos *et al.*, 2020; Chua *et al.*, 2022).

Sabe-se que o tecido adiposo não é para simples estocagem de energia, sendo um órgão endócrino e ativo, capaz de afetar os estágios iniciais de MAFLD e a progressão para NASH e fibrose hepática. Juntamente com o fígado é responsável por regular a homeostase energética de todo organismo (Francisco *et al.*, 2022). O excesso de TAG e carboidratos da dieta são convertidos em AGL no fígado. Enquanto os TAG dietéticos são emulsificados por ácidos biliares e hidrolisados pela lipase pancreática para formar AGL, os carboidratos em excesso são convertidos a AGL através da lipogênese “*de novo*” (DNL). O desequilíbrio entre a produção e a degradação lipídica gera alteração no metabolismo de lipídeos intra e extra-hepático. Nos hepatócitos, os AGL podem ser oxidados para gerar energia para o TAM ou músculo, através da β -oxidação mitocondrial. Além disso, os AGL podem sofrer esterificação no RE liso, sendo convertido em TAG e armazenados como gotículas lipídicas no TAB, ou exportados junto com a apolipoproteína B (ApoB) e

liberados como lipoproteínas (HDL, LDL e VLDL) na corrente sanguínea (Godoy-Matos *et al.*, 2020; Francisco *et al.*, 2022).

Na MAFLD, esse influxo aumentado de AGL nos hepatócitos sobrecarrega o metabolismo dessas células e gera falhas na β -oxidação e disfunção mitocondrial, causando um acúmulo anormal de gordura. Esse acúmulo promove a lipotoxicidade, com um influxo de AGL para os hepatócitos e expressão do Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), o qual ativa a DNL, que converte o excesso de carboidratos da dieta em AGL, aumentando o grau de esteatose. O excesso de AGL nos hepatócitos também pode ser utilizado como substrato para produção de lipotoxinas como diacilgliceróis e ceramidas, as quais causam estresse hepatocelular, estresse do RE e disfunção mitocondrial. Essas lipotoxinas também ativam a enzima NADPH oxidase (NOX), responsável por gerar ERO como superóxidos, malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e conduzir ao desequilíbrio do estado redox do metabolismo lipídico hepático, efeito visto em MAFLD. A lipotoxicidade hepática também resulta em resistência insulínica, a qual é considerada um dos principais fatores de risco para a doença, uma vez que estimula a lipólise e aumenta TAG no fígado. Além disso, ativa células imunes inatas hepáticas, como células dendríticas (DC), células de *Kupffer* (KC) e células estreladas hepáticas (HSC) todas necessárias para progressão de NASH (Figura 4) (Godoy-Matos *et al.*, 2020; Clare *et al.*, 2022; Francisco *et al.*, 2022).

Figura 4 – Fisiopatologia da doença hepática associada ao metabolismo (MAFLD) relacionada à disfunção do tecido adiposo. Uma dieta rica em gordura e carboidratos promove a expansão do tecido adiposo branco (TAB) e ocasiona a disfunção dos adipócitos. Esse evento leva à obesidade e à resistência insulínica, que induz a lipólise. Como consequência, há o desequilíbrio de ácidos graxos (AG) circulantes e liberação de adipocinas, o que contribui para o acúmulo de gordura intra-hepática (esteatose). Esse quadro é intensificado pelo alto consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares, aumentando a lipogênese “*de novo*” (DNL). O acúmulo ectópico de metabólitos tóxicos derivados de triglicerídeos (TAG) é um fenômeno que pode conduzir à lipotoxicidade e, consequentemente, à disfunção celular (estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial), lipoapoptose e inflamação. A expansão dos adipócitos, a expressão aumentada de quimioatraentes e a infiltração de células imunes no tecido adiposo contribuem de forma significativa para a inflamação crônica de baixo grau. Além disso, no fígado, várias células específicas como células dendríticas (DC), células de *Kupffer* (KC) e células estreladas hepáticas (HSCs), são ativadas e ocorre infiltração de células imunes circulantes (neutrófilos, monócitos e células T). Então, a inflamação se prolonga e a fibrogênese é iniciada tendo as HSCs como principais atores-chave.



Fonte: Adaptado de Francisco *et al.*, 2022.

O TAB é constituído de adipócitos maduros e em desenvolvimento, fibroblastos, células endoteliais e células imunológicas responsáveis por manter a homeostase dos tecidos. Em um indivíduo magro, os eosinófilos e células T reguladoras (Treg), presentes no TAB, secretam citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) responsáveis por polarizar os macrófagos do TAB em um fenótipo M2 (anti-inflamatório) mantendo um ambiente tolerogênico (Francisco *et al.*, 2022). Após expansão não saudável dos adipócitos, o TAB se torna disfuncional, tende a sofrer hipóxia, necrose e apoptose e promove a expressão de moléculas quimioatraentes e a infiltração de células imunológicas. Assim, as células T são ativadas, as células Treg suprimidas e o fenótipo M2 polariza para M1 (pró-inflamatório).

Por conseguinte, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , com redução de adiponectina anti-inflamatória. Esse perfil pró-inflamatório está relacionado à resistência insulínica sistêmica e local e modula a função imune hepática, podendo induzir à morte dos hepatócitos (Godoy-Matos *et al.*, 2020; Ferguson *et al.*, 2021; Kaya; Yilmaz, 2022).

Adicionalmente, adipocinas, como leptina e adiponectina, também são fundamentais na regulação da lipogênese hepática e da sensibilidade insulínica, além de serem moduladores do sistema inato e de sistemas imunológicos adaptativos. Logo, quando há um desequilíbrio em sua liberação, devido à obesidade, ocorre inflamação sistêmica de baixo grau, que predispõe o fígado a infiltração progressiva de células imunes, como neutrófilos, monócitos e células T. Essas células podem remodelar o tecido danificado, tendo um papel protetor ou deletério, ao exacerbar a inflamação hepática (Francisco *et al.*, 2022). Essa inflamação prolongada e os danos causados nos hepatócitos ativam as HSC que migram para os locais de lesão no fígado diferenciando-se em miofibroblastos. As HSC produzem colágeno e componentes de lesões fibróticas, o qual pode levar a progressão da MAFLD para NASH com fibrose, um grau grave da doença (Ferguson *et al.*, 2021).

2.2.4 Tratamento

Mesmo sendo uma doença com alta prevalência e de impacto crescente na saúde global, ainda não existem medicamentos ou tratamentos aprovados para MAFLD e NASH. Assim como na obesidade, modificações nos hábitos de vida (dieta e atividade física), focando principalmente na perda considerável de peso, com consequente diminuição da gordura presente no fígado, tem sido a principal abordagem para o tratamento de MAFLD (Raza *et al.*, 2021). Nesse contexto, a restrição calórica, o consumo controlado de carboidratos refinados, gorduras saturadas e proteínas animais é essencial. Incluir alimentos nutritivos como frutas e vegetais é importante, pois eles possuem polifenóis (antioxidantes) que ajudam a prevenir e a reduzir doenças crônicas (Cotrim *et al.*, 2016). A restrição calórica melhora a utilização de energia do organismo, diminuindo danos oxidativos nas células. A redução de carboidratos da dieta reduz a carga glicêmica, melhora a secreção de insulina pelas células beta pancreática e, consequentemente, melhora a resistência insulínica, aumenta o HDL-c e reduz os níveis de TAG e glicose.

Uma dieta com alto teor de gordura (40 a 45%) e baixo teor de carboidratos pode ser eficaz na redução de ALT e insulina sérica (Raza *et al.*, 2021).

Além disso, é necessário manter uma rotina de exercícios físicos, no mínimo 150 minutos por semana, recomendados pela OMS. A atividade física também é determinante no controle metabólico e nota-se que indivíduos obesos, com DM2 e/ou SM, têm comportamento mais sedentário, o que pode predispor a MAFLD. Logo, o aumento na atividade física melhora o metabolismo da glicose e dos AG, controlando a obesidade e auxiliando na redução do risco de DCNT, reduzindo a possibilidade de desenvolver MAFLD. Além disso, essas mudanças, juntamente com a perda de 3 a 6% do peso em seis meses, podem contribuir para a melhora da doença (Abenavoli *et al.*, 2017; Chalasani *et al.*, 2018; Raza *et al.*, 2021).

Apesar de eficazes para o tratamento, mudanças na dieta e no estilo de vida podem não ser suficientes para todos os pacientes, como para aqueles que apresentam grau avançado da doença com fibrose. Nesses casos tratamentos farmacológicos podem ser necessários. Dentre os principais fármacos utilizados estão os sensibilizadores de insulina como tiazolidinedionas e metformina. Antioxidantes como vitamina E e drogas com efeitos antioxidantes como pentoxifilina também têm sido empregadas. Fármacos como GS-0976 e NDI-010976 controlam a síntese de AG em tecidos lipogênicos e as estatinas, medicamentos redutores de colesterol, são utilizadas para melhorar quadros cardiovasculares relacionados à MAFLD, porém, não usuais para o tratamento de MAFLD/NASH. Ainda pode ser utilizados agonistas do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), um hormônio intestinal capaz de reduzir o acúmulo de gordura (Raza *et al.*, 2021).

2.2.5 Modelo experimental de MAFLD

O uso de modelos *in vitro* na pesquisa científica desempenha um papel importante na redução animal, atendendo a princípios éticos. Além disso, diminuem o custo e permitem maior controle experimental e reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, nas últimas décadas, os esforços dedicados à criação desses modelos têm aumentado, contribuindo na investigação de mecanismos moleculares, de processos fisiológicos e patológicos, nos testes de drogas e no desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento (Arzumanian *et al.*, 2021).

Com o aumento da prevalência de MAFLD nos últimos anos, os ensaios *in vitro* em linhagens celulares hepáticas tumorais têm sido amplamente utilizados, principalmente diante da dificuldade em se realizar o cultivo primário de biópsia hepática, o que é invasivo e oneroso. Apesar de não reproduzirem a complexidade do hepatócito *in vivo*, as linhagens tumorais são um modelo simplificado que permite o estudo dos mecanismos subjacentes à doença. Essas linhagens podem ser mantidas em cultura por longos períodos de maneira estável, preservando a expressão de marcadores hepáticos. Existem aproximadamente 40 linhagens de células hepáticas tumorais distintas, sendo as mais utilizadas: HepaRG, SK-Hep-1, Huh7, Hep3B e HepG2 (Arzumianian *et al.*, 2021; Soret *et al.*, 2021).

A linhagem de células HepG2, derivada de hepatoblastoma (HB), foi a primeira a apresentar marcadores críticos de células hepáticas. Em 1980 foi erroneamente designada como uma linhagem de carcinoma hepatocelular pelo Instituto Wistar e, após 30 anos, Lopez-Terrada e colaboradores (2009) a caracterizaram como HB (Arzumianian *et al.*, 2021). Apesar de compartilharem características citológicas com células tumorais, as HepG2 mantêm funções metabólicas semelhantes aos hepatócitos normais como sinalização insulínica, produção de glicogênio, produção e secreção de proteínas plasmáticas, metabolismo de TAG, colesterol e lipoproteínas e síntese de ácidos graxos (Gómez-Lechón *et al.*, 2007; Kanuri; Bergheim, 2013; Ricchi *et al.*, 2009). Além disso, essa linhagem é conhecida por acumular lipídios intracelulares de maneira semelhante aos hepatócitos esteatóticos obtidos de fígado humano com MAFLD, sendo capazes de reproduzir as principais características desse distúrbio. Portanto, são células confiáveis e aceitas como modelo experimental em estudos relacionados ao metabolismo lipídico (Jang *et al.*, 2014; Soret *et al.*, 2021).

