

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

FELIPE SANCHES EDAES

**Efeito da redução da expressão por vírus adeno-associado do receptor de
estrogênio alfa sobre o metabolismo hepático**

Ribeirão Preto

2023

FELIPE SANCHES EDAES

**Efeito da redução da expressão por vírus adeno-associado do receptor de
estrogênio alfa sobre o metabolismo hepático**

Versão Original

Dissertação de Mestrado desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gabriel Camporez, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Edaes, Felipe Sanches

Efeito da redução da expressão por vírus adeno-associado do receptor de estrogênio alfa sobre o metabolismo hepático. Ribeirão Preto, 2023.

79 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia. Orientador: Camporez, João Paulo Gabriel.

1. Resistência à Insulina. 2. Estradiol. 3. Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica. 4. Esteato-Hepatite. 5. Obesidade. 6. Síndrome Metabólica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

EDAES, Felipe Sanches. **Efeito da redução da expressão por vírus adeno-associado do receptor de estrogênio alfa sobre o metabolismo hepático.** 2023. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2023.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.º/a: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.º/a: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.º/a: _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

PREFÁCIO

A pesquisa científica é uma trilha de descobertas, onde cada avanço amplia nossa compreensão e aponta soluções para desafios sociais. Esta dissertação, voltada à epidemia global de obesidade e doenças metabólicas correlatas - um problema urgente de saúde pública - é um marco nessa caminhada.

A decisão de focar nesta área de pesquisa veio da minha curiosidade inabalável e da necessidade de um entendimento mais profundo dos mecanismos moleculares e celulares que orquestram o metabolismo energético e a homeostase metabólica. Esta pesquisa navega na interseção complexa entre hormônios sexuais e a regulação do metabolismo, em contextos fisiológicos e patológicos.

No processo de elaboração deste trabalho, encontrei desafios, mas também tive oportunidades de crescimento, aprendizado e colaboração com profissionais notáveis. Sou grato por todos que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa e aqueles que ofereceram apoio e motivação pessoal durante minha jornada acadêmica.

Esta dissertação é dedicada aos incansáveis pesquisadores e profissionais de saúde que buscam soluções para melhorar a saúde e o bem-estar das pessoas afetadas por doenças metabólicas. As descobertas apresentadas aqui têm o potencial de mudar vidas, oferecendo novas perspectivas para futuras investigações e, eventualmente, para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes contra a obesidade e doenças metabólicas correlatas.

Agora, um novo capítulo se abre na minha jornada acadêmica. Entretanto, a busca por conhecimento e compreensão é contínua. É meu desejo que este trabalho inspire outros pesquisadores a continuarem a desvendar os mistérios da biologia molecular e do metabolismo, e que juntos possamos enfrentar os desafios que a epidemia de obesidade e doenças metabólicas impõem à nossa sociedade.

PREÂMBULO

O século XXI está marcado por um significativo desafio de saúde pública: a epidemia global de obesidade e doenças metabólicas correlatas, como diabetes tipo 2, esteatose hepática e síndrome metabólica. A prevalência dessas condições, intensificada por estilos de vida sedentários e dietas ricas em gorduras, destaca a necessidade de compreender os mecanismos moleculares e celulares subjacentes.

Neste cenário, o papel dos hormônios sexuais, como o estrogênio, e seus receptores na regulação do metabolismo energético e na homeostase metabólica tem ganhado crescente interesse científico. Esta dissertação, intitulada "Efeito da Redução da Expressão por Vírus Adeno-Associado do Receptor de Estrogênio Alfa Sobre o Metabolismo Hepático", busca investigar a contribuição do receptor de estrogênio alfa (ER α) na modulação do metabolismo hepático, especialmente no contexto de uma dieta rica em gordura.

O objetivo deste trabalho é expandir nosso conhecimento sobre a importância do ER α na regulação do metabolismo hepático, e fornecer uma base sólida para futuras investigações. Através desta pesquisa, aspiramos inspirar e orientar pesquisadores, profissionais de saúde e estudantes na busca por soluções eficazes para enfrentar a epidemia de obesidade e doenças metabólicas correlatas, contribuindo assim para o avanço da medicina e da saúde pública.

Esta dissertação é estruturada em oito seções, cada uma mapeando um estágio distinto da pesquisa. Inicia-se com uma introdução à Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), estabelecendo objetivos, justificativa e hipótese. Segue-se uma análise detalhada da DHGNA e sua associação com resistência à insulina e obesidade, e uma revisão da literatura sobre o papel do ER α no metabolismo energético. A progressão natural deste trabalho nos leva à explanação dos métodos usados, os resultados alcançados e a discussão desses resultados são apresentados, proporcionando uma visão abrangente da pesquisa e suas implicações futuras.

Através desta dissertação, buscamos elucidar as complexidades do ER α no metabolismo hepático, ampliando a compreensão sobre as delicadas interações metabólicas associadas à obesidade. Além disso, aspiramos que este trabalho, ao revelar mais sobre essas interações, possa pavimentar o caminho para novas estratégias terapêuticas no combate à obesidade e doenças metabólicas correlatas.

AGRADECIMENTOS

Nos dois anos que moldaram este trabalho, a persistência foi uma constante. Enfrentamos uma era global de desafios sem precedentes, e nesta caminhada, houve obstáculos e vitórias. Este período também representou uma jornada de crescimento pessoal e profissional, e a resiliência construída ao longo desta experiência é um legado inestimável.

A concretização desta pesquisa só foi possível graças a um grupo seletivo de pessoas cuja contribuição positiva e apoio foram fundamentais. A todos que, de maneira direta ou indireta, ofereceram sua colaboração positiva para a realização deste projeto, expresso meu agradecimento genuíno. Suas contribuições positivas e transformadoras foram imprescindíveis para a materialização deste empreendimento científico que dá corpo a este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, desempenhou um papel vital ao fornecer suporte financeiro para o Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, do qual fiz parte. O apoio da CAPES, sempre positivo e encorajador, foi além dos recursos, representando um voto de confiança no valor do nosso trabalho.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos nacional e pelo financiamento de estudos no exterior (processos n. 2021/03406-4 e 2022/04763-8). Este apoio, que sempre se mostrou positivo e crucial, foi fundamental para a execução deste projeto.

Continuaremos a explorar o desconhecido, guiados pelo conhecimento e pelo desejo de aprender. Este é apenas o começo de uma longa jornada que nos aguarda. Agradeço mais uma vez a todos que, de maneira positiva, foram parte desta experiência.

"There are more things in heaven and earth...than are dreamt of in your philosophy."
- Hamlet, William Shakespeare (1601)

RESUMO

EDAES, Felipe Sanches. **Efeito da redução da expressão por vírus adeno-associado do receptor de estrogênio alfa sobre o metabolismo hepático**. 2023. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2023.

A ingestão excessiva de dietas ricas em gordura, associada a um estilo de vida sedentário, é uma grande contribuinte para o desenvolvimento de doenças metabólicas, como obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares. Mecanismos diversos, como metabolismo lipídico anormal e acúmulo ectópico, disfunção mitocondrial, inflamação e estresse do retículo endoplasmático, são considerados causadores de resistência à insulina. A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), uma consequência do estilo de vida ocidental e da dieta rica em gordura, afeta aproximadamente 30% dos adultos e até 10% das crianças em países desenvolvidos. As doenças cardiovasculares, que são frequentemente associadas a complicações metabólicas como resistência à insulina e obesidade, são menos prevalentes em mulheres jovens em comparação com homens da mesma idade ou mulheres pós-menopáusicas. Estudos clínicos e experimentais das últimas décadas indicam que o estradiol exerce um papel fundamental na homeostase glicêmica. A redução da concentração de estrogênio durante a menopausa está vinculada ao aumento da gordura visceral e, conseqüentemente, a doenças metabólicas como resistência à insulina, DM2 e doenças cardiovasculares. Estas ações do estradiol, benéficas do ponto de vista metabólico, são mediadas, como sugerido, pelo receptor de estrogênio alfa (ER α). Dado o papel central do fígado no desenvolvimento de DM2, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da redução da expressão de ER α especificamente no fígado, mediada por vírus adeno-associado (AAV), sobre o metabolismo energético hepático e a resistência à insulina hepática em camundongos. Os resultados obtidos mostram que a redução da expressão de ER α no fígado conduz a alterações significativas no metabolismo hepático, especialmente quando associada a uma dieta rica em gorduras. Este trabalho fornece evidências robustas do papel fundamental do ER α na regulação do metabolismo hepático, reforçando a importância de considerar modulações no ER α para o tratamento e prevenção de doenças metabólicas.

Palavras-chave: Resistência à Insulina; Estradiol; Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica; Esteato-Hepatite; Obesidade; Síndrome Metabólica.

ABSTRACT

EDAES, Felipe Sanches. **Effect of adeno-associated virus-mediated reduction of estrogen receptor alpha expression on hepatic metabolism**. 2023. Dissertation (Master's in Physiology) - Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2023.

Excessive intake of high-fat diets, coupled with a sedentary lifestyle, is a significant contributor to the development of metabolic diseases such as obesity, insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), and cardiovascular diseases. Several mechanisms, including abnormal lipid metabolism and ectopic accumulation, mitochondrial dysfunction, inflammation, and endoplasmic reticulum stress, are considered causative of insulin resistance. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), a consequence of the Western lifestyle and high-fat diet, affects approximately 30% of adults and up to 10% of children in developed countries. Cardiovascular diseases, often associated with metabolic complications such as insulin resistance and obesity, are less prevalent in young women compared to men of the same age or postmenopausal women. Clinical and experimental studies over the past decades indicate that estradiol plays a crucial role in glycemic homeostasis. The reduction in estrogen concentration during menopause is linked to an increase in visceral fat and, consequently, to metabolic diseases such as insulin resistance, T2D, and cardiovascular diseases. These metabolically beneficial actions of estradiol are, as suggested, mediated by the alpha estrogen receptor (ER α). Given the liver's central role in the development of T2D, this study aimed to investigate the effects of reducing ER α expression specifically in the liver, mediated by adeno-associated virus (AAV), on hepatic energy metabolism and hepatic insulin resistance in mice. The findings demonstrate that the reduction of ER α expression in the liver leads to significant alterations in hepatic metabolism, especially when associated with a high-fat diet. This work provides robust evidence of the pivotal role of ER α in regulating hepatic metabolism, underlining the importance of considering modulations in ER α for the treatment and prevention of metabolic diseases.