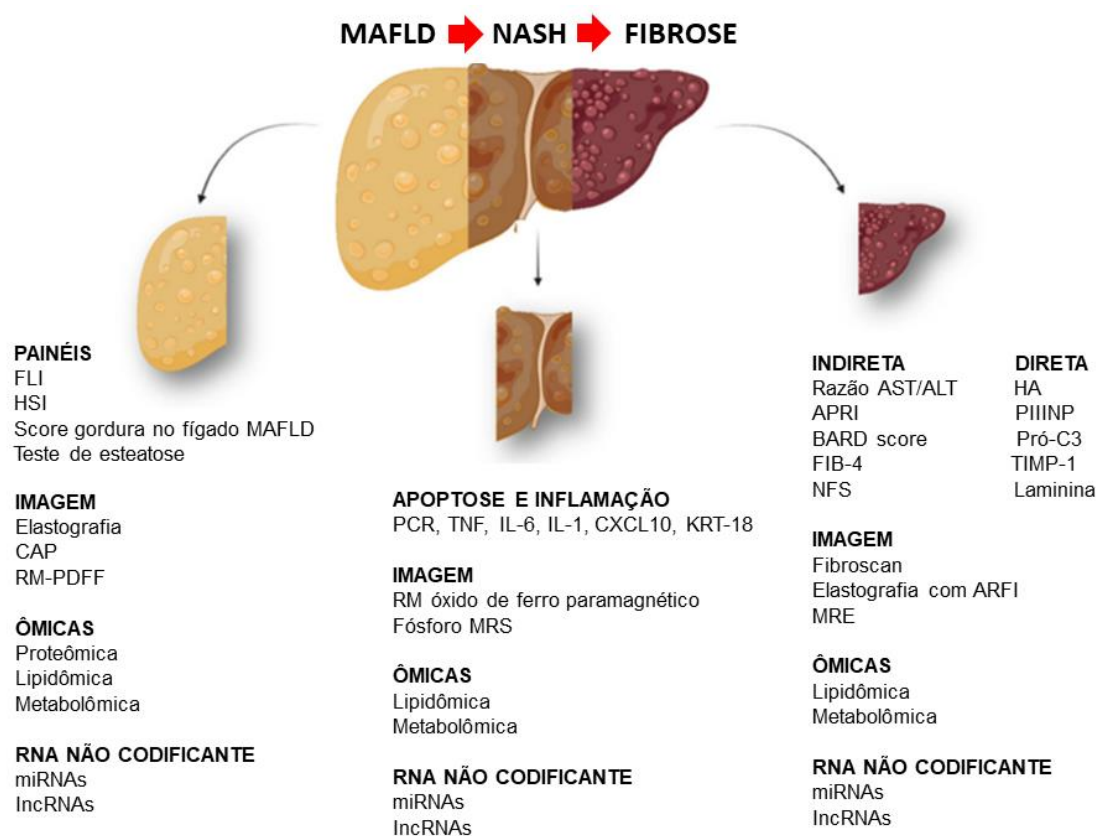
Ricchi *et al.* (2009) observaram que células HepG2 expostas a mistura dos ácidos oleico e palmítico na proporção de 2:1 (1 mM e 2 mM) e a maiores concentrações de ácido oleico isolado (0,66 mM e 1,32 mM) tiveram acúmulo de lipídios significativamente maior, quando comparado a células expostas ao ácido palmítico isolado. Esse acúmulo de lipídios na linhagem HepG2 é uma característica fundamental na caracterização de um modelo de MAFLD viável. Porém, a padronização dessa exposição é fundamental, uma vez que os efeitos biológicos podem ser distintos. As células HepG2 tratadas com oleato ou palmitato por 24 horas, por exemplo, demonstraram acúmulo de gotículas lipídicas, entretanto, o ácido palmítico desencadeou um rápido processo de fragmentação mitocondrial, apresentando gotículas menores e em menor volume (Eynaudi *et al.*, 2021).

Assim, na proporção adequada, a mistura desses dois ácidos graxos provoca um acúmulo de gordura intracelular significativo sem apresentar danos celulares graves em HepG2, se mostrando um ótimo modelo para estudos de MAFLD (Eynaudi *et al.*, 2021). Apesar da semelhança com os modelos apresentados e da quantidade de informações disponíveis acerca da patogênese do acúmulo de TAG, é válido lembrar que os efeitos metabólicos dos ácidos graxos utilizados ainda são pouco conhecidos.

2.3 Biomarcadores

Biomarcadores são moléculas capazes de indicar a presença de alterações biológicas, metabólicas e fisiológicas em função da ocorrência de uma doença, sua progressão ou resposta do organismo a um determinado tratamento (Pearce *et al.*, 2013; Di Mauro *et al.*, 2021). Como a MAFLD é uma condição complexa e multifatorial, biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença são importantes, mas desafiam pesquisadores. Dentre os principais marcadores bioquímicos utilizados estão as enzimas hepáticas (ALT e AST), marcadores inflamatórios (PCR e citocinas inflamatórias), marcadores metabólicos (glicose, insulina, proteínas e lipidograma), biomarcadores do estresse oxidativo (malondialdeído e superóxido dismutase) e por fim, biomarcadores moleculares (Figura 5) (Di Mauro *et al.*, 2021).

Figura 5 – Principais biomarcadores circulantes relacionados à doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). ALT, alanina aminotransferase; APRI, índice de relação AST/plaquetas; ARFI, método impulso de força de radiação acústica; AST, aspartato aminotransferase; BARD score, IMC/ relação AST/ALT/presença de diabetes; CAP, parâmetro de atuação controlada; CXCL10, ligante de quimiocina com motivo C-X-C10; FIB-4, fibrose 4; FLI, índice de gordura no fígado; HA, ácido hialurônico; HSI, índice de esteatose hepática; IL, interleucina; KRT-18, citoqueratina 18; MRE, elastografia por ressonância magnética; MRS, NFS, índice de fibrose MAFLD; PCR, proteína C reativa; PIIINP, colágeno tipo III N-terminal pró peptídeo; Pró-C3, local de clivagem C-terminal do pró-peptídeo de colágeno tipo II N-terminal; RM-PDFF, ressonância magnética densidade de prótons fração de gordura; TNF, fator de necrose tumoral.



Fonte: Adaptado de Di Mauro *et al.*, 2021.

A biópsia hepática costumava ser o padrão-ouro para o diagnóstico de MAFLD, uma vez que permite uma avaliação direta do fígado e a identificação precisa de alterações histológicas, como inflamação e fibrose hepática. Porém, como todo procedimento invasivo apresenta algumas desvantagens e limitações como alto custo, possíveis complicações e erro de amostragem. Exames de imagem como ressonância magnética, tomografia computadorizada e ultrassonografia também têm sido utilizados para detecção de MAFLD, apesar de não apresentarem sensibilidade e especificidade suficientes para o estadiamento da doença. Em alguns casos, a biópsia hepática permanece sendo necessária. Assim, marcadores moleculares são interessantes, necessários e capazes de revolucionar a conduta clínica em relação à doença (Pearce *et al.*, 2013).

A MAFLD é frequentemente considerada uma manifestação hepática da SM, que inclui um conjunto de fatores de risco, como obesidade abdominal, resistência insulínica, HAS e hipercolesterolemia. Dentre as proteínas relacionadas à MAFLD, a Citoqueratina (KRT) 18 já tem sido relatada como biomarcador não invasivo de lesão hepática, sendo considerada uma das principais proteínas dos filamentos intermediários (FI) presentes no fígado com papel importante na manutenção da integridade estrutural das células hepáticas. A detecção de fragmentos clivados de KRT18 no sangue ou tecido hepático é utilizada como biomarcador da apoptose em hepatite, cirrose ou outras doenças do fígado como MAFLD (Feldstein *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2013; Kawanaka *et al.*, 2015; Di Mauro *et al.*, 2021). Assim, a KRT18 tem se mostrado útil para avaliar a extensão do dano hepático e monitorar a progressão da doença. Contudo outros marcadores, incluindo outras citoqueratinas, têm demonstrado um papel preponderante na caracterização molecular de MAFLD.

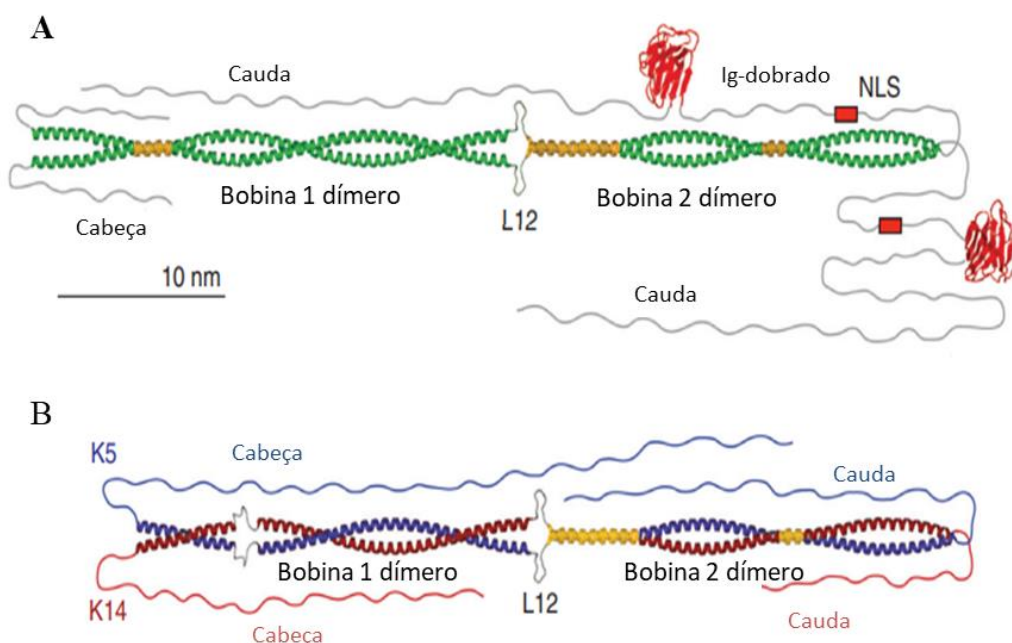
2.4 Citoqueratina 17

A KRT17 também é uma proteína da superfamília dos FI, os quais se agrupam formando o citoesqueleto. As citoqueratinas desempenham papel importante na proteção celular e nas funções estruturais, além de participarem em diferentes processos biológicos. Podem ser classificadas em dois tipos: 28 proteínas ácidas do tipo I e 26 proteínas básicas do tipo II, sendo ambos os tipos expressos em células epiteliais formando heterodímeros. Apesar da KRT17 não estar presente no epitélio maduro normal, é expressa nos apêndices epiteliais (folículos pilosos) e da mucosa, em glândulas sebáceas e outras glândulas, em células-tronco do ectoderma embrionário, no núcleo de queratinócitos e também em carcinomas, além de ter sua expressão induzida após a ocorrência de danos no DNA (Ji *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2019).

As queratinas são codificadas por duas grandes famílias gênicas, sendo 54 genes em humanos e camundongos. A KRT17 é codificada pelo gene de mesmo nome, o qual está localizado no cromossomo 17q21.2. É uma proteína ácida (tipo I), de 48 kDa, responsável pela regulação da proliferação e crescimento celulares (Chen *et al.*, 2022). Como os demais membros da família das queratinas, possui estrutura tripartida composta por 432 aminoácidos: cabeça não-helicoidal (1-83) e haste α -helicoidal (84-120), domínios de cauda não-helicoidal (393-432). A haste é subestruturada em três hélices, 1A (84-120),

1B (139-230) e 2 (251-392). A KRT17 pode formar heterodímeros para montagem dos filamentos de 10 nm, os quais são responsáveis pelo suporte estrutural e integridade da célula (Figura 6) (Jacob *et al.*, 2020; Ji, *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

Figura 6 – Organização estrutural de proteínas dos filamentos intermediários (FI). A Citoqueratina (KRT)17 é uma proteína do tipo I. Possui estrutura tripartida formada por 432 aminoácidos: cabeça não-helicoidal (1-83); haste α -helicoidal (84-392); e domínios de cauda não-helicoidal (393-432). A haste ainda é subestruturada em três hélices, 1A (84-120), 1B (139-230) e 2 (251-392). (A) Modelo estrutural de uma lâmina homodímera e (B) ilustração de uma queratina heterodímera formada por KRT5 e KRT14. Os seguimentos α -hélice em amarelo representam hélices paralelas. L12, seguimento ligante; NLS, sinal de localização nuclear; nm, nanômetros.



Fonte: Adaptado de Hermann; Aebi, 2016.

As proteínas dos FI são encontradas essencialmente no citoplasma, mas já foram localizadas no núcleo e podem se translocar graças à presença de sinais de localização nuclear e de exportação (Zhang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2019). No citoplasma, a KRT17 pode interagir com STAT3 induzindo a proliferação celular. Quando fosforilada, KRT17 se liga a 14-3-3 σ promovendo a divisão celular por meio da ativação da via AKT/mTOR (Zhang *et al.*, 2022). No núcleo, a KRT17 pode regular a expressão gênica e o ciclo celular de células tumorais (Hobbs *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019). Em tumores de pele, a expressão de KRT17 no núcleo impacta na morfologia nuclear e na expressão de citocinas inflamatórias (Hobbs *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2020). Em 2015, Escobar-Hoyos e colaboradores demonstraram que a KRT17, também no núcleo, possibilita a progressão do

ciclo celular ao se ligar e promover a exportação de p27 do núcleo e sua degradação via proteassoma em células tumorais. Além disso, alguns fatores de transcrição podem regular a expressão gênica de *KRT17*, como AP-1 e o homólogo de oncogene associado ao glioma 1/2, assim como as citocinas IFN- γ , IL-17 e IL-22 (Liao *et al.*, 2016). De fato, em condições estressantes como lesões na pele, psoríase e infecções, há uma superexpressão de KRT17 mediada por citocinas pró-inflamatórias (Zhang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

Apesar de hepatócitos expressarem predominantemente KRT8 e KRT18, alguns estudos já demonstraram expressão KRT17 e KRT19 em HepG2 em condições de malignidade (Xu *et al.*, 2009). Estudos recentes também demonstraram que a KRT17 pode estabilizar o metabolismo lipídico em queratinócitos e o aumento na expressão de seus transcritos pode influenciar no acúmulo excessivo de gordura intracelular hepática, causando distúrbios metabólicos (Nian *et al.*, 2023; Pang *et al.*, 2022).

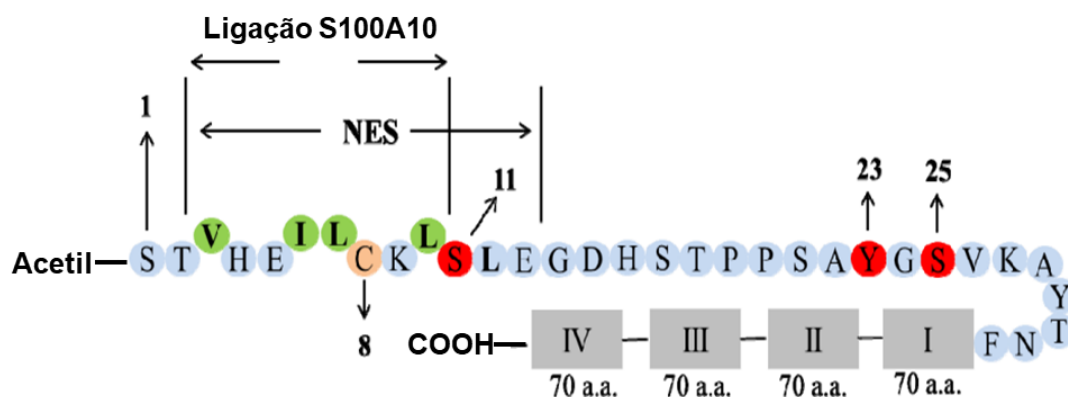
Interessantemente, já foi descrita a interação entre KRT17 e ANXA2. Essas proteínas apresentam regulação mútua e tem sua interação antagonizada através da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no câncer. Foi demonstrado que KRT17 regula ANXA2 ao funcionar como um andaime para a fosforilação de ANXA2 em Tyr-23. Além disso, a ANXA2 regula a estabilidade de KRT17, impedindo sua remodelação pela ativação de EGFR. (Chung *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). Desta forma, a KRT17 se torna interessante no contexto de MAFLD e pode ser alvo de estudos para a descoberta de drogas que atuem na progressão, e consequentemente, na melhora da doença. Considerando sua interação com ANXA2, esta também pode ser uma proteína importante, cuja atuação na MAFLD ainda permanece pouco esclarecida.

2.5 Anexina A2

A ANXA2 é uma proteína celular de 39 kDa codificada pelo gene *ANXA2* localizado no cromossomo 15q22.2. É capaz de se ligar a fosfolipídeos de membrana, sendo regulada por cálcio (Ca^{2+}) (Li *et al.*, 2021; Lim; Hajjar, 2021; Bharadwaj *et al.*, 2021) e se apresentando na forma monomérica, em geral citoplasmática, ou na forma heterotetramérica, onde duas moléculas de ANXA2 são unidas por um dímero da proteína S100A10 (denominada p11), predominantemente membranar (Madureira *et al.*, 2012; Bharadwaj *et al.*, 2021; Lim *et al.*, 2021).

Estruturalmente, todas as anexinas compartilham um domínio C-terminal (extremidade carboxílica) conservado com quatro sequências repetidas de 70 aminoácidos formado por 5 α -hélices incluindo vários sítios de ligação de Ca^{2+} . Esse domínio também está envolvido com sua ancoragem à membrana, com regiões de ligação a fosfolipídeos de carga negativa, heparina, F-actina, RNA e fibrina (Madureira *et al.*, 2012). O domínio N-terminal (extremidade amina) é mais variável entre os tipos de anexinas, ou seja, cada membro da família das anexinas possui um N-terminal específico, responsável por sua função particular na célula. Nele existem sítios de fosforilação como Serina-11 (Ser-11) e Serina-25 (Ser-25) e Tirosina-23 (Tyr-23), um resíduo de cisteína reativo (Cys-8), uma região de ancoragem para a subunidade p11 e uma sequência de exportação nuclear (NES) (Figura 7) (Liu; Vishwanatha, 2007; Madureira *et al.*, 2012; Bharadwaj *et al.*, 2013; Bharadwaj *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

Figura 7 – Organização estrutural da proteína Anexina A2. O domínio N-terminal é o local onde ocorrem modificações pós-transducionais como acetilação (Ser-1) e fosforilação (Ser-11, Tyr-23 e Ser-25). Também estão representados um domínio de ligação a S100A10, uma sequência de exportação nuclear (NES) e um resíduo de cisteína reativo (Cys-8), associado à função redox. No domínio C-terminal existem quatro domínios alfa-helicoidais, cada um contendo 70 aminoácidos. Nesse domínio também estão locais de ligação a fosfolipídeos de carga negativa, heparina, RNA, F-actina, cálcio e fibrina. C-8, cisteína-8; COOH – grupo carboxila; S-1, serina-1; S-11, serina-11; S-25, serina-25; S100A10, proteína A10 de ligação ao cálcio S100; Y-23, tirosina-23.



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

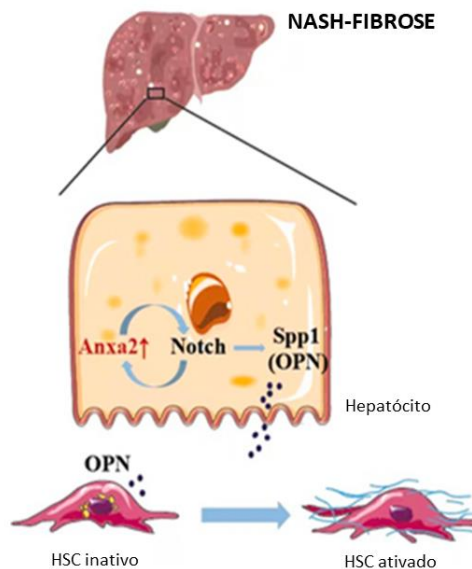
A ANXA2 pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares como citoplasma, membranas de organelas, interior e exterior da membrana plasmática e núcleo, com funções específicas. Sua forma monomérica está distribuída principalmente no citoplasma, enquanto sua forma heterotetramérica está distribuída na membrana plasmática (Lei *et al.*, 2019). Intracelularmente, seu monômero participa da reparação e transporte de

membranas, incluindo exocitose e endocitose, transdução de sinal e rearranjo do citoesqueleto. Além disso, pode interagir com membranas endossomais ricas em colesterol. No núcleo, controla a síntese e reparo de DNA e atua na proliferação celular. A ANXA2 desempenha outras funções como, regulação redox, organização de domínios de membrana, montagem de proteínas e transcrição e transporte de mRNA, onde ambas as formas, monomérica e heterotetramérica, são capazes de se ligar ao mRNA (Bharadwaj *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2022; Lei *et al.*, 2019).

A ANXA2 encontra-se expressa em diversos tipos celulares como células mononucleares e endoteliais, células da medula e células tumorais (Bharadwaj *et al.*, 2021; Wang; Lin, 2014; Mei *et al.*, 2021). Raramente foi detectada em tecidos hepáticos em condições normais, estando superexpressa (em níveis de mRNA e proteína) em casos de HCC (Wang; Lin, 2014). Com base em dados disponíveis eletronicamente, Wang *et al.*, (2022) observaram uma maior expressão de *ANXA2* em pacientes com MAFLD com fibrose hepática mais avançada (estágio 3-4), do que naqueles com fibrose hepática leve (0-1). Além disso, em experimentos com hepatócitos murinos, verificaram que ANXA2 regulou positivamente a expressão do gene *Spp1*, responsável por codificar osteopontina (OPN) sérica e hepática. A OPN ativa HSCs de maneira parácrina e consequentemente aumenta a síntese de colágeno I, promovendo a fibrose hepática (Figura 8). Esses resultados contradizem os apresentados anteriormente por Liao *et al.*, (2022), que concluíram que a expressão reduzida de ANXA2 promoveu ativação de HSCs induzida por TGF- β 1.

A inflamação juntamente com o estresse oxidativo provenientes do acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos possivelmente alteram o comportamento de KRT17 e ANXA2 nessas células. A interação entre as proteínas já foi descrita, sugerindo um *crosstalk* entre as duas na regulação de eventos-chave como a inflamação. Nesse sentido, ainda permanece necessário elucidar o papel dessas proteínas na MAFLD, uma vez que modulam eventos chaves relacionados à gravidade da doença, sendo potencialmente prognósticos ou preditivos no acompanhamento de pacientes (Chung *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019).

Figura 8 – Proposta de mecanismo de regulação da expressão de Anexina A2 (ANXA2) nos hepatócitos que promove fibrose hepática esteato-hepatite não alcoólica (NASH). O aumento na expressão de ANXA2 promove ativação de células estreladas hepáticas (HSCs), através da secreção de OPN (codificado pelo gene *Spp1*) para o meio. Essa via ANXA2-Notch regulada positivamente medeia a interação entre hepatócitos e HSCs promovendo a fibrose hepática em NASH. OPN, osteopontina; *Spp1*, fosfoproteína 1 secretada;



Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, 2022.

CAPÍTULO 2

Modulação da expressão de Anexina A2 e Citoqueratina 17 em modelo celular da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo

Gabriela Tolentino Azevedo^{1,2}, Vinicius Marques Arruda^{1,2}, André Carlos Pereira de Matos¹, Matheus Fernandes da Silva¹, Maria Júlia Maia Gonçalves Granato², Paula Marynella Alves Pereira Lima¹, Raoni Pais Siqueira^{1,2}, Joyce Ferreira da Costa Guerra², Thaise Gonçalves de Araújo^{1,3}

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brasil

²Laboratório de Bioquímica Metabólica e Processos Redox, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, MG, Brasil

³Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlandia-MG, Brasil.

***Autor correspondente:** Thaise G. Araújo, Laboratório de Genética e Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Major Jerônimo, 566, Sala 601, 38700-002, Patos de Minas, MG, Brasil. Telefone: +55 34 38233714. tgaraujo@ufu.br

Resumo

A prevalência da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) tem aumentado expressivamente em todo o mundo, alertando acerca da necessidade de se desenvolver estratégias de diagnóstico e tratamento específicos. De fato, essa doença carece de compreensão acerca de seus mecanismos moleculares e, no presente estudo, foi avaliado o perfil de expressão de Anexina A2 (ANXA2) e Citoqueratina 17 (KRT17) em modelo celular de MAFLD. Inicialmente, foi induzido o acúmulo intracelular de lipídios nas células HepG2 por tratamentos com palmitato isolado a 0,7 mM (P) e com a mistura de ácidos graxos oleico e palmítico a 1 mM (OP1) e a 2 mM (OP2). Após confirmação desse acúmulo com *Oil Red*, a expressão de ANXA2 e KRT17 foi avaliada por qPCR e Western-blotting, assim como os transcritos de *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3* foram quantificados. Todos os tratamentos induziram ao acúmulo de lipídios, mas apenas em OP2 foi significativo o aumento na expressão de mRNA das citocinas e de *ANXA2*. Em nível proteico, a expressão de ANXA2 aumentou apenas no citoplasma, enquanto a KRT17 teve redução significativa no citoplasma e tendência de aumento no núcleo. Portanto, a exposição lipídica aumenta o perfil inflamatório, modulando a expressão de ANXA2 e KRT17. Logo, o eixo citocinas-KRT17/ANXA2 pode ser um alvo promissor na compreensão de distúrbios metabólicos, especialmente MAFLD.

Palavras-chave: Síndrome metabólica; Obesidade; MADFL; Esteatose hepática; Células HepG2; Citoqueratina 17 e Anexina A2.

Introdução

A doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD) é um distúrbio metabólico caracterizado pelo acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos e considerada a doença hepática crônica mais prevalente no mundo. Atinge aproximadamente 25% da população mundial e está intimamente associada à obesidade, sendo que 80 a 90% dos indivíduos obesos apresentam MAFLD. Essas duas condições clínicas estão aumentando paralelamente, acompanhadas por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Kaya; Yalmaz, 2022; Gofton *et al.*, 2023; OMS, 2022).

A MAFLD abrange um espectro amplo de alterações hepáticas, sendo necessárias, para seu diagnóstico, a evidência de esteatose por exames de imagem, análise histológica do fígado ou quantificação de biomarcadores séricos de funcionamento hepático, além de correlação com uma ou mais das seguintes doenças metabólicas: sobrepeso ou obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica (Sakurai *et al.*, 2021; Kaya; Yalmaz, 2022; Gofton *et al.*, 2023). Adicionalmente, não existem medicamentos ou tratamentos aprovados específicos de modo que modificações nos hábitos de vida como dieta e atividade física, focando principalmente na perda considerável de peso, com consequente diminuição da gordura presente no fígado, tem sido a principal abordagem para os pacientes com MAFLD (Raza *et al.*, 2021).