Keywords: Insulin Resistance; Estradiol; Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; Steatohepatitis; Obesity; Metabolic Syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Fluxograma dos métodos empregados no estudo do KD do ER α no fígado. 38
- Figura 2 Efeitos da manipulação genética na expressão de ER α e ER β no fígado de camundongos fêmeas C57BL/6 submetidas à HFD e CD. 44
- Figura 3 Efeitos da manipulação genética na expressão de ER α no tecido muscular esquelético e tecido adiposo de camundongos fêmeas C57BL/6 submetidas à HFD. 45
- Figura 4 Comparação do peso corporal total antes e após 8 semanas de dietas diferentes (CD e HFD), bem como da composição corporal (massa magra e massa gorda) antes e após 8 semanas de HFD, considerando a presença ou ausência de ER α KD através do AAV. 46
- Figura 5 Análise do impacto da redução de ER α mediada por AAV nas curvas glicêmicas e AUC em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à HFD ou CD por 8 semanas. 47
- Figura 6 Efeito da HFD na concentração de insulina ao longo do tempo em camundongos do grupo AAV. 48
- Figura 7 Comparação do acúmulo de lipídios e atividade enzimática no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma HFD ou CD por 8 semanas. 49
- Figura 8 Análise de coloração HE e ORO em camundongos submetidos a uma HFD por 8 semanas e tratados com a redução do ER α hepático via AAV, comparando-os ao grupo controle. 50
- Figura 9 Comparação da expressão de marcadores pró-inflamatórios no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas. 51
- Figura 10 Comparação da expressão de marcadores anti-inflamatórios no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas. 52
- Figura 11 Comparação da expressão de marcadores de fibrose hepática no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas. 53

- Figura 12 Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de marcadores de atividade macrófaga hepática F4/80 e Arg1 em camundongos submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas. 54
- Figura 13 Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de fatores de transcrição (PPAR α , SREBP1, PGC-1 α e ATF6) e hormônio (FGF21) em camundongos submetidos à CD ou HFD por 8 semanas. 55
- Figura 14 Análise de marcadores de estresse e sinalização celular em camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD e HFD por 8 semanas. 56
- Figura 15 Variação na expressão da enzima PEPCK em camundongos submetidos à CD e HFD por 8 semanas. 57
- Figura 16 Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (SCD1, FASN e ACC) em camundongos submetidos à CD ou HFD por 8 semanas. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos Primers para qPCR:

79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i> (Vírus Adeno-Associado)
AAV8-TBG-GFP-mESR1-shRNAmir	Vírus Adeno-Associado 8 com promotor de tiroxina ligando globulina, proteína verde fluorescente, receptor de estrógeno 1 de camundongo e microRNA de interferência curta
ACC	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i> (Carboxilase do Acetil-CoA)
ACC1	<i>Acetyl-CoA Carboxylase 1</i>
ACC2	<i>Acetyl-CoA Carboxylase 2</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End-products</i> (Produtos Finais de Glicação Avançada)
ALT	Alanina Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
Arg1	Arginase 1
AST	Aspartato Aminotransferase
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i> (Fator de Transcrição Ativante 6)
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área Sob a Curva)
C57BL/6	Cepa de camundongos comumente utilizada em pesquisas
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	<i>Chow Diet</i> (Dieta Padrão)
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHOP	C/EBP Homologous Protein (Proteína Homóloga de C/EBP)
COL1	Colágeno tipo 1
COL1A1	Colágeno Tipo 1 Alfa 1
COL1A2	Colágeno Tipo 1 Alfa 2
COL3	Colágeno Tipo 3
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i> (Doença do Coronavírus 2019)
CRP	<i>C Reactive Protein</i> (Proteína C Reativa)
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
E2	17 β -estradiol

EIF2	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i> (Fator de Iniciação Eucariótico 2)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
EPHA3	<i>Ephrin type-A receptor 3</i> (Receptor do tipo Ephrina A3)
ER	Estresse do Retículo Endoplasmático
ER α	<i>Estrogen Receptor Alpha</i> (Receptor de Estrogênio Alfa)
ER β	<i>Estrogen Receptor Beta</i> (Receptor de Estrogênio beta)
EUA	Estados Unidos da América
F4/80	Proteína expressa em macrófagos murinos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i> (Sintase de Ácidos Graxos)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FGF21	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i> (Fator de Crescimento de Fibroblastos 21)
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOXO	<i>Forkhead Box O</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i> (Receptor de Ácido Biliar)
GCKR	<i>Glucokinase Regulator</i> (Regulador da Glucoquinase)
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i> (Peptídeo semelhante ao Glucagon-1)
GTT	<i>Glucose Tolerance Test</i> (Teste de Tolerância à Glicose)
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
HE	Hematoxilina e Eosina
HFCS	<i>High Fructose Corn Syrup</i> (Xarope de Milho Rico em Frutose)
HFD	<i>High-Fat Diet</i> (Dieta Rica em Gordura)
HPCs	<i>Hepatic Progenitor Cells</i> (Células Progenitoras Hepáticas)
HSCs	<i>Hepatic Stellate Cells</i> (Hepatócitos Estrelados)
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula 1 de Adesão Intercelular)
IHTG	<i>Intrahepatic Triglyceride</i> (Triglicerídeos Intra-hepáticos)
IKK	I-kappaB Kinase
IKK β	I-kappaB Kinase Beta
IL-1	Interleucina 1

IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS1/2	<i>Insulin Receptor Substrate 1/2</i> (Substrato do Receptor de Insulina 1/2)
JNK	C-Jun N-terminal <i>kinases</i>
KD	<i>Knockdown</i> (inibição da expressão de um gene)
L-qPCR	qPCR do fígado
L-TAG	Triacilgliceróis Hepáticos
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LUM	Lumican
MAFLD	<i>Metabolic Associated Fatty Liver Disease</i> (Doença Hepática Gordurosa Associada ao Metabolismo)
MBOAT7	<i>Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7.</i>
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> (Proteína Quimioatratante de Monócitos 1)
MetS	<i>Metabolic Syndrome</i> (Síndrome Metabólica)
miRs	microRNAs
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> (Imagem por Ressonância Magnética)
NAFLD	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i> (Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica)
NASH	<i>Non-alcoholic Steatohepatitis</i> (Esteatohepatite Não Alcoólica)
NF-kB	Fator Nuclear kappa-B
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
ORO	<i>Oil Red O</i> (corante Óleo Vermelho O, utilizado para detecção de lipídios)
P-COLESTEROL	Colesterol Plasmático
P-GLICOSE	Glicose Plasmática
P-INSULINA	Insulina Plasmática
P-TGO/AST	TGO/AST Plasmático
P-TGP/ALT	TGP/ALT Plasmático

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i> (Carboxiquinase do Fosfoenolpiruvato)
PGC-1 α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha</i> (Coativador 1-alfa do Receptor Gama Ativado por Proliferador de Peroxissoma)
PI3K/AKT	<i>Phosphoinositide 3-kinase / Protein kinase B</i> (Fosfatidilinositol 3-quinase / Proteína quinase B)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Quinase C)
PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma)
PPAR α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i> (Receptor Alfa Ativado por Proliferadores de Peroxissoma)
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
RAS	<i>Renin-Angiotensin-System</i> (Sistema Renina-Angiotensina)
RE	Retículo Endoplasmático
RhoA	<i>Ras homologue gene family, member A</i> (Gene homólogo da família Ras, membro A)
RI	Resistência à Insulina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
RT-qPCR	<i>Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real)
SCD1	<i>Stearoyl-CoA Desaturase-1</i> (Desaturase-1 do Estearoil-CoA)
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> (Erro padrão da média)
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SREBP1	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1</i> (Proteína de Ligação ao Elemento Regulador do Esteroide 1)
SYBR	<i>SYBR Green</i> (um corante fluorescente usado em biologia molecular)
TAG	Triacilglicerol

TD-NMR	<i>Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo)
TG	Triglicerídeo
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Crescimento Transformante Beta)
TGF- β -Smad3	Fator de Crescimento Transformante Beta/Proteína Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3
TGF β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Crescimento Transformador Beta)
TGO/AST	Transaminase Glutâmico-Oxalacética / Aspartato Aminotransferase
TGP/ALT	Transaminase Glutâmico-Pirúvica / Alanina Aminotransferase
THBS2	Thrombospondin 2
TM6SF2	<i>Transmembrane 6 Superfamily Member 2</i> (Membro 2 da Superfamília Transmembrana 6)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TVB-2640	Inibidor da sintase dos ácidos graxos
USP	Universidade de São Paulo
VCAN	Versican

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVOS	23
1.2 JUSTIFICATIVA	24
1.3 HIPÓTESE	24
2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA - DHGNA	25
2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DHGNA	25
2.1.1 Impacto Clínico da DHGNA	26
2.2 FATORES DE RISCO E MECANISMOS PATOGENICOS	27
2.2.1 Estilo de Vida e Dieta	28
2.2.2 Obesidade e Síndrome Metabólica	30
3 RESISTÊNCIA À INSULINA	32
3.1 DEFINIÇÃO E RELAÇÃO COM A OBESIDADE E A DHGNA	32
3.1.1 Marcadores Inflamatórios e Estresse do Retículo Endoplasmático	33
4 ERα E METABOLISMO	35
4.1 EFEITOS DO ESTRADIOL E DO ERA NO METABOLISMO	35
4.2 IMPACTO DO ERA NA DHGNA	35
4.3 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE E EXPRESSÃO DO ERA E SEUS EFEITOS SOBRE A DHGNA	36
5 MÉTODOS	38
5.1 OBTENÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS PARA ESTUDO DO ERA KD E HFD	38
5.2 INOCULAÇÃO DO AAV	39
5.3 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CORPORAL DE CAMUNDONGOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)	39
5.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE – GTT	40
5.5 DOSAGEM DE INSULINA	40
5.6 EUTANÁSIA DOS CAMUNDONGOS E COLETA DE AMOSTRAS	41
5.7 EXTRAÇÃO DE RNA E ANÁLISE POR PCR QUANTITATIVO	41
5.8 DOSAGEM DE GLICOSE, COLESTEROL E ENZIMAS HEPÁTICAS NO PLASMA	41