Mesmo sendo uma doença com alta prevalência e de impacto crescente na saúde global, seus mecanismos moleculares não são completamente conhecidos. Nesse contexto, a identificação e caracterização de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença são importantes. A Citoqueratina (KRT) 18 já tem sido relatada como biomarcador não invasivo de lesão hepática, sendo considerada uma das principais proteínas dos filamentos intermediários presentes no fígado com papel importante na manutenção da integridade estrutural das células hepáticas. Recentemente, alguns pesquisadores sugeriram que ANXA2 pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico de MAFLD, esteato-hepatite não alcoólica (NASH) e fibrose hepática (Tavirani *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022). A interação entre ANXA2 e KRT17 também já foi descrita, sugerindo a importância de outras citoqueratinas e um *crosstalk* entre as duas proteínas na regulação de eventos-chave como a inflamação envolvendo diferentes citocinas como *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3* (Chung *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). Interessantemente, a inflamação é um dos *hallmarks* da MAFLD. Portanto, o

objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão de KRT17 e ANXA2 e sua relação com a inflamação em modelo celular de MAFLD, hipotetizando que a sobrecarga lipídica em células hepáticas modula seus transcritos e seus níveis proteicos em resposta ao perfil inflamatório desse distúrbio.

Material e métodos

Cultivo das células da linhagem HepG2

O cultivo das células foi realizado em colaboração com a equipe do Laboratório de Bioquímica (LBq) – UFU. Para isso foram utilizadas células de hepatoblastoma (HepG2), provenientes do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) a 25 mM de glicose, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram mantidas em incubadora umidificada (Thermo Scientific Series 3, Modelo 4111) a 5% de CO₂, a 37 °C, até confluência de, aproximadamente, 80%. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 2 a 3 dias, utilizando a solução de tripsina/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 0,05%.

Indução ao acúmulo de lipídios

Para indução ao acúmulo intracelular de lipídios, as células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços (5 x 10⁵ células/poço) com meio DMEM apropriado por 24 horas para adesão. Posteriormente, foram incubadas com meio DMEM não suplementado e, após outras 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ácidos graxos livres (AGL) de cadeia longa conjugado com albumina sérica bovina (BSA) 4,5% e etanol. Ácido palmítico a 0,7 mM (P) ou a mistura de ácidos oleico e palmítico nas concentrações de 1 (OP1) e 2 mM (OP2) em solução 2:1 foram utilizados. O grupo controle foi tratado com solução veículo contendo DMEM conjugado com BSA e etanol. Após incubação por 24 horas, as células foram coletadas e utilizadas nos ensaios.

Quantificação com Oil Red O e conteúdo lipídico intracelular

A avaliação do conteúdo intracelular de lipídios foi realizada através da fixação das células com paraformaldeído a 4% por 15 minutos. Posteriormente foi adicionada a solução *Oil Red O* (ORO) mantida por 50 minutos a temperatura ambiente. Lavagens com água destilada foram realizadas para remoção do excesso de corante e os lipídios foram solubilizados em 500 µL de isopropanol sob agitação por 30 minutos. Foi realizada a quantificação por espectrofotometria no comprimento de onda de 510nm. Para melhor visualização dos núcleos as células também foram coradas com hematoxilina, as lâminas foram visualizadas em microscopia ótica (Thermo Scientific Invitrogen, Modelo Evos XL Core) e as fotos capturadas em ampliação de 200x.

Quantificação dos transcritos por RT-qPCR em tempo real

O RNA total foi extraído de todos os grupos do estudo utilizando Trizol Reagent® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Sua concentração e pureza foram verificadas em espectrofotômetro (NanoDrop Lite - Thermo Scientific) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1µg do RNA total utilizando o kit *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT), conforme protocolo sugerido pelo fornecedor. A PCR em tempo real (qPCR) foi otimizada para os genes citoqueratina 17 (*KRT17*), anexina A2 (*ANXA2*), interleucina 1-beta (*IL1β*), interleucina 17 (*IL17*), interleucina 22 (*IL22*), fator de crescimento transformador beta (*TGF-β*), interleucina 6 (*IL-6*) e Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (*STAT3*) após a transcrição reversa. A reação de amplificação foi preparada utilizando o kit SYBR®Green (Applied Biosystems) contendo: máster mix, H₂O ultrapura, *primers* e cDNA para um volume final de 10µl. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas em aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems). Os *primers* encontram-se descritos na Tabela 2 e o gene Beta-2-Microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência para a aplicação do método Cq comparativo (Araújo *et al.*, 2014).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados e condições das reações de qPCR para os alvos do presente estudo.

Primer	Sequência 5' para 3'	Amplicon (pb)
<i>KRT17</i> forward	CTGATGACTTCCGCACCAAGTT	234
<i>KRT17</i> reverse	CAGCGTCCATCTCCACATTG	
<i>ANXA2</i> forward	TGACCAAGATGCTCGGGATC	113
<i>ANXA2</i> reverse	TTTCTGGAGGTGGGGCA	
<i>IL1β</i> forward	CAGGATATGGAGCAACAAGTGG	136
<i>IL1β</i> reverse	GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	
<i>IL17</i> forward	CAATCCCACGAAATCCAGGATG	156
<i>IL17</i> reverse	GGTGGAGATTCCAAGGTGAGG	
<i>IL22</i> forward	CTGATAACAACACAGACGTTTCG	170
<i>IL22</i> reverse	CCACCTCCTGCATATAAGGC	
<i>TGFβ</i> forward	GTACCTGAACCCGTGTTGCTC	107
<i>TGFβ</i> reverse	CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGG	
<i>IL6</i> forward	GATTCCAAAGATGTAGCCGCC	242
<i>IL6</i> reverse	ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	
<i>STAT3</i> forward	GAATCTCAACTTCAGACCCGTCA	160
<i>STAT3</i> reverse	GCTCCACCACAAAGGCACTT	
<i>B2M</i> forward	AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA	94
<i>B2M</i> reverse	TGTTGATGTTGGATAAGAGAA	

Western blotting

Os extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares das células HepG2 foram extraídos utilizando o kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976). Posteriormente, 20 μ g dos extratos proteicos foram resolvidos por SDS-PAGE a 12% (BIO-RAD Mini-protean Tetra cell). As frações proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m (BIO-RAD Laboratories) para detecção de KRT17 e ANXA2. Procedeu-se a incubação com os anticorpos primários anti-KRT17 (1:1000 - Sigma Aldrich) e anti-ANXA2 (1:2000 – Life Technologies) a 4° C *overnight*. Anti- β -actina (1:3000 - Sigma Aldrich) e anti-lamina B2 (1:8000 - Proteintech) foram utilizados como controles de marcação de extratos

citoplasmático e nuclear, respectivamente, à temperatura ambiente por 1 h. Como anticorpos secundários foram utilizados anti-camundongo (Sigma Aldrich) e anti-coelho (Santa Cruz Biotech), ambos marcados com peroxidase e diluídos a 1:5000 em tampão bloqueio. Em seguida realizou-se detecção das bandas por ECL e análise densiométrica.

Análises estatísticas

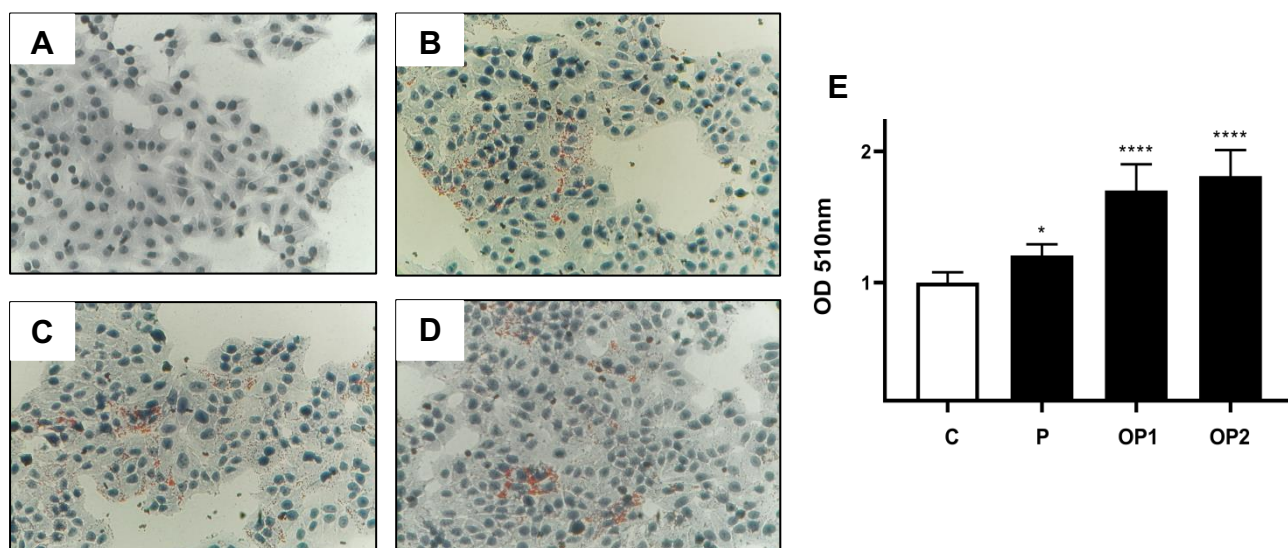
Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism 8.0.1* (San Diego, Califórnia, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste *Kolmogorov–Smirnov*. Em seguida foi aplicado o Test-t de *Student* e ANOVA com pós-teste de Tukey para dados paramétricos e o Teste de *Mann-Whitney* para os não paramétricos. Para todos os resultados foi adotado o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Resultados

Acúmulo de lipídeos em linhagem HepG2

Após o tratamento das células HepG2 com as misturas de diferentes concentrações de palmitato isolado (0,7 mM) e ácidos oleico e palmítico (1,0 mM e 2,0 mM), foi observado o acúmulo intracelular de lipídios (Figura 1). Foram identificadas gotículas lipídicas com coloração avermelhada acumuladas no citoplasma das células de todos os tratamentos, o que não ocorreu naquelas tratadas apenas com o veículo (Figura 1A-D). Além disso, verificou-se um aumento significativo da densidade óptica relativa das células tratadas, principalmente nos grupos OP1 e OP2, corroborando o fenótipo esteatótico dessa linhagem a partir das doses utilizadas (Figura 1E). Como esperado, as células do grupo controle apresentaram níveis quase ausentes de lipídeos intracelulares. O modelo foi previamente validado quanto aos marcadores de estresse oxidativo (Arruda *et al.*, 2023).

Figura 1. Fotomicrografias representativas da coloração com *Oil Red O* e Hematoxilina de Meyer em células HepG2. (A) Células tratadas apenas com veículo (DMEM conjugado com albumina sérica bovina contendo etanol). (B) Células expostas à sobrecarga lipídica por 24 horas com ácido palmítico a 0,7 mM (C) Células expostas à sobrecarga lipídica por 24 horas com mistura de ácidos oleico e palmítico a 1,0 mM (2:1). (D) Células expostas à sobrecarga lipídica por 24 horas com mistura de ácidos oleico e palmítico a 2,0 mM (2:1). (E) Quantificação da densidade óptica de lipídeos intracelulares a 510 nm após coloração com *Oil Red O*. Ampliação de 200x. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=8). O * representa diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$. C, controle; P, Palmitato a 0,7 mM; OP1, Oleato e Palmitato a 1,0 mM (2:1); OP2, Oleato e Palmitato a 2,0 mM (2:1).