5.9 DOSAGEM DE TAG NO FÍGADO.....	42
5.10 COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA – HE	42
5.11 COLORAÇÃO DE OIL RED O – ORO.....	43
5.12 MÉTODO DE ANÁLISE DE RESULTADOS	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 MANIPULAÇÃO GENÉTICA REDUZ A EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 FÊMEAS.....	44
6.2 MANIPULAÇÃO GENÉTICA NÃO REDUZ A EXPRESSÃO DE ERA NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSO	45
6.3 REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE ERA RESULTA EM AUMENTO NO PESO CORPORAL TOTAL E NA MASSA GORDA, SEM ALTERAÇÕES NA MASSA MAGRA, APÓS 8 SEMANAS DE HFD, SEM ALTERAÇÕES NO PESO CORPORAL TOTAL APÓS 8 SEMANAS DE CD.....	45
6.4 REDUÇÃO DE ERA MEDIADA POR AAV AUMENTA GLICEMIA E AUC EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM HFD POR 8 SEMANAS, MAS NÃO EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM CD	47
6.5 RESPOSTA INSULÍNICA AMPLIFICADA A PARTIR DOS 60 MINUTOS EM CAMUNDONGOS COM REDUÇÃO DE ERA MEDIADA POR AAV ALIMENTADOS COM HFD POR 8 SEMANAS	48
6.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÃO AFETADOS PELA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS C57BL/6 ALIMENTADOS COM HFD POR 8 SEMANAS	48
6.7 TENDÊNCIAS NA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CD E HFD: MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS.....	50
6.8 TENDÊNCIAS NA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CD E HFD: MARCADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS	51
6.9 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE FIBROSE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM HFD É AFETADA PELA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA.	52
6.10 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVIDADE MACRÓFAGICA HEPÁTICA É AFETADA PELA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À HFD POR 8 SEMANAS	53
6.11 EXPRESSÃO DE PPARA, SREBP1 E FGF21 É AFETADA PELA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A HFD POR 8 SEMANAS, ENQUANTO PGC-1A E ATF6 NÃO SÃO AFETADOS	54

6.12 VARIAÇÕES NOS MARCADORES DE ESTRESSE E SINALIZAÇÃO CELULAR EM CAMUNDONGOS COM REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA SUBMETIDOS À CD E HFD POR 8 SEMANAS	55
6.13 ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DA ENZIMA PEPCK EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CD E HFD POR 8 SEMANAS COM REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA	56
6.14 EXPRESSÃO HEPÁTICA DE SCD1 É SIGNIFICATIVAMENTE ELEVADA EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM HFD E CD APÓS REDUÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DE ERA, ENQUANTO FASN E ACC PERMANECEM INALTERADOS	57
7 DISCUSSÃO	59
8 CONCLUSÃO	67
CONFLITOS DE INTERESSE	68
FINANCIAMENTO	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES	79
APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), também conhecida como doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), acomete um quarto da população adulta global, sendo a enfermidade hepática mais recorrente e a segunda principal causa de transplante hepático nos Estados Unidos (LEE et al., 2017; QI et al., 2017; TILG; EFFENBERGER, 2020; ZOU et al., 2020). Está fortemente associada à pandemia de obesidade e diabetes tipo 2, com prevalência potencializada pelo estilo de vida ocidental e dietas ricas em gorduras (ABEGUNDE et al., 2007; COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; LONARDO et al., 2019; FIORENTINO et al., 2020; LIM; KIM; TARGHER, 2021; SHIHA et al., 2021).

Com implicações econômicas significativas, a DHGNA custa anualmente cerca de US\$103 bilhões nos EUA e €35 bilhões na Europa, sendo fator de risco independente para doenças cardiovasculares e causa primordial de cirrose, doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular (CAMPOREZ et al., 2013a; LEE et al., 2017; DING et al., 2020; GREFHORST et al., 2021; HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; HUBY; GAUTIER, 2021; YE et al., 2023; YOUNOSSI et al., 2023). No Brasil, gerou um prejuízo de US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015, relacionado a diabetes, doenças cardíacas e derrame.

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de lipídios hepáticos, podendo evoluir para esteatohepatite, fibrose e cirrose, com incidência e progressão influenciadas por variáveis hormonais, genéticas, epigenéticas e metabólicas (ALISI et al., 2017; IPSEN; TVEDEN-NYBORG, 2021; DUELL et al., 2022; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Apesar disso, falta compreensão sobre os mecanismos patogênicos e fatores de risco, sendo necessária a busca por biomarcadores para diagnóstico e monitoramento (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; KITADE et al., 2017; DUELL et al., 2022; TILG; EFFENBERGER, 2020).

Pesquisas indicam influência de sexo, níveis hormonais e status reprodutivo na doença. Mulheres pós-menopáusicas possuem maior risco, com progressão acelerada da DHGNA. O estrogênio, particularmente o estradiol, tem papel crucial, protegendo contra adiposidade visceral, resistência à insulina (RI) e DHGNA (LOUET; LEMAY; MAUVAIS-JARVIS, 2004; CAMPOREZ et al., 2011; CAMPOREZ et al., 2013a; CAMPOREZ et al., 2013b; LIAO et al., 2015; IKEUCHI et al., 2016; LONARDO et al., 2019; MAUVAIS-JARVIS et al., 2020).

As ações metabolicamente benéficas do estradiol parecem ser mediadas pelo receptor de estrogênio alfa (ER α), que protege contra obesidade induzida pela dieta rica em gordura (HFD). No entanto, o papel completo do ER α no metabolismo energético, sensibilidade à insulina e outras funções hepáticas ainda está sendo investigado, assim como os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da DHGNA (HAN et al., 2014; HAMILTON et al., 2016; GUILLAUME et al., 2019; HEINE et al., 2000).

Também se observa a urgência na busca por terapias potenciais, já que não há medicamentos aprovados pela FDA. Terapias baseadas em ER α e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF21), bem como a inibição da via RhoA/PI3K/AKT, mostram-se promissoras (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; DUELL et al., 2022; YE et al., 2023).

Em suma, por ser globalmente desafiadora à saúde pública, entender a DHGNA é essencial para a construção de estratégias efetivas de prevenção e tratamento (CAMPOREZ et al., 2013a; OATES et al., 2019; BOTELLO-MANILLA et al., 2020; CHEN; WU; WU, 2020; HEINE et al., 2000; DUELL et al., 2022; EL-KASSAS et al., 2022; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022; YOUNOSSI et al., 2023).

1.1 Objetivos

Visando o papel central do fígado na evolução do DM2, o propósito deste projeto é investigar *in vivo* os impactos do *knockdown* (KD) do ER α , realizado especificamente no fígado através do vírus adeno-associado (AAV), sobre o metabolismo energético hepático e a resistência à insulina em camundongos.

Os objetivos secundários consistem na avaliação dos seguintes efeitos do KD do ER α no fígado por AAV:

1. Alterações no acúmulo hepático de lipídios (TAG);
2. Modificações na expressão gênica de marcadores inflamatórios;
3. Variações na expressão gênica de marcadores de estresse do RE;
4. Alterações na expressão gênica de indicadores de atividade macrofágica;
5. Mudanças na dosagem plasmática das enzimas hepáticas;
6. Efeitos na tolerância à glicose, avaliada por meio do teste de tolerância à glicose (GTT).

1.2 Justificativa

A identificação de novos alvos moleculares capazes de prevenir ou minimizar a resistência à insulina e suas consequências metabólicas induzidas pelo consumo de alta gordura, além das estratégias clássicas como atividade física e redução da ingestão calórica, representa um dos desafios de saúde pública mais críticos. Compreender os mecanismos moleculares pode gerar novos alvos terapêuticos para interromper o ciclo de obesidade e suas complicações.

1.3 Hipótese

Supomos que o ER α media as ações metabolicamente benéficas do estradiol. Portanto, ao submetermos camundongos alimentados com uma HFD ao KD de ER α no fígado, acreditamos que haverá consequências negativas no metabolismo energético hepático e na resistência à insulina desses animais.

2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA - DHGNA

2.1 Definição e Epidemiologia da DHGNA

A crescente prevalência da DHGNA, também conhecida como MAFLD, ressalta a necessidade de pesquisa nesta área (CAMPOREZ et al., 2013a; LEE et al., 2017; TILG; EFFENBERGER, 2020). Essa condição está fortemente ligada à síndrome metabólica (MetS) e ao estilo de vida ocidental, incluindo dietas ricas em gorduras (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; BESSONE; RAZORI; ROMA, 2018; WANG et al., 2020). Sua associação com resistência à insulina hepática, diabetes tipo 2 e obesidade, junto com sua progressão de simples esteatose a cirrose, constitui um desafio global significativo (BOTELLO-MANILLA et al., 2020; HEINE et al., 2000).

Torna-se indispensável investir em pesquisa, prevenção e tratamento, especialmente devido à falta de terapias aprovadas pela FDA (OATES et al., 2019; CHEN; WU; WU, 2020; EL-KASSAS et al., 2022; YOUNOSSI et al., 2023). Como a doença hepática crônica mais comum, impulsionada pela pandemia de obesidade e diabetes tipo 2, a DHGNA/MAFLD leva à significativa morbidade e mortalidade, com consequências como cirrose, doença hepática terminal, necessidade de transplante de fígado e carcinoma hepatocelular, especialmente em mulheres (CHEN; WU; WU, 2020; DING et al., 2020; EL-KASSAS et al., 2022). Além disso, tem um considerável impacto financeiro global (TANASE et al., 2020).