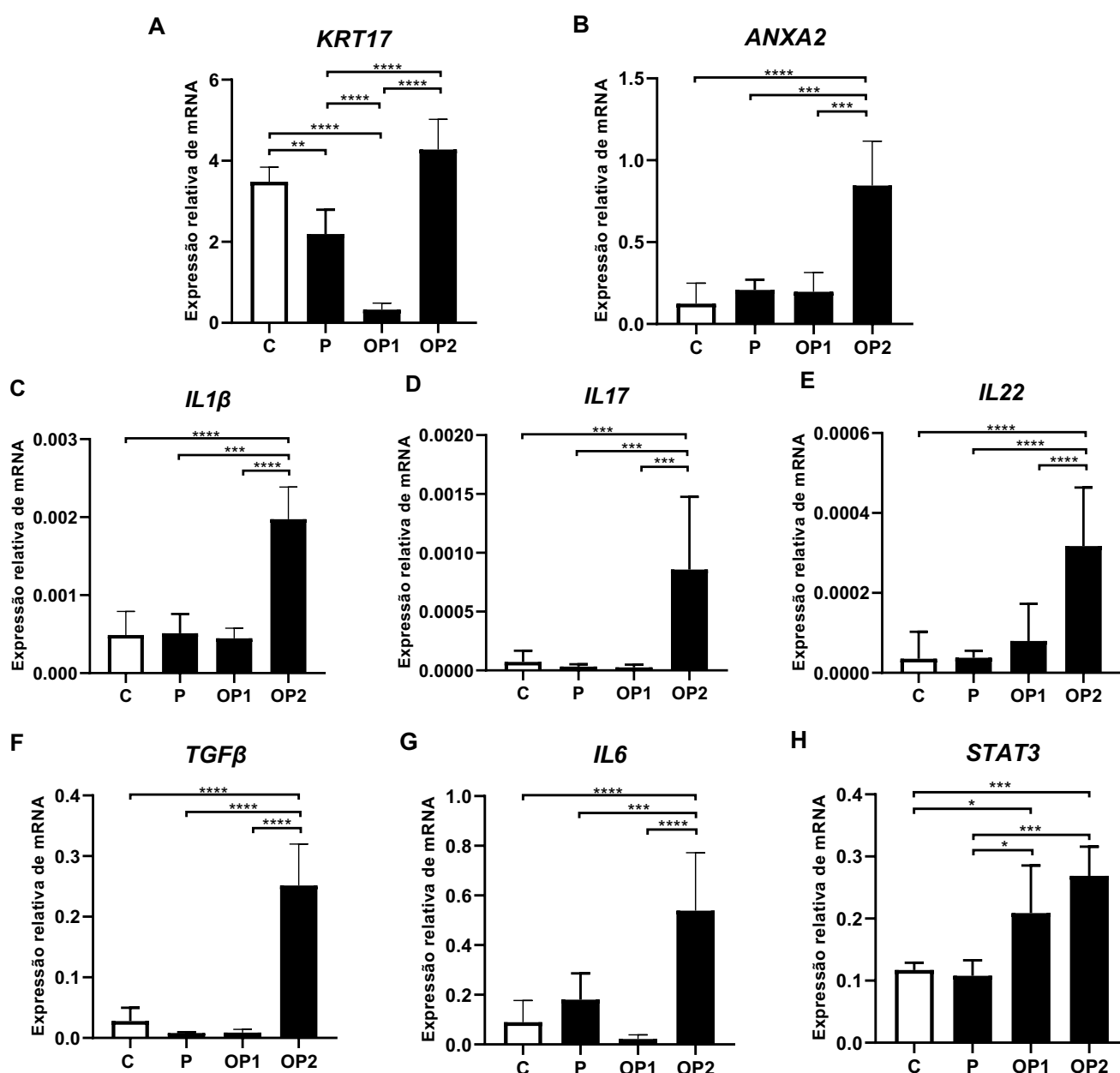


Quantificação relativa dos níveis de mRNA

Neste estudo, os transcritos dos genes *KRT17*, *ANXA2*, *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3* foram quantificados (Figura 2). Entre os tratamentos analisados, o grupo OP2 diferiu do controle para todos os alvos analisados, com exceção de *KRT17*, que diminuiu significativamente em P e OP1, com tendência de aumento em OP2. Considerando que a expressão de *KRT17* é regulada por citocinas inflamatórias (Yang *et al.*, 2019), os transcritos de *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3* também foram analisados e se mostraram significativamente aumentados em OP2, evidenciando, neste grupo, um

processo inflamatório associado à MAFLD. Além disso, nossos resultados também destacam o papel desses mediadores no aumento da expressão de *ANXA2*.

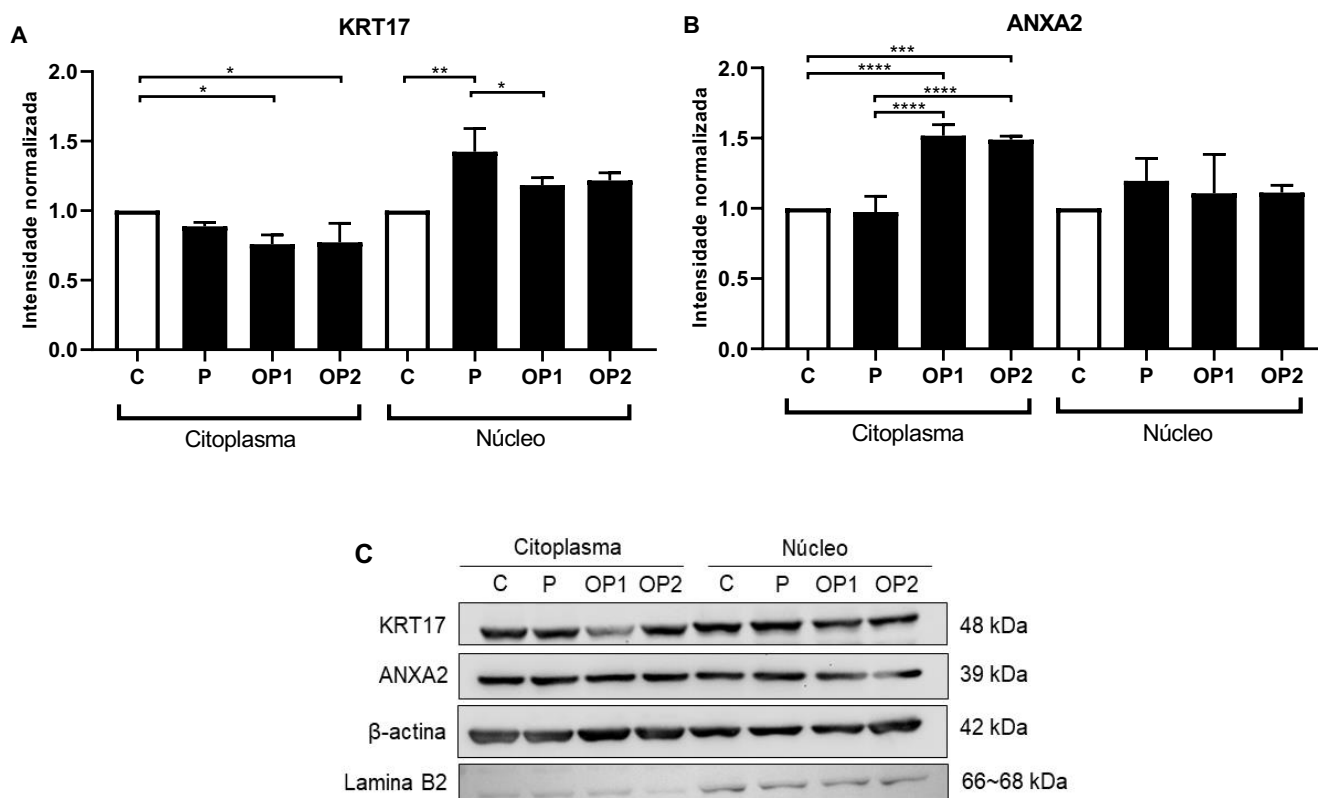
Figura 2. Ensaios de qPCR conduzidos em modelo celular de doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). (A) *KRT17*, Citoqueratina 17; (B) *ANXA2*, Anexina A2; (C) *IL1 β* , Interleucina 1-beta; (D) *IL17*, Interleucina 17; (E) *IL22*, Interleucina 22; (F) *TGF β* , Fator de crescimento transformador beta; (G) *IL6*, Interleucina 6; (H) *STAT3*, Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=8). O * representa diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$. C, controle; P, Palmitato a 0,7 mM; OP1, Oleato e Palmitato a 1,0 mM (2:1); OP2, Oleato e Palmitato a 2,0 mM (2:1).



Níveis proteicos e localização celular

O ensaio de *Western Blotting* foi realizado para avaliar a expressão das proteínas KRT17 e ANXA2 (Figura 3). Após acúmulo de lipídios, nos grupos OP1 e OP2, a KRT17 diminuiu sua expressão no citoplasma, com tendência de aumento no núcleo (Figura 3A), o que sugere sua translocação. No grupo P foi observada uma maior expressão nuclear de KRT17 (Figura 3A). Em OP2 e OP1, houve um aumento dos níveis de ANXA2 no citoplasma, sem diferença em sua expressão no núcleo (Figura 3B).

Figura 3. Expressão e localização das proteínas Citoqueratina 17 (KRT17) e Anexina A2 (ANXA2) em modelo celular de doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). (A) KRT17, (B) ANXA2 e (C) Recorte do *Western-blotting* evidenciando a expressão dos alvos no núcleo e citoplasma de células HepG2 tratadas. β -actina e Lâmina B2 foram utilizadas como controles de marcação para os extratos citoplasmáticos e nucleares, respectivamente. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=6). O ** representa diferença significativa em relação ao grupo controle com $p < 0,01$. C, controle; P, Palmitato a 0,7 mM; OP1, Oleato e Palmitato a 2:1 (1,0 mM); OP2, Oleato e Palmitato 2:1 (2,0 mM).



Discussão

A MAFLD representa um problema de saúde pública em todo o mundo, de modo que seu diagnóstico precoce viabiliza uma intervenção mais assertiva, reduzindo o risco de complicações hepáticas graves, como hepatocarcinoma ou a necessidade de transplante de fígado. Nesse sentido, a caracterização de novos biomarcadores utilizando modelos celulares fornece *insights* valiosos sobre os eventos moleculares associados à MAFLD (Clare *et al.*, 2022; Godoy-Matos *et al.*, 2020). O presente estudo objetivou determinar o papel de KRT17 e ANXA2 nessa doença, enquanto potencialmente promissores no manejo dos pacientes.

Na dieta ocidental, o palmitato e o oleato são as formas de ácidos graxos mais consumidos pela população. Após absorção intestinal, eles são esterificados em triacilgliceróis (TAG) e entregues ao fígado que os distribui para outros órgãos. Logo, TAG hepáticos são abundantes tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pacientes com quadro de MAFLD. Trabalhos prévios utilizaram a mistura desses ácidos graxos em diferentes concentrações para indução de esteatose em células HepG2 (Eynaudi *et al.*, 2021; Jang *et al.*, 2014; Ricchi *et al.*, 2009), confirmando que a exposição dessa linhagem a maiores dosagens de ácidos graxos por 24 horas, como na proporção 2:1 utilizada também em nossos modelos (OP1 e OP2), proporciona maior acúmulo de lipídeos, se mostrando como um modelo viável de MAFLD. Porém, apesar da quantidade de informações disponíveis para a patogênese do acúmulo de TAG, é válido lembrar que os efeitos metabólicos dos ácidos graxos ainda não são completamente elucidados, o que reforça a importância de se caracterizar novos marcadores e de se estabelecer sua associação com MAFLD (Eynaudi *et al.*, 2021).

O papel das proteínas ANXA2 e KRT17 ainda é pouco compreendido nessa doença e em seus diferentes estágios. No modelo OP2, os transcritos de *ANXA2* aumentaram após exposição lipídica e observamos uma nítida tendência de aumento na expressão de *KRT17*. Portanto, mesmo que ANXA2 e KRT17 sejam proteínas modificadas pós-traducionalmente (Grindheim *et al.*, 2017; Jacob *et al.*, 2020), ocorreu uma nítida modulação de sua expressão em nível de mRNA. Na literatura já é demonstrada a relação entre ANXA2 e processos inflamatórios crônicos, incluindo obesidade, com diminuição do acúmulo de lipídeos após o silenciamento de ANXA2 (Feng *et al.*, 2022; Mei *et al.*, 2021; Tavirani *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Nossos resultados evidenciam essa relação e encontram-se

alinhados aos apresentados, recentemente, por Wang e colaboradores (2022), que relataram maiores níveis do mRNA de *ANXA2* em pacientes com MAFLD com fibrose hepática mais avançada (estágio 3-4), quando comparados àqueles com fibrose hepática leve (0-1). Além disso, a superexpressão de *ANXA2* promoveu fibrose hepática em murinos (Wang *et al.*, 2022).

Interessantemente, observamos, no nosso estudo, que, nos fenótipos esteatóticos OP1 e OP2, há um aumento na expressão de *ANXA2* no citoplasma, sem diferenças nos níveis dessa proteína no núcleo. Assim, sugerimos que lipotoxicidade induzida pelo excesso de lipídeos em nosso modelo induz o estresse oxidativo e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumentando os níveis transcricionais e proteicos de *ANXA2* para que seja fosforilada em Tyr23 e transloque para o núcleo como resposta protetora aos danos ao DNA. Contudo, os níveis excessivos de ERO defosforilam *ANXA2* em Tyr23 (Grindheim *et al.*, 2016) o que explica seu acúmulo no citoplasma, não alterando sua expressão nuclear.

Já foi descrita a interação entre *ANXA2* e *KRT17*, de modo que a *KRT17* também regula a fosforilação de *ANXA2* em Tyr-23 e, a regulação negativa de *KRT17* pode influenciar na diminuição dessa fosforilação, necessária para translocação de *ANXA2* para o núcleo. De fato, foi observado uma menor expressão de *KRT17* no citoplasma, o que poderia comprometer a translocação de *ANXA2* para núcleo. Além disso, a *ANXA2* controla a estabilidade de *KRT17*, sendo um potencial regulador dos filamentos de citoqueratina (Chung *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019). Na MAFLD, Nian *et al.*, (2023) identificaram regulação positiva de *KRT17* em células HepG2 tratadas com oleato e palmitato e Chen *et al.*, (2022) também observaram a expressão de *KRT17* significativamente maior em tecidos hepáticos com fibrose de humanos e camundongos, comparando com tecidos normais. Nossos resultados apontaram uma tendência de aumento nos transcritos de *KRT17* no grupo OP2, enquanto reduziu significativamente em P e OP1. Porém, em relação aos níveis proteicos, foi verificado o mesmo padrão em todos os grupos, em que a expressão de *KRT17* reduziu no citoplasma, com uma nítida tendência de aumento no núcleo de nossos modelos. De fato, *KRT17* pode ser encontrada no núcleo também em resposta a danos no DNA, modulando a expressão gênica associada à inflamação, arquitetura nuclear e proliferação (Jacob *et al.*, 2020; Nair *et al.*, 2021).

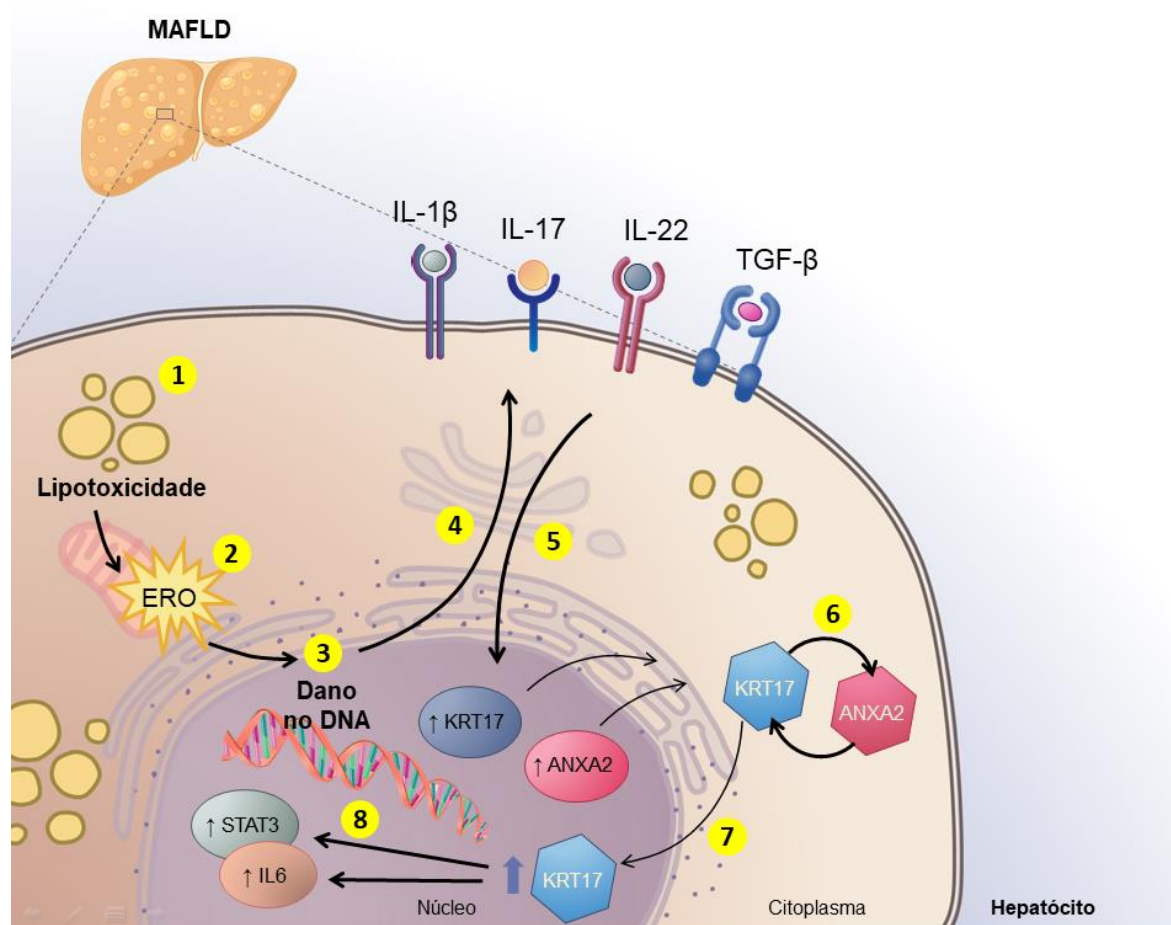
A degeneração dos adipócitos induz a liberação de gotículas lipídicas no espaço extracelular e ativa a resposta imune e, na obesidade, ocorre o acúmulo de células imunes e

inflamatórias nos adipócitos (Mei *et al.*, 2021). Assim, a inflamação, juntamente com o estresse oxidativo, podem modular a expressão e o comportamento de ANXA2 e KRT17 em células esteatóticas. De fato, no presente estudo, verificamos no grupo OP2 a regulação positiva em todos os transcritos pró-inflamatórios (*IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3*) quando comparados com grupo controle. Os outros tratamentos não tiveram alterações significativas, ocorrendo aumento apenas na expressão de *STAT3* no tratamento esteatótico OP1, quando comparado ao grupo controle. Estudo de Yang *et al.*, (2019) sugere uma conexão entre a ubiquitinação da KRT17, a ativação de STAT3 e a proliferação celular em queratinócitos de psoríase.

Yang *et al.* (2019) também demonstraram que IL-1 β , IFN- γ , IL17, IL22 e TGF- β regulam a expressão de *KRT17* em queratinócitos da epiderme com psoríase, propondo uma visão do complexo mecanismo envolvido na regulação dessa citoqueratina. As citocinas IL17, IL22 e TGF- β se ligam a seus receptores específicos na membrana da célula alvo, o que desencadeia a ativação de vias a jusante como JAK ou Ras/Raf/MEK, a posterior ativação de STAT1/3 e a transcrição de *KRT17*. IL-1 β , ativado por IFN- γ , se liga à região GAS no promotor do gene *KRT17*, também induzindo sua expressão (Chen *et al.*, 2022; Shetty *et al.*, 2017).

Portanto, sugerimos que a *ANXA2* e *KRT17* sejam reguladas positivamente em MAFLD e podem ser considerados genes críticos envolvidos nos diferentes estágios da doença. Propomos, diante dos resultados aqui apresentados, que o estresse oxidativo decorrente da exposição lipídica aumenta os níveis das citocinas pró-inflamatórias *IL1 β* , *IL17*, *IL22* e *TGF β* , as quais sinalizam para o aumento na expressão dos transcritos de *KRT17* e *ANXA2*. Contudo, há uma diminuição de KRT17 no citoplasma, comprometendo a fosforilação de ANXA2 que não transloca para o núcleo. Já, KRT17 aumenta sua expressão nuclear promovendo a transcrição de outros genes, como *STAT3* e *IL6*, sustentando um loop inflamatório crônico característico da MAFLD (Figura 4).

Figura 4. Regulação de Citoqueratina 17 (KRT17) e Anexina A2 (ANXA2) na doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). (1) A Lipotoxicidade causada pela exposição lipídica aumentada nas células HepG2 (2) gera estresse oxidativo devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (3) que causa danos ao DNA o que (4) regula positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*IL1 β* , *IL17*, *IL2* e *TGF β*) (5) que sinalizam para o aumento na expressão de *KRT17* e *ANXA2*. (6) Após a tradução de suas proteínas, KRT17 e ANXA2 se associam, regulando-se mutuamente (7) ocorrendo a translocação de KRT17 para o núcleo. (8) No núcleo, a KRT17 promove a transcrição de genes, como *STAT3* e *IL6*, sustentando um loop inflamatório crônico característico da MAFLD.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflitos de interesse: Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

Referências

ARAUJO, T. G.; MARANGONI, K.; ROCHA, R. M.; MAIA, Y. C.; ARAUJO, G. R.; ALCÂNTAR, T. M.; ALVES, P. T.; CALÁBRIA, L.; NEVES, A. F.; SOARES, F. A.; GOULART, L. R. Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: a transcriptional disequilibrium. **Acta histochemica**, v. 116, n. 7, p. 1178-1184, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.06.008>

ARRUDA, V. M. **Estresse oxidativo, inflamação e apoptose em modelo in vitro da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo**. 2023. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2023.

ARZUMANIAN, V. A.; KISELEVA, O. I.; POVERENNAYA, E. V. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13135. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

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. 1, p. 328-357, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.29367>

CHEN, J.; LIU, Y.; XIA, S.; YE, X.; CHEN, L. Annexin A2 (ANXA2) regulates the transcription and alternative splicing of inflammatory genes in renal tubular epithelial cells. **BMC Genomics**, v.23, n. 1, p. 544, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08748-6>

CHEN, J.; GE, S. J.; FENG, H. J.; WU, S. Z.; JI, R.; HUANG, W. R.; HUANG, W.; LU, C. H. KRT17 promotes the activation of HSCs via EMT in liver fibrosis. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 207-218, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00101>

CHUNG, B. M.; MURRAY, C. I.; VAN EYK, J. E.; COULOMBE, P. A. Identification of novel interaction between annexin A2 and keratin 17: evidence for reciprocal regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7573-7581. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301549>

CLARE, K.; DILLON, J. F.; BRENNAN, P. N. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 5, p. 939-946, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00067>

CUI, W.; CHEN, S. L.; HU, K. Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. **American Journal of Translational Research**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2010.

EYNAUDI, A.; DÍAZ-CASTRO, F.; BÓRQUEZ, J. C.; BRAVO-SAGUA, R.; PARRA, V.; TRONCOSO, R. Differential effects of oleic and palmitic acids on lipid droplet-mitochondria interaction in the hepatic cell line HepG2. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.775382>

FENG, Y.; LI, W.; WANG, Z.; ZHANG, R.; LI, Y.; ZANG, L.; WANG, P.; LI, Z.; DONG, Y. The p-STAT3/ANXA2 axis promotes caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p.497. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03692-1>

GODOY-MATOS, A. F.; JÚNIOR, W. S. S.; VALERIO, C. M. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. **Diabetology e Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 60, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>

GOFTON, C.; UPENDRAN, Y.; ZHENG, M. H.; GEORGE, J. MAFLD: How is it different from NAFLD? **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 29, p. S17-S31, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0367>

GRINDHEIM, A. K.; HOLLÅS, H.; RADDUM, A. M.; SARASTE, J.; VEDELER, A. Reactive oxygen species exert opposite effects on Tyr23 phosphorylation of the nuclear and cortical pools of annexin A2. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 2, p. 314-328, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.173195>

GRINDHEIM, A. K.; SARASTE, J.; VEDELER, A. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, v.1861, n. 11, p. 2515–2529, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>

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. 11963-80. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>

KAYA, E.; YILMAZ, Y. Metabolic-associated Fatty Liver Disease (MAFLD): A Multi-systemic Disease Beyond the Liver. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 329-338, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00178>

JACOB, J. T.; NAIR, R. R.; POLL, B. G.; PINEDA, C. M.; HOBBS, R. P.; MATUNIS, M. J.; COULOMBE, P. A. Keratin 17 regulates nuclear morphology and chromatin organization. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 20, p. jcs254094, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.254094>.

JANG, E.; SHIN, M. H.; KIM, K. S.; KIM, Y.; NA, Y. C.; WOO, H. J.; KIM, Y.; LEE, J. H.; JANG, H. J. Anti-lipoapoptotic effect of Artemisia capillaris extract on free fatty acids-induced HepG2 cells. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, p. 253, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-253>

LI, D. W.; QI, X. D.; ZHANG, C. H.; SUN, W. P. Annexin A2 degradation contributes to dopaminergic cell apoptosis via regulating p53 in neurodegenerative conditions. **Neuroreport**, v. 32, n. 15, p. 1263-1268, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001721>

LI, Z.; YU, L.; HU, B.; CHEN, L.; JV, M.; WANG, L.; ZHOU, C.; WEI, M.; ZHAO, L. Advances in cancer treatment: a new therapeutic target, Annexin A2. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 12, p. 3587-3596, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.55173>

MEI, J.; YANG, R.; YANG, Q.; WAN, W.; WEI, X. Proteomic screening identifies the direct targets of chrysin anti-lipid depot in adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113361>

NAIR, R. R.; HSU, J.; JACOB, J. T.; PINEDA, C. M.; HOBBS, R. P.; COULOMBE, P. A. A role for keratin 17 during DNA damage response and tumor initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2020150118>

NIAN, F.; ZHU, C.; JIN, N.; XIA, Q.; WU, L.; LU, X. Gut microbiota metabolite TMAO promoted lipid deposition and fibrosis process via KRT17 in fatty liver cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 669, p. 134-142, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.05.041>

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Obesity**. Geneva: WHE, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1. Acesso em: 24 Abr. 2022.