A obesidade é um fator de risco bem estabelecido para a DHGNA/MAFLD, e a incidência e progressão da doença são influenciadas por fatores hormonais, genéticos, epigenéticos e metabólicos (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; YANG et al., 2013; ANSTEE et al., 2016; LONARDO et al., 2019; DISTEFANO, 2020; FONTES-CAL et al., 2021; DUELL et al., 2022; GUO et al., 2022; O'FARRELL et al., 2022; POWWELS et al., 2022).

2.1.1 Impacto Clínico da DHGNA

Associada à obesidade e diabetes tipo 2, a DHGNA é um problema de saúde global com consequências como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose e infarto agudo do miocárdio (FONTES-CAL et al., 2021). A forma mais severa, esteatohepatite não alcoólica (NASH), relaciona-se a pior controle glicêmico e maior prevalência em pacientes diabéticos, agindo como fator de risco independente para doenças cardiovasculares (HASSEN et al., 2022).

Cerca de 10-20% dos pacientes com DHGNA desenvolvem NASH, dos quais 10-15% evoluem para cirrose hepática. Em pacientes com diabetes tipo 2, a prevalência de NASH pode exceder 37%. As taxas de mortalidade são preocupantes: 12,60 por 1000 pessoas-ano para todas as causas, 4,20 por 1000 para mortalidade cardíaca, 2,83 por 1000 para câncer extra-hepático e 0,92 por 1000 para doença hepática (YANG et al., 2013; DUELL et al., 2022; YOUNOSSI et al., 2023).

A DHGNA é gerenciável por mudanças na dieta e atividade física, ressaltando a necessidade de abordagens não invasivas e conscientização sobre diagnóstico precoce e modificações no estilo de vida (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; GUO et al., 2022). Para um manejo eficaz da DHGNA, a Organização Mundial da Saúde deve orientar políticas e estratégias regionais (YOUNOSSI et al., 2023).

Comumente assintomática até o avanço do comprometimento hepático, a DHGNA tem como causa primária de morte a doença cardiovascular aterosclerótica. Provoca fadiga, diminuição da atividade física e debilitação emocional, resultando em qualidade de vida inferior se comparada a outras doenças hepáticas crônicas e podendo evoluir para complicações graves (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; DING et al., 2020; DUELL et al., 2022; HASSEN et al., 2022).

Fatores de risco incluem MetS, obesidade e diabetes tipo 2. Assim, torna-se fundamental o aprimoramento dos métodos de detecção precoce da NASH e o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para mitigar seu impacto (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; ROCHLANI et al., 2017; COTTER; RINELLA, 2020; DISTEFANO, 2020; ESLAM et al., 2020; VACHLIOTIS et al., 2021; POWWELS et al., 2022).

A conexão entre DHGNA, diabetes tipo 2, resistência à insulina e MetS é particularmente notável em obesidade, onde a DHGNA pode contribuir para doenças

cardiovasculares, hipertensão arterial e dislipidemia (HASSEN et al., 2022; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Estudos moleculares podem melhorar o prognóstico desta doença e o impacto na qualidade de vida do paciente e nos custos de saúde (BOTELLO-MANILLA et al., 2020).

Além dos riscos a saúde já citados, a DHGNA também está associada à liberação de adipocinas que exacerbam a inflamação crônica em órgãos como o fígado (ALISI et al., 2017; DING et al., 2020).

Os sintomas clínicos refletem características da MetS, e o controle da pressão arterial pode ser uma forma de proteção contra a DHGNA, especialmente em indivíduos não obesos (HASSEN et al., 2022).

Sem tratamento, a DHGNA pode evoluir para condições graves como NASH, carcinoma hepatocelular e cirrose, com resistência à insulina e citocinas pró-inflamatórias desempenhando um papel fundamental nesta progressão (HUBY; GAUTIER, 2021; HASSEN et al., 2022; THOMSEN et al., 2023).

A DHGNA tem grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, agravado pela falta de terapias eficazes, e por isso tornou-se o foco de várias pesquisas farmacológicas (DING et al., 2020; DISTEFANO, 2020; THOMSEN et al., 2023).

2.2 Fatores de Risco e Mecanismos Patogênicos

A DHGNA é influenciada por uma interação complexa de genética, estilo de vida e fatores metabólicos. Polimorfismos em genes como PNPLA3, GCKR, MBOAT7 e TM6SF2, estão vinculados ao risco da doença e sua progressão (DUELL et al., 2022). Porém, apesar das mutações genéticas serem responsáveis por formas raras de esteatose severa, a prevalência crescente de DHGNA decorre de alterações na quantidade e composição alimentar (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011).

Pesquisas apontam os genes COL1, COL3 e TGF- β 1 como fatores da progressão da DHGNA, contribuindo para estratégias de contenção da doença (QI et al., 2017; HUANG et al., 2018; NAIR; NATH, 2020; PELLICANO et al., 2021). Foi observada a superexpressão de COL1A1, componente crucial da matriz extracelular e fibrose, em tecidos de DHGNA. Estudos bioinformáticos identificaram CD24, PZP, COL1A1, COL1A2, LUM, VCAN, THBS2 e EPHA3 como potenciais biomarcadores

para DHGNA/NASH, sugerindo a disfunção na regulação dos genes COL1A1 e COL1A2 na progressão da doença (QI et al., 2017; HUANG et al., 2018).

A fibrose hepática, principal complicação da DHGNA, está associada ao incremento de morbidade e mortalidade (JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Esse quadro decorre da resposta inflamatória crônica, que causa a deposição excessiva de matriz extracelular e formação de tecido cicatricial, elevando o risco de cirrose e carcinoma hepatocelular (HUANG et al., 2018; PELLICANO et al., 2021). Nesse processo, as interações entre hepatócitos estrelados (HSCs) e outras células hepáticas, além da ativação das células progenitoras hepáticas (HPCs), têm papel fundamental (ALISI et al., 2017).

Estudos indicam a eficácia da inibição farmacológica de enzimas como ACC1 e ACC2 no tratamento da DHGNA, ao reduzir a lipogênese e estimular a oxidação de ácidos graxos (GOEDEKE et al., 2018). O Composto 1, inibidor alostérico de ACC1 e ACC2, diminuiu a lipogênese hepática em 20% e melhorou a sensibilidade à insulina, atenuando a esteatose. Contudo, em alguns pacientes, houve aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos (GOEDEKE et al., 2018).

2.2.1 Estilo de Vida e Dieta

A DHGNA é uma condição metabólica multifatorial, influenciada pela predisposição genética, alterações epigenéticas e fatores ambientais e comportamentais, como sedentarismo e uma HFD, carboidratos e calorias (LEE et al., 2017; PERLA et al., 2017; BESSONE; RAZORI; ROMA, 2018; DING et al., 2020; DISTEFANO, 2020; ESLAM et al., 2020; GREFHORST et al., 2021; DUELL et al., 2022; HASSEN et al., 2022).

A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos hepáticos e resistência à insulina, potencializados pelo estilo de vida sedentário e dietas desbalanceadas, como a ocidental (DUELL et al., 2022; HASSEN et al., 2022). Riscos adicionais incluem alto consumo de álcool, enzimas hepáticas elevadas, má condição física (XIE et al., 2023), consumo excessivo de alimentos processados, ricos em ácidos graxos saturados (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; PAN et al., 2017; CHO; KWON; HWANG, 2023) e condições maternas e ambientais precoces (CAO et al., 2020).

A patogênese da DHGNA está intimamente ligada à dieta ocidental, rica em gorduras e carboidratos, e ao consumo excessivo de frutose, especialmente na forma de xarope de milho rico em frutose (HFCS), que intensifica a lipogênese hepática (PERLA et al., 2017; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). O controle de HFCS (<20g/dia) é benéfico na melhora da NASH, mesmo sem perda de peso (DUELL et al., 2022).

Além disso, uma HFD estimula a produção hepática de IL-6, IL-1 β e TNF- α , contribuindo para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (MUOIO; NEWGARD, 2008). Isso reforça a recomendação de uma dieta saudável, como a mediterrânea, para pacientes com MetS, que têm maior risco de DHGNA (PATERNOSTRO; TRAUNER, 2022).

A condição é exacerbada pela dieta materna rica em gorduras, que influencia o gene *Scd1*, ligado à lipotoxicidade e ao metabolismo lipídico anormal em neonatos (CAO et al., 2020). O excesso de ácidos graxos, convertido em lipídios lipotóxicos, contribui para a DHGNA, enquanto o colesterol livre promove a transformação de células de Kupffer em células espumosas, aumentando o risco de NASH (CHO; KWON; HWANG, 2023).

Estratégias preventivas e terapêuticas, como exercícios regulares, dieta mediterrânea, limitação do consumo noturno de alimentos, melhorias na dieta gestacional, e intervenções nutricionais são fundamentais na prevenção e tratamento da DHGNA (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; QI et al., 2017; HONMA et al., 2018; CAO et al., 2020; DISTEFANO, 2020; DUELL et al., 2022; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022; PATERNOSTRO; TRAUNER, 2022).

Fatores como alta circunferência da cintura, alto IMC, sexo masculino, consumo de álcool e idade jovem foram identificados como indicativos de aumento do nível de ALT, um marcador de DHGNA (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017). Além disso, a interação entre genes (como *FOXO*) e diferentes dietas pode afetar a progressão da DHGNA (DONG, 2017).

Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da DHGNA é crucial para a elaboração de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes. Intervenções precoces, incluindo mudanças no estilo de vida, podem retardar ou reverter a progressão da DHGNA (YANG et al., 2013; PAN et al., 2017).