RAZA, S.; RAJAK, S.; UPADHYAY, A.; TEWARI, A.; ANTHONY SINHA, R. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 26, n. 2, p. 206-237, 2021. DOI: <https://doi.org/10.2741/4892>

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: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>

SAKURAI, Y.; KUBOTA, N.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22084156>

SHETTY, P.; PATIL, V. S.; MOHAN, R.; D'SOUZA, L. C.; BARGALE, A.; PATIL, B. R.; DINESH, U. S.; HARIDAS, V.; KULKARNI, S. P. Annexin A2 and its downstream IL-6 and HB-EGF as secretory biomarkers in the differential diagnosis of Her-2 negative breast cancer. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 4, p. 463-471, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/0004563216665867>

SORET, P. A.; MAGUSTO, J.; HOUSSET, C.; GAUTHERON, J. *In Vitro* and *In Vivo* Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 36, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10010036>

TAVIRANI, R. M.; TAVIRANI, R. M.; AZODI M. Z. ANXA2, PRKCE, and OXT are critical differentially genes in Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 12, n. 2, p. 131-137, 2019.

WANG, C.; LIN, C. Annexin A2: Its Molecular Regulation and Cellular Expression in Cancer Development. **Disease Markers**, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/308976>

WANG, G.; DUAN, J.; PU, G.; YE, C.; LI, Y.; XIU, W.; XU, J.; LIU, B.; ZHU, Y.; WANG, C. The Annexin A2-Notch regulatory loop in hepatocytes promotes liver fibrosis in NAFLD by increasing osteopontin expression. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**, v. 1868, n. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166413>

WANG, Y.; CHENG, Y. S.; YIN, X. Q.; YU, G.; JIA, B. L. Anxa2 gene silencing attenuates obesity-induced insulin resistance by suppressing the NF-κB signaling pathway. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 316, n. 2, p. C223-C234, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00242.2018>

WGO - World Gastroenterology Organisation. **NAFLD & NASH**. Milwaukee: WGO, 2022. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/nafl-d-nash>. Acesso em: 24 Abr. 2022.

YANG, L.; ZHANG, S.; WANG, G. Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses. **Journal of Pathology**, v. 247, n. 2, p. 158-165, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.5178>

CONCLUSÃO

Todos os tratamentos realizados com a linhagem de células HepG2 induziram um aumento significativo de gotículas de gordura intracelulares em relação ao grupo controle, sendo modelos experimentais eficientes em induzir células esteatóticas, principal característica de MAFLD. No tratamento OP2, identificamos um aumento nos transcritos de *KRT17* e *ANXA2* e a translocação para o núcleo de KRT17, evidenciando um intrincado mecanismo molecular associado à MAFLD, em especial à inflamação, uma vez que foi detectado um aumento na expressão de inflamatórios *IL1 β* , *IL17*, *IL22*, *TGF β* , *IL6* e *STAT3*. Assim, o eixo citocinas - KRT17/ANXA2 pode ser um alvo promissor na compreensão de distúrbios metabólicos, especialmente MAFLD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAVOLI, L.; GRECO, M.; MILIC, N.; ACCATTATO, F.; FOTI, D.; GULLETTA, E.; LUZZA, F. Effect of Mediterranean Diet and Antioxidant Formulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Study. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 870, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu9080870>

ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. 3. ed. São Paulo: Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009.

AHMED, B.; SULTANA, R.; GREENE, M. W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>

ARAUJO, T. G.; MARANGONI, K.; ROCHA, R. M.; MAIA, Y. C.; ARAUJO, G. R.; ALCÂNTAR, T. M.; ALVES, P. T.; CALÁBRIA, L.; NEVES, A. F.; SOARES, F. A.; GOULART, L. R. Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: a transcriptional disequilibrium. **Acta histochemica**, v. 116, n. 7, p. 1178-1184, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.06.008>

ARRUDA, V. M. **Estresse oxidativo, inflamação e apoptose em modelo in vitro da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo**. 2023. 79 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2023.

ARZUMANIAN, V. A.; KISELEVA, O. I.; POVERENNAYA, E. V. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 13135. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

BALTIERI, L.; CHAIM, E. A.; CHAIM, F. D. M.; UTRINI, M. P.; GESTIC, M. A.; CAZZO, E. Correlation between nonalcoholic fatty liver disease features and levels of adipokines and inflammatory cytokines among morbidly obese individuals. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 3, p. 247-251, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-2803.201800000-62>

BELLENTANI, S.; SCAGLIONI, F.; MARINO, M.; BEDOGNI, G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive Diseases**, v. 28, n.1, p. 155-161, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1159/000282080>

BHARADWAJ, A.; BYDOUN, M.; HOLLOWAY, R.; WAISMAN, D. Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6259-6305, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms14036259>

BHARADWAJ, A.; KEMPSTER, E.; WAISMAN, D. M. The Annexin A2/S100A10 Complex: The Mutualistic Symbiosis of Two Distinct Proteins. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1849, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11121849>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, [s.n.], p. 248–254, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRASIL. IBGE. **Pesquisa Nacional de Saúde**, 2019. Disponível em: <https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2021/07/Pesquisa-Nacional-de-Saude-2019.pdf>. Acesso em: 24 Abr. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**, 2019. Disponível em: https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2021/07/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco-1-2.pdf. Acesso em: 24 Abr. 2022.

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. 1, p. 328-357, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.29367>

CHAO, H. W.; CHAO, S. W.; LIN, H.; KU, H. C.; CHENG, C. F. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 298, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20020298>

CHENG, L.; WANG, J.; DAI, H.; DUAN, Y.; AN, Y.; SHI, L.; LV, Y.; LI, H.; WANG, C.; MA, Q.; LI, Y.; LI, P.; DU, H.; ZHAO, B. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 48-65, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1870060>

CHEN, J.; LIU, Y.; XIA, S.; YE, X.; CHEN, L. Annexin A2 (ANXA2) regulates the transcription and alternative splicing of inflammatory genes in renal tubular epithelial cells. **BMC Genomics**, v.23, n. 1, p. 544, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08748-6>

CHEN, J.; GE, S. J.; FENG, H. J.; WU, S. Z.; JI, R.; HUANG, W. R.; HUANG, W.; LU, C. H. KRT17 promotes the activation of HSCs via EMT in liver fibrosis. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 207-218, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00101>

CHUA, D.; LOW, Z. S.; CHEAM, G. X.; NG, A. S.; TAN, N. S. Utility of Human Relevant Preclinical Animal Models in Navigating NAFLD to MAFLD Paradigm.

International. **Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232314762>

CHUNG, B. M.; MURRAY, C. I.; VAN EYK, J. E.; COULOMBE, P. A. Identification of novel interaction between annexin A2 and keratin 17: evidence for reciprocal regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7573-7581, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301549>

CIVEIRA, F.; ARCA, M.; CENARRO, A.; HEGELE, R. A. A mechanism-based operational definition and classification of hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 16, n. 6, p. 813-821, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.09.006>

CLARE, K.; DILLON, J. F.; BRENNAN, P. N. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 5, p. 939-946, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2022.00067>

COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; FIGUEIREDO-MENDES, C.; GALIZZI-FILHO, J.; PORTA, G.; OLIVEIRA, C. P. Nonalcoholic fatty liver disease brazilian society of hepatology consensus. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 2, p. 118-122, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000200013>

CUI, W.; CHEN, S. L.; HU, K. Q. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. **American Journal of Translational Research**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2010.

DALLACASAGRANDE, V.; HAJJAR, K. A. Annexin A2 in Inflammation and Host Defense. **Cells**, v. 9, n. 6, p.1499, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9061499>

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. **Gastroenterology**, v. 114; n. 4, p. 842-845, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)

DE LEEUW, A. J. M.; OUDE LUTTIKHUIS, M. A. M.; WELLEN, A. C.; MÜLLER, C.; CALKHOVEN, C. F. Obesity and its impact on COVID-19. **Journal of Molecular Medicine**, v. 99, n. 7, p. 899-915, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02072-4>

DIAS, P. C.; HENRIQUES, P.; ANJOS, L. A. D.; BURLANDY, L. Obesity and public policies: the Brazilian government's definitions and strategies. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311x00006016>

DI MAURO, S.; SCAMPORRINO, A.; FILIPPELLO, A.; DI PINO, A.; SCICALI, R.; MALAGUARNERA, R.; PURRELLO, F.; PIRO, S. Clinical and Molecular Biomarkers

for Diagnosis and Staging of NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11905, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222111905>

EYNAUDI, A.; DÍAZ-CASTRO, F.; BÓRQUEZ, J. C.; BRAVO-SAGUA, R.; PARRA, V.; TRONCOSO, R. Differential effects of oleic and palmitic acids on lipid droplet-mitochondria interaction in the hepatic cell line HepG2. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.775382>

ESCOBAR-HOYOS, L. F.; SHAH, R.; ROA-PENÑA, L.; VANNER, E. A.; NAJAFIAN, N.; BANACH, A.; NIELSEN, E.; AL-KHALIL, R.; AKALIN, A.; TALMAGE, D.; SHROYER, K. R. Keratin-17 promotes p27^{KIP1} nuclear export and degradation and offers potential prognostic utility. **Cancer Research**, v. 75, n. 17, p. 3650-3662, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0293>

FELDSTEIN, A. E.; WIECKOWSKA, A.; LOPEZ, A. R.; LIU, Y. C.; ZEIN, N. N.; MCCULLOUGH, A. J. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. **Hepatology**, v. 50, n. 4, p. 1072-1078. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.23050>

FENG, Y.; LI, W.; WANG, Z.; ZHANG, R.; LI, Y.; ZANG, L.; WANG, P.; LI, Z.; DONG, Y. The p-STAT3/ANXA2 axis promotes caspase-1-mediated hepatocyte pyroptosis in non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p.497. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03692-1>

FERGUSON, D.; FINCK, B. N. Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 8, p. 484-495, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00507-z>

FRANCISCO, V.; SANZ, M. J.; REAL, J. T.; MARQUES, P.; CAPUOZZO, M.; AIT ELDJOUDI, D.; GUALILLO, O. Adipokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Are We on the Road toward New Biomarkers and Therapeutic Targets? **Biology**, v. 11, n. 8, p. 1237, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11081237>

FREITAS, W. R. JR.; OLIVEIRA, L. V. F.; PEREZ, E. A.; ILIAS, E. J.; LOTTENBERG, C. P.; SILVA, A. S.; URBANO, J. J.; OLIVEIRA, M. C. JR.; VIEIRA, R. P.; RIBEIRO-ALVES, M.; ALVES, V. L. S.; KASSAB, P.; THULER, F. R.; MALHEIROS, C. A. Systemic Inflammation in Severe Obese Patients Undergoing Surgery for Obesity and Weight-Related Diseases. **Obesity Surgery**, v. 28, n. 7, p. 1931-1942. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11695-017-3104-9>

GODOY-MATOS, A. F.; JÚNIOR, W. S. S.; VALERIO, C. M. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. **Diabetology e Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 60, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>

GOFTON, C.; UPENDRAN, Y.; ZHENG, M. H.; GEORGE, J. MAFLD: How is it different from NAFLD? **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 29, p. S17-S31, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0367>

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: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.11.004>

GRINDHEIM, A. K.; HOLLÅS, H.; RADDUM, A. M.; SARASTE, J.; VEDELER, A. Reactive oxygen species exert opposite effects on Tyr23 phosphorylation of the nuclear and cortical pools of annexin A2. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 2, p. 314-328, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.173195>

GRINDHEIM, A. K.; SARASTE, J.; VEDELER, A. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, v.1861, n. 11, p. 2515–2529, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024>

HAMAGUCHI, M.; KOJIMA, T.; TAKEDA, N.; NAKAGAWA, T.; TANIGUCHI, H.; FUJII, K.; OMATSU, T.; NAKAJIMA, T.; SARUI, H.; SHIMAZAKI, M.; KATO, T.; OKUDA, J.; IDA, K. The Metabolic Syndrome as a Predictor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 143, n. 10, p. 722-728, 2005. DOI: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-143-10-200511150-00009>

HAMMARSTEDT, A.; GOGG, S.; HEDJAZIFAR, S.; NERSTEDT, A.; SMITH, U. Impaired adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 1911-1941, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2017>

HERRMANN, H.; AEBI, U. Intermediate filaments: structure and assembly. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 11, p. a018242, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018242>

HOBBS, R. P.; JACOB, J. T.; COULOMBE, P. A. Keratins Are Going Nuclear. **Developmental Cell**, v. 38, n. 3, p. 227-33, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.022>

JACOB, J. T.; NAIR, R. R.; POLL, B. G.; PINEDA, C. M.; HOBBS, R. P.; MATUNIS, M. J.; COULOMBE, P. A. Keratin 17 regulates nuclear morphology and chromatin organization. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 20, p. jcs254094, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.254094>

JANG, E.; SHIN, M. H.; KIM, K. S.; KIM, Y.; NA, Y. C.; WOO, H. J.; KIM, Y.; LEE, J. H.; JANG, H. J. Anti-lipoapoptotic effect of Artemisia capillaris extract on free fatty acids-

induced HepG2 cells. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, p. 253, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-253>

Jl, R.; JI, Y.; MA, L.; GE, S.; CHEN, J.; WU, S.; HUANG, T.; SHENG, Y.; WANG, L.; YI, N.; LIU, Z. Keratin 17 upregulation promotes cell metastasis and angiogenesis in colon adenocarcinoma. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 12598-12611, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2010393>