2.2.2 Obesidade e Síndrome Metabólica

A DHGNA, representante hepática da MetS, está intrinsecamente ligada à obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2, marcada pelo acúmulo de gordura acima de 5% nos hepatócitos (ALISI et al., 2017; GREFHORST et al., 2021; DUELL et al., 2022). Sua prevalência em obesos e diabéticos tipo 2 alcança 80%, associando-se também a casos de obesidade submetidos à cirurgia bariátrica e indivíduos com dislipidemia (DUAN et al., 2022; HASSEN et al., 2022; YE et al., 2023). A obesidade, por sua vez, implica em risco elevado para doenças como aterosclerose, problemas cardíacos, câncer e outros problemas de saúde, contribuindo para aproximadamente 300.000 mortes anuais nos EUA (HAN et al., 2014; HEINE et al., 2000).

A MetS, englobando alta glicose sanguínea, baixo HDL, triglicerídeos elevados, hipertensão e grande circunferência da cintura, é crucial para o desenvolvimento da DHGNA, podendo aumentar o risco em até 4,6 vezes (HASSEN et al., 2022; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Fatores adicionais como a polarização de macrófagos M2 para M1 em tecido adiposo de obesos, características genéticas e condições como hipotireoidismo e hipertensão também intensificam este risco (ALISI et al., 2017; XIE et al., 2023).

A DHGNA e a MetS estão associadas ao acúmulo de radicais lipídicos tóxicos, estresse oxidativo e resistência à insulina (NAIR; NATH, 2020). Neste contexto, o colesterol e o consumo de HFCS adquirem relevância, pois podem levar à cirrose hepática e a complicações metabólicas, respectivamente (PAN et al., 2017; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). O excesso de HFCS e de ácidos graxos livres decorrente de obesidade e diabetes tipo 2, outro fator de risco para DHGNA, aumentam a resistência à insulina e o acúmulo de triglicerídeos no fígado, acentuando a lipotoxicidade e desregulação do metabolismo de glicose e lipídios (MUOIO; NEWGARD, 2008; BRIL; CUSI, 2016; PERLA et al., 2017; DUAN et al., 2022).

O ambiente inflamatório promovido pela obesidade exacerba a DHGNA, com a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6 diminuindo os níveis de adiponectina e promovendo acúmulo de triglicerídeos hepáticos (GREFHORST et al., 2021). Moléculas chave como TNF- α e TGF- β , também atuam nesse processo (YANG et al., 2013; HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; AHMED et al., 2022).

Mudanças no estilo de vida, como a redução de 5-10% do peso corporal e a prática de exercícios regulares, podem atenuar a esteatose hepática, melhorar a

histologia hepática, aprimorar a sensibilidade à insulina e diminuir em 40% os níveis de IHTG, independentemente da perda de peso (BRIL; CUSI, 2016; DUELL et al., 2022; PATERNOSTRO; TRAUNER, 2022). No entanto, o tratamento da DHGNA demanda por novas abordagens terapêuticas, envolvendo perda de peso, mudanças de estilo de vida e terapia da MetS subjacente (ESLAM et al., 2020; POUWELS et al., 2022).

A crescente prevalência da DHGNA e a escalada dos custos de saúde até 2025 (DING et al., 2020), assim como sua interação com a COVID-19 (KITADE et al., 2017; GUO et al., 2022; LI et al., 2022), têm despertado interesse da comunidade científica. Nesse sentido, a compreensão dos fatores de transcrição FOXO na regulação do metabolismo do colesterol, inclusive na homeostase do LDL, torna-se crucial (DONG, 2017).

3 RESISTÊNCIA À INSULINA

3.1 Definição e Relação com a Obesidade e a DHGNA

A resistência à insulina, comum em obesidade, diabetes tipo 2 e DHGNA, é marcada por uma resposta insuficiente à insulina em tecidos-alvo como o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo branco, prejudicando o metabolismo da glicose (MUOIO; NEWGARD, 2008; CAMPOREZ et al., 2013a; ZAMORA; VILLENA, 2014). Em indivíduos obesos, amplifica a lipólise, aumentando as concentrações séricas de ácidos graxos livres e exacerbando a resistência à insulina (ZAMORA; VILLENA, 2014).

Adipocinas e tecido adiposo influenciam a resistência à insulina e o desenvolvimento da DHGNA (JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022), assim como o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Condição crucial na progressão da DHGNA, está atrelada ao consumo de dietas ricas em gordura, que interferem na sinalização da insulina (SHOELSON, 2006; PERLA et al., 2017), e tem um papel na severidade da DHGNA e no surgimento de comorbidades, com quase todos os pacientes apresentando resistência à insulina hepática (CAMPOREZ et al., 2013a; HONMA et al., 2018).

Os mecanismos de resistência à insulina podem ser estudados através das vias IKK β /NF- κ B, JNK e do receptor de insulina (SHOELSON, 2006), e a polarização de macrófagos no tecido adiposo e hepático podem ser relevantes para diagnósticos preventivos (ALISI et al., 2017). Esta condição está associada ao aumento do fluxo de ácidos graxos livres e à síntese de novo de ácidos graxos no fígado, favorecendo a dislipidemia aterogênica e a indução de citocinas pró-inflamatórias, que propiciam o diabetes tipo 2 (HASSEN et al., 2022).

A esteatose hepática é relacionada à resistência à insulina (GOEDEKE et al., 2018), e a intervenção com o inibidor da ACC, Compound 1, levou à melhoria significativa da sensibilidade à insulina (GOEDEKE et al., 2018). Interferências na sinalização da insulina por citocinas inflamatórias resultam em resistência à insulina e acúmulo de lipídios hepáticos, com estas citocinas associadas ao risco aumentado de DHGNA (DUAN et al., 2022).

Estrogênio tem um papel na prevenção da resistência à insulina, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares em mulheres pré-menopausa (CAMPOREZ et al., 2011; LIAO et al., 2015), e a sinalização de TGF- β -Smad3 é relevante na relação entre obesidade, resistência à insulina e esteatose hepática (YANG et al., 2013). Portanto, a resistência à insulina é um componente chave na obesidade, DHGNA, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e processos inflamatórios, e o seu controle, por meio de dieta e atividade física, pode beneficiar a patologia hepática (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; ROCHLANI et al., 2017; COTTER; RINELLA, 2020; ESLAM et al., 2020; FANG et al., 2020).

A resistência à insulina é também um fator central na acumulação de ácidos graxos livres hepáticos, causando dano hepático inflamatório na NASH (BESSONE; RAZORI; ROMA, 2018), e suas complicações, como a fibrose hepática, podem ser amenizadas com medicamentos, apesar de sua toxicidade (DUELL et al., 2022; O'FARRELL et al., 2022). Alterações na metilação do DNA hepático em PGC1- α , um regulador da biogênese mitocondrial, indicam resistência periférica à insulina (LEE et al., 2017). Assim, compreender os mecanismos moleculares e as vias envolvidas na resistência à insulina é fundamental (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

3.1.1 Marcadores Inflamatórios e Estresse do Retículo Endoplasmático

A DHGNA, caracterizada por estresse do retículo endoplasmático (RE) e marcadores inflamatórios elevados, potencializa a resistência à insulina e progressão da doença (MIURA et al., 2012; OATES et al., 2019). A patogênese envolve estímulos inflamatórios, como ligantes para TNF- α , IL-1, Toll, receptores AGE, ROS, ceramida e diversas isoformas de PKC, que são ativados em adipócitos, hepatócitos e macrófagos associados (SHOELSON, 2006).

O ambiente inflamatório na DHGNA é perpetuado por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, que ativam o Fator Nuclear kappa-B (NF- κ B) (SHOELSON, 2006; ALISI et al., 2017). Este fator de transcrição, relevante na modulação da função do receptor de insulina, é ativado por IKK, que impede a autofosforilação de tirosina e promove resistência à insulina através da fosforilação de serina inibitória no IRS1/2 (LEE et al., 2017; TUFTS UNIVERSITY, 2023). A sinalização da insulina também é interferida por rotas como as ativadas por estresse

JNK e IKK β , aumentando a resistência à insulina (SHOELSON, 2006; BOURA-HALFON; ZICK, 2009; SOLINAS; BECATTINI, 2017).

Estudos destacaram que o estresse do RE e a inflamação, exacerbados pela obesidade, contribuem para a resistência à insulina, impulsionando progressivamente a DHGNA (CAELLES et al., 2016; DISTEFANO, 2020; DUAN et al., 2022). Citoquinas inflamatórias como CRP, IL-1 β , IL-6, TNF- α e ICAM-1, além de microRNAs (miRs) específicos, foram associados ao risco aumentado de DHGNA e MetS (LEE et al., 2017; DUAN et al., 2022).

A DHGNA implica ainda na migração de macrófagos do tecido adiposo para o fígado, ativando inflamação e estresse oxidativo e acentuando a resistência à insulina (ALISI et al., 2017; TANASE et al., 2020). Marcadores bioquímicos de inflamação hepática, como TNF- α , e radicais livres tóxicos também são proeminentes (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017; NAIR; NATH, 2020). Fatores regulatórios como TGF- β e IL-10 modulam esses processos inflamatórios e a regeneração hepática (FONTES-CAL et al., 2021).

Associada à DHGNA, a resistência à insulina pode ser combatida por terapias farmacológicas, incluindo salicilatos, tiazolidinedionas e estatinas, que inibem atividade de IKK β e/ou NF- κ B (SHOELSON, 2006; SOLINAS; BECATTINI, 2017). Dados sugerem que o gene *Scd1*, crucial no metabolismo lipídico, é regulado em neonatos com DHGNA nascidos de mães que mantiveram uma HFD, sendo este processo mediado por IL-6 (CAO et al., 2020). Além disso, inibidores de FASN, como TVB-2640, podem reduzir a lipogênese hepática (JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022).

A DHGNA pode ainda estimular efeitos sistêmicos prejudiciais como ativação do sistema renina-angiotensina (RAS) - sistema nervoso simpático (SNS), induzindo hipertensão (HASSEN et al., 2022). Abordagens terapêuticas experimentais, como cenicriviroc, mostraram eficácia ao prevenir a infiltração de macrófagos Ly6C-positivos e inibir inflamação hepática e fibrose (MIURA et al., 2012). Contudo, marcadores de dano hepático, como ALT, apresentam limitações devido à falta de consenso sobre seus parâmetros (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017).