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. 11963-80. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375-C391, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>

KAWANAKA, M.; NISHINO, K.; NAKAMURA, J.; URATA, N.; OKA, T.; GOTO, D.; SUEHIRO, M.; KAWAMOTO, H.; YAMADA, G. Correlation between serum cytokeratin-18 and the progression or regression of non-alcoholic fatty liver disease. **Annals of Hepatology**, v. 14, n. 6, p. 837-844, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5604/16652681.1171767>

KAYA, E.; YILMAZ, Y. Metabolic-associated Fatty Liver Disease (MAFLD): A Multi-systemic Disease Beyond the Liver. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 10, n. 2, p. 329-338, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00178>

KOENEN, M.; HILL, M. A.; COHEN, P.; SOWERS, J. R. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 951-968, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318093>

LANDECHO, M. F.; TUERO, C.; VALENTÍ, V.; BILBAO, I.; DE LA HIGUERA, M.; FRÜHBECK, G. Relevance of Leptin and Other Adipokines in Obesity-Associated Cardiovascular Risk. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11112664>

LAURSEN, T. L.; KJÆR, M. B.; KRISTENSEN, L.; GRØNBÆK, H. Clinical Progression of Metabolic-Associated Fatty Liver Disease Is Rare in a Danish Tertiary Liver Center. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11092271>

LEE, M. S.; BAE, J. M.; JOO, S. K.; WOO, H.; LEE, D. H.; JUNG, Y. J.; KIM, B. G.; LEE, K. L.; KIM, W. Prospective comparison among transient elastography, supersonic shear imaging and ARFI for predicting fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **PLoS One**, v.12, n. 11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188321>

LEI, Y.; WANG, K.; LI, X.; LI, Y.; FENG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, Z.; HUANG, C.; ZHANG, T. Cell-surface translocation of annexin A2 contributes to bleomycin-induced pulmonary fibrosis by mediating inflammatory response in mice. **Clinical Science**, v. 133, n. 7, p. 789-804, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20180687>

LI, D. W.; QI, X. D.; ZHANG, C. H.; SUN, W. P. Annexin A2 degradation contributes to dopaminergic cell apoptosis via regulating p53 in neurodegenerative conditions. **Neuroreport**, v. 32, n. 15, p. 1263-1268, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001721>

LI, Z.; YU, L.; HU, B.; CHEN, L.; JV, M.; WANG, L.; ZHOU, C.; WEI, M.; ZHAO, L. Advances in cancer treatment: a new therapeutic target, Annexin A2. **Journal of Cancer**, v. 12, n. 12, p. 3587-3596, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.55173>

LIAO, C.; XIE, G.; ZHU, L.; CHEN, X.; LI, X.; LU, H.; XU, B.; RAMOT, Y.; PAUS, R.; YUE, Z. p53 Is a Direct Transcriptional Repressor of Keratin 17: Lessons from a Rat Model of Radiation Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 3, p. 680-689, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.12.021>

LIAO, J.; ZHANG, Z.; YUAN, Q.; LUO, L.; HU, X. The mouse Anxa6/miR-9-5p/Anxa2 axis modulates TGF- β 1-induced mouse hepatic stellate cell (mHSC) activation and CCl4-caused liver fibrosis. **Toxicology Letters**, v. 362, p. 38-49, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.04.004>

LIM, H. I.; HAJJAR, K. A. Annexin A2 in Fibrinolysis, Inflammation and Fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136836>

LIU, J.; VISHWANATHA, J. K. Regulation of nucleo-cytoplasmic shuttling of human annexin A2: a proposed mechanism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 303, n. 1-2, p. 211-220, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9477-7>

LIU, J.; AYADA, I.; ZHANG, X.; WANG, L.; LI, Y.; WEN, T.; MA, Z.; BRUNO, M. J.; DE KNEGT, R. J.; CAO, W.; PEPPELENBOSCH, M. P.; GHANBARI, M.; LI, Z.; PAN, Q. Estimating Global Prevalence of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease in Overweight or Obese Adults. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 3, p. e573-e582, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.02.030>

LONARDO, A.; MANTOVANI, A.; LUGARI, S.; TARGHER, G. Epidemiology and pathophysiology of the association between NAFLD and metabolically healthy or metabolically unhealthy obesity. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 4, p. 359-366, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.03.001>

LONGO, M.; ZATTERALE, F.; NADERI, J.; PARRILLO, L.; FORMISANO, P.; RACITI, G. A.; BEGUINOT, F.; MIELE, C. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant

of Obesity-Associated Metabolic Complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>

LUSTIG, R. H.; COLLIER, D.; KASSOTIS, C.; ROEPKE, T. A.; KIM, M. J.; BLANC, E.; BAROUKI, R.; BANSAL, A.; CAVE, M. C.; CHATTERJEE, S.; CHOUDHURY, M.; GILBERTSON, M.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; HOWARD, S.; LIND, L.; TOMLINSON, C. R.; VONDRACEK, J.; HEINDEL, J. J. Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 199, n., 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115012>

MADUREIRA, P. A.; HILL, R.; LEE, P. W.; WAISMAN, D. M. Genotoxic Agents Promote the Nuclear Accumulation of Annexin A2: Role of Annexin A2 in Mitigating DNA Damage. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e50591, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050591>

MAURICE, J.; MANOUSOU, P. Non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical medicine (London)**, v.18, n. 3, p. 245-250, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>

MAYORAL, L. P.; ANDRADE, G. M.; MAYORAL, E. P.; HUERTA, T. H.; CANSECO, S. P.; RODAL CANALES, F. J.; CABRERA-FUENTES, H. A.; CRUZ MM, PÉREZ SANTIAGO AD, ALPUCHE JJ, ZENTENO E, RUÍZ HM, CRUZ RM, JERONIMO, J. H.; PEREZ-CAMPOS, E. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 1, p. 11-21, 2020. DOI: https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1768_17

MEI, J.; YANG, R.; YANG, Q.; WAN, W.; WEI, X. Proteomic screening identifies the direct targets of chrysin anti-lipid depot in adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113361>

NAIR, R. R.; HSU, J.; JACOB, J. T.; PINEDA, C. M.; HOBBS, R. P.; COULOMBE, P. A. A role for keratin 17 during DNA damage response and tumor initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2020150118>

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2019.

NIAN, F.; ZHU, C.; JIN, N.; XIA, Q.; WU, L.; LU, X. Gut microbiota metabolite TMAO promoted lipid deposition and fibrosis process via KRT17 in fatty liver cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 669, p. 134-142, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.05.041>

NILSON, E. A. F.; ANDRADE, R. D. C. S.; DE BRITO, D. A.; DE OLIVEIRA, M. L. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil,

2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. e32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.32>

OBRADOVIC, M. et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Frontiers Endocrinology**, v. 12, 2021. DOI: 1 <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
OMS – Organização Mundial de Saúde. **Obesity**. Geneva: WHE, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1. Acesso em: 24 Abr. 2022.

PANG, B.; ZHU, Z.; XIAO, C.; LUO, Y.; FANG, H.; BAI, Y.; SUN, Z.; MA, J.; DANG, E.; WANG, G. Keratin 17 Is Required for Lipid Metabolism in Keratinocytes and Benefits Epidermal Permeability Barrier Homeostasis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 779257, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.779257>

PEARCE, S. G.; THOSANI, N. C.; PAN, J. J. Noninvasive biomarkers for the diagnosis of steatohepatitis and advanced fibrosis in NAFLD. **Biomarker Research**, v. 1, n. 1, p. 7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/2050-7771-1-7>

RAKVAAG, E.; FUGLSANG-NIELSEN, R.; BACH KNUDSEN, K. E.; HERMANSEN, K.; GREGERSEN, S. The Combination of Whey Protein and Dietary Fiber Does Not Alter Low-Grade Inflammation or Adipose Tissue Gene Expression in Adults with Abdominal Obesity. **The Review of Diabetic Studies**, v. 15, p. 83-94, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1900/RDS.2019.15.83>

RAZA, S.; RAJAK, S.; UPADHYAY, A.; TEWARI, A.; ANTHONY SINHA, R. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 26, n. 2, p. 206-237, 2021. DOI: 1 <https://doi.org/10.2741/4892>

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: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>

RYAN, B. J.; SCHLEH, M. W.; AHN, C.; LUDZKI, A. C.; GILLEN, J. B.; VARSHNEY, P.; VAN PELT, D. W.; PITCHFORD, L. M.; CHENEVERT, T. L.; GIOSCIA-RYAN, R. A.; HOWTON, S. M.; RODE, T.; HUMMEL, S. L.; BURANT, C. F.; LITTLE, J. P.; HOROWITZ, J. F. Moderate-Intensity Exercise and High-Intensity Interval Training Affect Insulin Sensitivity Similarly in Obese Adults. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 105, n. 8, p. 2941-2959, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa345>

SAKURAI, Y.; KUBOTA, N.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22084156>

SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia. **Esteatose hepática**. São Paulo: SBH, 2022. Disponível em: <https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>. Acesso em: 24 Abr. 2022.

SHETTY, P.; PATIL, V. S.; MOHAN, R.; D'SOUZA, L. C.; BARGALE, A.; PATIL, B. R.; DINESH, U. S.; HARIDAS, V.; KULKARNI, S. P. Annexin A2 and its downstream IL-6 and HB-EGF as secretory biomarkers in the differential diagnosis of Her-2 negative breast cancer. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 4, p. 463-471, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/0004563216665867>

SORET, P. A.; MAGUSTO, J.; HOUSSET, C.; GAUTHERON, J. *In Vitro* and *In Vivo* Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Appraisal. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 36. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10010036>

TAVIRANI, R. M.; TAVIRANI, R. M.; AZODI M. Z. ANXA2, PRKCE, and OXT are critical differentially genes in Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 12, n. 2, p. 131-137, 2019.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350– 4354, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

UNSAL, İ. O.; CALAPKULU, M.; SENCAR, M. E.; CAKAL, B.; OZBEK, M. Evaluation of NAFLD fibrosis, FIB-4 and APRI score in diabetic patients receiving exenatide treatment for non-alcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**, v. 12, n. 283, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04361-x>

VANDEL, J.; DUBOIS-CHEVALIER, J.; GHEERAERT, C.; DERUDAS, B.; RAVERDY, V.; THUILLIER, D.; GAAL, L.; FRANCQUE, S.; PATTOU, F.; STAEELS, B.; EECKHOUTE, J.; LEFEBVRE, P. Hepatic Molecular Signatures Highlight the Sexual Dimorphism of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). **Hepatology**, v. 73, n. 3, p. 920-936, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.31312>

XU, Y.; ZHANG, S. Z.; HUANG, C. H.; LIU, X. Y.; ZHONG, Z. H.; HOU, W. L.; SU, Z. F.; WEI, Y. Q. Keratin 17 identified by proteomic analysis may be involved in tumor angiogenesis. **BMB Reports**, v. 42, n. 6, p. 344-349, 2009. DOI: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.6.344>

ZHANG, H.; ZHANG, Y.; XIA, T.; LU, L.; LUO, M.; CHEN, Y.; LIU, Y.; LI, Y. The Role of Keratin17 in Human Tumours. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.818416>

ZHANG, X.; YIN, M.; ZHANG L. J. Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 807, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8080807>

WANG, C.; LIN, C. Annexin A2: Its Molecular Regulation and Cellular Expression in Cancer Development. **Disease Markers**, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/308976>

WANG, G.; DUAN, J.; PU, G.; YE, C.; LI, Y.; XIU, W.; XU, J.; LIU, B.; ZHU, Y.; WANG, C. The Annexin A2-Notch regulatory loop in hepatocytes promotes liver fibrosis in NAFLD by increasing osteopontin expression. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**, v. 1868, n. 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166413>

WANG, Y.; CHENG, Y. S.; YIN, X. Q.; YU, G.; JIA, B. L. Anxa2 gene silencing attenuates obesity-induced insulin resistance by suppressing the NF- κ B signaling pathway. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 316, n. 2, p. C223-C234, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00242.2018>

WGO - World Gastroenterology Organisation. **NAFLD & NASH**. Milwaukee: WGO, 2022. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/naflid-nash>. Acesso em: 24 Abr. 2022.

WIECHERT, M.; HOLZAPFEL, C. Nutrition Concepts for the Treatment of Obesity in Adults. **Nutrients**, v. 14, n. 1, p. 169, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14010169>

WU, M.; SUN, Y.; XU, F.; LIANG, Y.; LIU, H.; YI, Y. Annexin A2 Silencing Inhibits Proliferation and Epithelial-to-mesenchymal Transition through p53-Dependent Pathway in NSCLCs. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 5, p. 1077-1085, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.29440>

YANG, L.; ZHANG, S.; WANG, G. Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses. **Journal of Pathology**, v. 247, n. 2, p. 158-165, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.5178>

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 jan. 2024.