Para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na DHGNA, a pesquisa deve focar no estresse do RE, inflamação, fibrose e nas vias que regulam negativamente a sinalização de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; HU et al., 2021; PELLICANO et al., 2021; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022).

4 ER α E METABOLISMO

4.1 Efeitos do Estradiol e do ER α no Metabolismo

O estrogênio, principalmente o estradiol (E2), desempenha papel protetor na adiposidade visceral e resistência à insulina, atenuando o risco de DHGNA em mulheres (DUELL et al., 2022). O E2, atuando por meio do ER α , modula o metabolismo energético e a sensibilidade à insulina, elementos cruciais na prevenção da DHGNA (DUELL et al., 2022).

O ER α , em particular, vem sendo destacado na pesquisa por sua relação com a obesidade e resistência à insulina (DISTEFANO, 2020). Essencial na homeostase metabólica, ele regula o metabolismo energético e a resistência à insulina, com um importante mediador deste processo sendo o FGF21 (JIANG et al., 2021; DUELL et al., 2022).

O E2 e seus receptores ER alfa e beta possuem funções críticas em áreas como reprodução, ingestão alimentar, homeostase lipídica e glicêmica (HAN et al., 2014). Ademais, o E2 contribui para a manutenção da homeostase glicêmica em humanos e modelos de roedores, suas ações benéficas são mediadas pelo ER α (LOUET; LEMAY; MAUVAIS-JARVIS, 2004). Ele ainda regula o metabolismo energético, influenciando a função mitocondrial por meio de efeitos genômicos e não genômicos (HAMILTON et al., 2016).

O ER α também exerce papel crucial no metabolismo hepático e na resistência à insulina, contribuindo para a regulação da homeostase da glicose (DUELL et al., 2022). Além disso, a administração de E2 pode reduzir a expressão de SREBP-1 e o acúmulo de TG (HAN et al., 2014).

4.2 Impacto do ER α na DHGNA

O ER α é uma figura proeminente no desenvolvimento da DHGNA e resistência à insulina devido à sua relevância no metabolismo hepático (GUILLAUME et al., 2019). Sua deleção em modelos animais leva a esteatose hepática grave e resistência à insulina, enquanto a superexpressão ameniza a esteatose em camundongos ob/ob (DISTEFANO, 2020). Além disso, a perturbação da homeostase

do ER α foi relatada em pacientes com DHGNA, ressaltando sua importância na progressão da NASH e no desenvolvimento de esteatose hepática (GUO et al., 2022).

Mulheres pós-menopausa possuem maior risco de DHGNA em comparação aos homens. A prevalência geral de DHGNA é maior em homens, mas, após a menopausa, a taxa feminina eleva-se, igualando ou até superando a prevalência masculina na mesma faixa etária (LONARDO et al., 2019; DISTEFANO, 2020; FONTES-CAL et al., 2021). Nota-se ainda que a prevalência de NASH com fibrose avançada é maior em mulheres (COTTER; RINELLA, 2020).

Tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis para DHGNA incluem vitamina E, pioglitazona (agonista do receptor PPAR γ), agonistas do GLP-1, ligantes de FXR, PPAR, FGF21 e ER α como possíveis alvos terapêuticos (DING et al., 2020; HAN et al., 2020; TANASE et al., 2020; PATERNOSTRO; TRAUNER, 2022).

4.3 Modulação da Atividade e Expressão do ER α e seus Efeitos sobre a DHGNA

Estratégias terapêuticas emergentes, incluindo a modulação do ER α e terapias epigenéticas, apresentam potencial para o tratamento da DHGNA (DUELL et al., 2022). Estudos evidenciam a eficácia da ação sobre o ER α na resistência à insulina e DHGNA, atribuindo importância à redução dos níveis de 17 β -estradiol (E2) no metabolismo lipídico hepático pós-menopausa (DISTEFANO, 2020).

Experimentos com animais revelam o papel mediador do ER α nos efeitos benéficos do E2 em condições de intolerância à glicose e resistência à insulina. Em contraste, animais knockout para ER β não exibem alterações significativas em peso, massa gorda ou tolerância à glicose, reforçando a predominância do ER α na regulação metabólica (CAMPOREZ et al., 2013a).

A atividade e expressão do ER α em hepatócitos são fundamentais na prevenção da DHGNA, estando associados ao estresse do retículo endoplasmático (DISTEFANO, 2020; WANG et al., 2020). Agentes terapêuticos como o FGF21 e a betaina, um doador de metil independente de folato, estão sendo investigados para o tratamento de resistência à insulina e diabetes tipo 2, respectivamente (CAMPOREZ et al., 2013b; LEE et al., 2017).

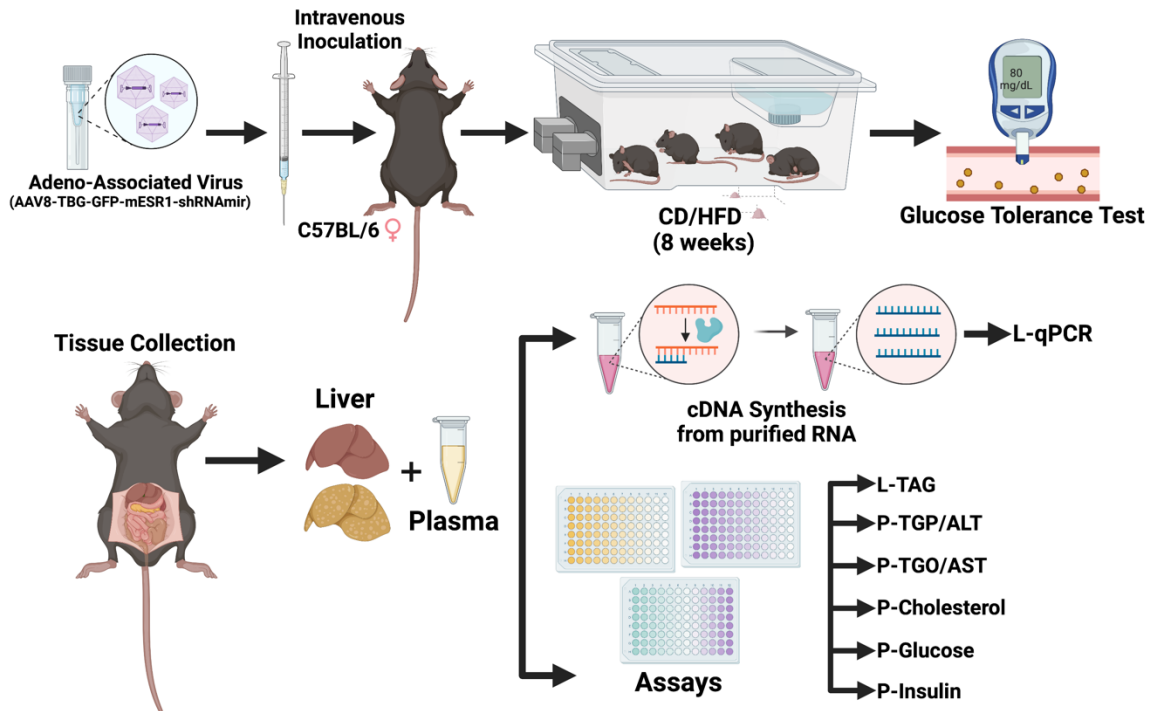
A modulação conjunta do ER α , FGF21 e abordagens epigenéticas pode otimizar o tratamento da DHGNA, resistência à insulina e diabetes tipo 2. A eficácia e

segurança destas estratégias, além de personalizações terapêuticas, requerem estudos futuros (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011; QUIÑONES; FERNØ; AL-MASSADI, 2019).

A investigação continuada é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas eficazes que considerem a heterogeneidade da DHGNA (DISTEFANO, 2020; EL-KASSAS et al., 2022).

5 MÉTODOS

Figura 1
Fluxograma dos métodos empregados no estudo do KD do ER α no fígado.
Assessing the Effects of Hepatic ER α KD in C57BL/6 Mice Subjected to CD and HFD



Legenda: Camundongos fêmeas C57BL6 receberam injeções de AAV8-TBG-GFP-mESR1-shRNAmir e foram alimentados com HFD por 8 semanas. Os animais foram submetidos a um GTT e, posteriormente, eutanasiados. Amostras de tecido hepático e plasma foram coletadas para análises. A expressão gênica no fígado foi avaliada por qPCR em tempo real (L-qPCR), o conteúdo de triglicérides hepáticos foi quantificado (L-TAG) e a atividade das enzimas hepáticas TGP/ALT e TGO/AST foi analisada no plasma (P-TGP/ALT e P-TGO/AST, respectivamente). Além disso, colesterol, glicose e insulina plasmáticos foram medidos (P-COLESTEROL, P-GLICOSE e P-INSULINA, respectivamente). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos controle e experimental utilizando testes estatísticos adequados.

Fonte: Autoria Própria (2023).

5.1 Obtenção de Camundongos C57BL/6 Fêmeas para Estudo do ER α KD e HFD

Para a realização do estudo, foi solicitado ao biotério central da USP de Ribeirão Preto o fornecimento de 16 camundongos fêmeas (*background* genético C57BL/6) com 6 semanas de idade, sob o protocolo CEUA 083/2021. Os animais foram mantidos em dieta padrão, disponível no próprio biotério, até atingirem 4 ou 8 semanas, momento em que foram inoculados com o vírus e iniciaram a HFD contendo 45% das calorias provenientes de gordura. O manejo dos animais seguiu as diretrizes e procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da

Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos em temperatura ambiente (22 °C) sob ciclo de claro-escuro de 12 horas e acesso *ad libitum* à água e ração.

5.2 Inoculação do AAV

Para avaliar os efeitos do ER α especificamente no fígado, foi realizada uma redução da expressão do gene no fígado utilizando um AAV (AAV8-TBG-GFP-mESR1-shRNAmir). Metade dos animais foram injetados com o AAV através da veia caudal às oito semanas de idade, enquanto a outra metade foi injetada com salina como controle. Após a inoculação, a HFD foi iniciada. Todos os camundongos foram selecionados aleatoriamente para o grupo controle ou experimental.

5.3 Análise de Composição Corporal de Camundongos por Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

A composição corporal dos camundongos foi analisada utilizando o Analisador de Composição Corporal Total *minispec* (Bruker), baseado em TD-NMR (Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo). O TD-NMR é uma técnica de análise que utiliza pulsos de radiofrequência e a detecção de sinais no domínio do tempo, permitindo obter informações sobre a composição e a estrutura de materiais, como tecidos biológicos, líquidos e sólidos. Diferentemente da Imagem por Ressonância Magnética (MRI), o TD-NMR foca na análise quantitativa e na caracterização de propriedades físicas e químicas, sem a formação de imagens detalhadas. O equipamento *minispec* foi projetado para medições *in vivo* em pequenos animais e permite a quantificação precisa de tecido magro, gordura e líquidos, sem a necessidade de anestesia. Os animais foram analisados conforme as recomendações do fabricante, e os resultados obtidos foram usados para avaliar as diferenças na composição corporal dos camundongos estudados.

5.4 Teste de Tolerância à Glicose – GTT

Após um período de jejum de 6 horas, os camundongos foram submetidos à injeção intraperitoneal de glicose (1 mg/kg de peso corporal - 10% de dextrose). As amostras de sangue para a medição da glicemia e da insulina plasmáticas foram coletadas por meio de sangramento da cauda em sete momentos distintos: antes da injeção da glicose (tempo 0) e aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. As amostras foram coletadas em tubos capilares heparinizados. A glicemia foi medida utilizando tiras reagentes e o monitor Accu-Chek Active (Roche), enquanto a insulina foi medida por meio de um ensaio de ELISA. Esse teste foi utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina e a capacidade do organismo em manter a homeostase da glicemia.

5.5 Dosagem de Insulina

Para a dosagem de insulina, foi utilizado o plasma de camundongos, obtido através de centrifugação do sangue coletado em tubos capilares heparinizados a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C. Esse plasma foi armazenado a -80°C para posterior análise. Quando as amostras foram necessárias, elas foram descongeladas em banho de gelo e analisadas através do kit de ELISA da Mercodia. Este kit implementa um método de "sanduíche direto", que utiliza dois anticorpos monoclonais que se ligam a diferentes partes da molécula de insulina. Inicialmente, as amostras de plasma foram introduzidas nos poços da placa do kit ELISA. Depois, anticorpos anti-insulina conjugados à peroxidase foram adicionados. A insulina presente na amostra se ligou aos anticorpos anti-insulina já fixados no poço da placa e simultaneamente aos anticorpos anti-insulina conjugados à peroxidase. Após uma série de lavagens para remover anticorpos não ligados, adicionou-se um substrato rotulado com TMB. Este substrato se ligou aos anticorpos conjugados, produzindo uma reação que foi interrompida com a adição de ácido, o que resultou na mudança de cor da solução. A intensidade desta cor, diretamente proporcional à quantidade de insulina presente na amostra, foi medida em um espectrofotômetro de microplaca. Por fim, a concentração de insulina nas amostras foi determinada utilizando uma curva padrão, e os resultados foram expressos em microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$).

5.6 Eutanásia dos Camundongos e Coleta de Amostras

Após 8 semanas da inoculação do AAV, os camundongos fêmeas foram submetidos à eutanásia seguindo os protocolos aprovados e de acordo com as diretrizes éticas para uso de animais em pesquisa. Imediatamente após a eutanásia, as amostras de tecido hepático e sangue foram coletadas para posterior análise. O sangue foi centrifugado para obter o plasma, que foi armazenado a -80 °C para análises futuras de glicose, colesterol e enzimas hepáticas. O tecido hepático foi coletado e dividido em porções adequadas para a realização de análises de triglicerídeos (TAG), extração de RNA, e colorações histológicas (Hematoxilina e Eosina e Oil Red O).

5.7 Extração de RNA e Análise por PCR Quantitativo

Para avaliar o impacto da manipulação genética na expressão gênica hepática de ER α e ER β , foram realizadas análises de RT-qPCR. As amostras de tecido hepático foram coletadas após o sacrifício dos animais e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit de extração de RNA RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA total utilizando o kit de síntese de cDNA Superscript III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR quantitativo foram preparadas com o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e as sequências de primers específicas para os genes de interesse. A análise de PCR quantitativo foi realizada utilizando o sistema de detecção de PCR em tempo real *StepOnePlus* (Applied Biosystems). Os dados de expressão gênica foram normalizados para a expressão do gene de referência β -Actin.

5.8 Dosagem de Glicose, Colesterol e Enzimas Hepáticas no Plasma

Após a eutanásia dos animais, o sangue foi coletado da veia cava inferior utilizando seringas heparinizadas e, em seguida, centrifugado (12000 rpm, 2 min) para

a separação do plasma. Foram utilizados os Kits Transaminase TGP e Transaminase TGO (Bioclin) para análise das enzimas hepáticas ALT e AST, o Kit Colesterol Monoreagente (Bioclin) para dosagem de colesterol e o Kit Glicose Monoreagente (Bioclin) para a dosagem de glicose no plasma. Esses procedimentos permitiram avaliar a saúde hepática dos animais e possíveis danos relacionados à dieta de alto teor lipídico e à manipulação genética. Os resultados foram expressos em unidades adequadas e comparados entre os grupos controle e experimental por meio de um teste estatístico apropriado.

5.9 Dosagem de TAG no Fígado

A dosagem de TAG no fígado foi realizada utilizando o Kit Triglicérides Monoreagente (Bioclin). Começamos com 50 a 100 mg de tecido fresco, preservado em nitrogênio líquido, e processamos com 1 mL de solução 1:2 de clorofórmio:metanol. Os lipídeos foram extraídos pela agitação das amostras em um Shaker à temperatura ambiente durante 3-4 horas. Posteriormente, adicionamos 200 μ L de solução 1M de H_2SO_4 , e os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 2000 rpm. O precipitado foi transferido para novos microtubos e as amostras foram deixadas para secar durante a noite. As amostras secas foram reconstituídas com 1 mL de isopropanol e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Para a dosagem, 2 μ L do extrato lipídico foram transferidos para uma placa de 96 poços e medidos utilizando o kit comercial, adaptando o volume para 200 μ L. A leitura foi realizada a 505 nm e os dados foram devidamente interpretados. Os resultados foram expressos em unidades adequadas e comparados entre os grupos controle e experimental por meio de um teste estatístico apropriado.

5.10 Coloração de Hematoxilina e Eosina – HE

Amostras de tecido hepático foram fixados em formalina, incluídos em parafina e seccionados em cortes finos (5-10 micrômetros) montados em lâminas de vidro. As secções foram desparafinizadas em xilol por 2 minutos, hidratadas em álcool absoluto (100%) por 5 minutos, álcool 95% por 3 minutos e água corrente por 2 minutos, e coradas com HE seguindo o protocolo padrão. As secções foram imersas

em hematoxilina de Mayer por 10 minutos, enxaguadas em água corrente por 10 minutos, imersas em água destilada e, em seguida, na solução de eosina Y por 5 segundos. A desidratação ocorreu em álcool 95% por 3 minutos e álcool absoluto por 5 minutos, seguida pela desparafinização em xilol por 2 minutos e montagem com lâminulas. As lâminas foram examinadas sob microscopia óptica, e as imagens capturadas e analisadas com software especializado para avaliar a morfologia e estrutura celular do tecido.

5.11 Coloração de Oil Red O – ORO

Para a coloração de *Oil Red O* (ORO), fragmentos de fígado foram imersos em um molde com *Tissue-Tek*® e colocados em um recipiente com álcool isopropílico e congelados em nitrogênio líquido. Cortes de 12 µm foram feitos em um criostato e três cortes de diferentes partes foram acomodados por lâmina. Em seguida, as lâminas foram coradas com ORO por 5 minutos, lavadas por 30 minutos, coradas com hematoxilina de *Harris* por 5 minutos e lavadas por 5 minutos. A coloração de ORO permitiu avaliar a presença de lipídios nos tecidos hepáticos dos animais, que pode ser um indicativo de esteatose hepática. Os resultados foram analisados por meio de microscopia de luz e comparados entre os grupos controle e experimental.

5.12 Método de Análise de Resultados

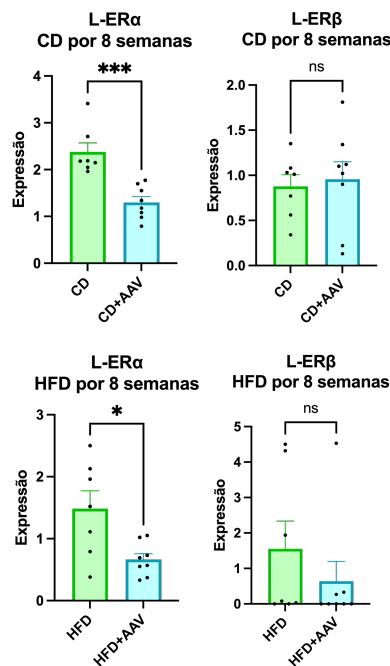
Foi utilizado o *software GraphPad Prism 9.0* para análise estatística dos resultados. O tamanho amostral adequado foi definido para garantir uma distribuição representativa das amostras em cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores e teste t de *Student*. O nível mínimo de significância aceitável foi de $p < 0,05$. Essa análise permitiu avaliar possíveis diferenças significativas entre os grupos controle e experimental em relação às variáveis avaliadas no estudo. Quando apropriado, o teste t de *Student* foi utilizado para comparar pares de grupos e verificar diferenças significativas entre eles. Os resultados foram apresentados em gráficos e tabelas e puderam ser utilizados para verificar a hipótese do estudo.

6 RESULTADOS

6.1 Manipulação Genética reduz a Expressão Hepática de ER α em Camundongos C57BL/6 Fêmeas

A análise da expressão gênica hepática de ER α e ER β foi realizada em camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas a duas dietas diferentes: high-fat diet (HFD) e chow diet (CD). Os resultados mostraram uma redução significativa na expressão de ER α no grupo experimental submetido à HFD em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças significativas na expressão de ER β entre os grupos experimentais e controle ($p > 0,05$). Além disso, a expressão gênica de ER α e ER β nos camundongos submetidos à CD não apresentou diferenças significativas em comparação com os grupos controle. Esses resultados indicam que a manipulação genética utilizada neste estudo foi eficaz em reduzir a expressão gênica hepática de ER α em camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas à HFD e CD.

Figura 2
Efeitos da manipulação genética na expressão de ER α e ER β no fígado de camundongos fêmeas C57BL/6 submetidas à HFD e CD.



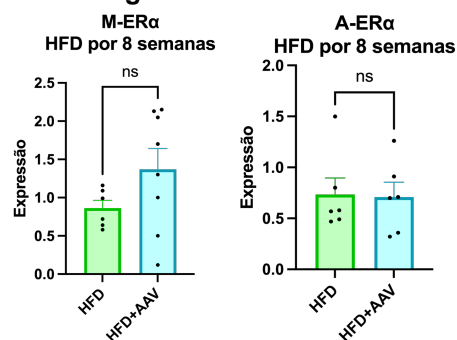
Legenda: A análise de RT-qPCR mostrou uma diminuição significativa na expressão hepática de ER α no grupo experimental em comparação ao grupo controle. No entanto, a expressão de ER β não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Os dados são representados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 por grupo). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo controle.

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.2 Manipulação Genética não reduz a Expressão de ER α no Tecido Muscular Esquelético e Tecido Adiposo

Nesta investigação, avaliamos a eficácia da manipulação genética na redução da expressão de ER α no tecido muscular esquelético e adiposo de camundongos C57BL/6 fêmeas. A análise da expressão gênica, conduzida em grupos experimentais e controle submetidos à HFD, revelou ausência de diferenças significativas. Conforme esperado, os resultados confirmam a seletividade e especificidade da manipulação genética, que não afetou a expressão de ER α nos referidos tecidos.

Figura 3
Efeitos da manipulação genética na expressão de ER α no tecido muscular esquelético e tecido adiposo de camundongos fêmeas C57BL/6 submetidas à HFD.



Legenda: A análise de RT-qPCR mostrou que não houve diferença significativa na expressão hepática de ER α nos grupos. Os dados são representados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 por grupo).

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.3 Redução da Expressão de ER α resulta em aumento no Peso Corporal Total e na Massa Gorda, sem alterações na Massa Magra, após 8 semanas de HFD, sem alterações no Peso Corporal Total após 8 semanas de CD

Investigamos o impacto da CD e da HFD no peso corporal total e na composição corporal - avaliada em termos de massa magra e massa gorda - em dois grupos de camundongos: o grupo controle e o grupo com ER α KD por AAV.

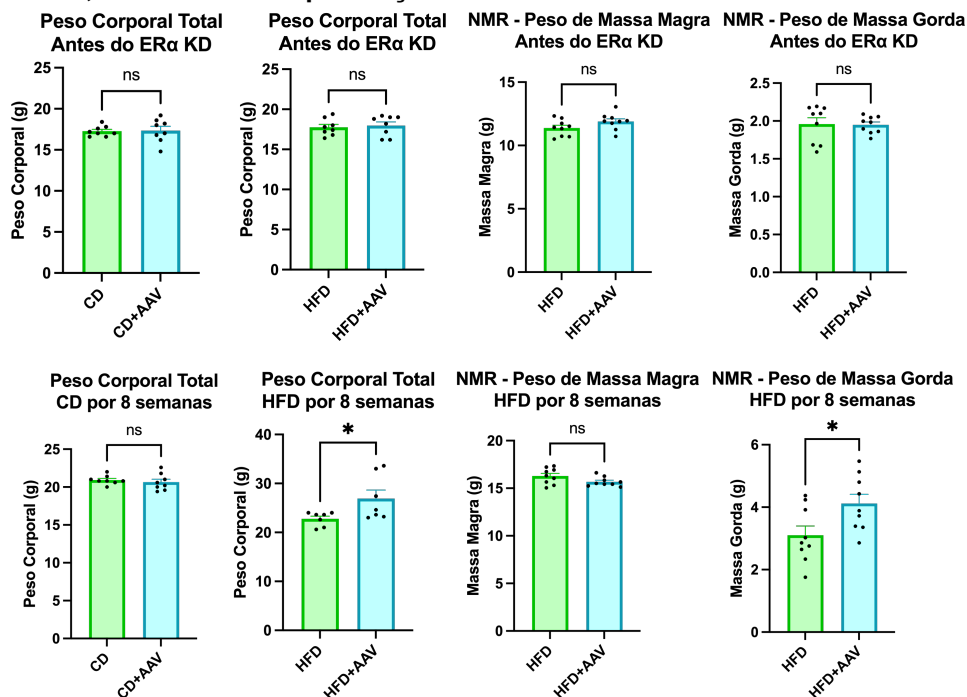
Iniciamos a avaliação antes da implementação das dietas e da redução do ER α . Nesse momento, o peso corporal total não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Após 8 semanas de dieta, contudo, notamos alterações distintas. No grupo que recebeu a HFD, houve um aumento significativo no peso corporal total

especificamente no grupo ER α KD, em comparação ao grupo controle submetido à mesma dieta. Por outro lado, no grupo que recebeu a CD, não houve alterações significativas no peso corporal total em ambos os grupos, controle e ER α KD, após o mesmo período.

No que se refere à composição corporal, analisada através da NMR, observamos que, antes da indução de ER α KD, não houve diferenças significativas na massa magra ou na massa gorda entre os grupos. No entanto, após 8 semanas de HFD, constatamos um aumento significativo na massa gorda no grupo ER α KD quando comparado ao grupo controle, enquanto a massa magra não apresentou diferenças significativas.

Figura 4

Comparação do peso corporal total antes e após 8 semanas de dietas diferentes (CD e HFD), bem como da composição corporal (massa magra e massa gorda) antes e após 8 semanas de HFD, considerando a presença ou ausência de ER α KD através do AAV.



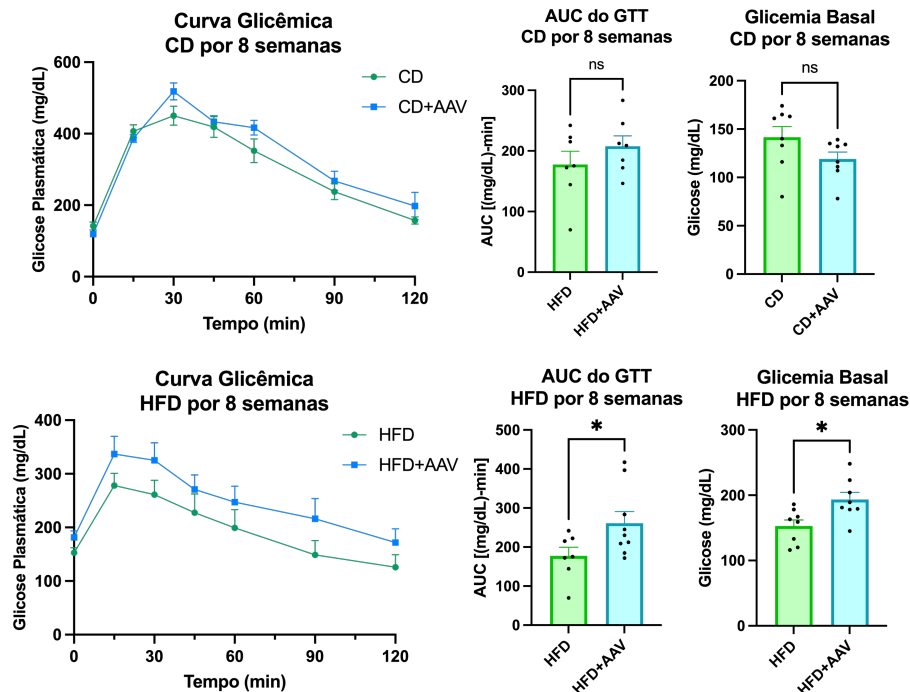
Legenda: Para o peso corporal total, antes da indução de ER α KD, não houve diferenças significativas entre os grupos. Após 8 semanas de dietas CD e HFD, observamos um aumento significativo no peso corporal total no grupo ER α KD submetido à HFD, enquanto no grupo submetido à CD, não foram notadas diferenças significativas. Em relação à composição corporal, avaliada apenas no grupo submetido à HFD, notou-se um aumento significativo na massa gorda no grupo ER α KD, enquanto a massa magra não apresentou alterações significativas. Os dados são representados como média \pm erro padrão da média (n = 8-10 por grupo para os dados de massa magra e gorda, n = 6-8 animais por grupo para os dados de peso corporal total). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle.

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.4 Redução de ER α mediada por AAV aumenta glicemia e AUC em camundongos alimentados com HFD por 8 semanas, mas não em camundongos alimentados com CD

O experimento avaliou o efeito da redução da expressão do receptor de ER α mediada pelo AAV sobre o metabolismo hepático em camundongos alimentados com HFD ou CD por 8 semanas. Os resultados mostraram que no grupo HFD, a curva glicêmica e a área sob a curva (AUC) foram estatisticamente elevadas no grupo experimental (inoculado com AAV) em comparação com o grupo controle (sem AAV). Além disso, a glicemia basal foi estatisticamente elevada no grupo experimental em relação ao grupo controle. No entanto, no grupo CD, não houve diferença estatística na curva glicêmica e AUC entre o grupo experimental e o grupo controle, e a glicemia basal não apresentou alteração estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental CD.

Figura 5
Análise do impacto da redução de ER α mediada por AAV nas curvas glicêmicas e AUC em camundongos fêmeas C57BL/6 submetidos à HFD ou CD por 8 semanas.



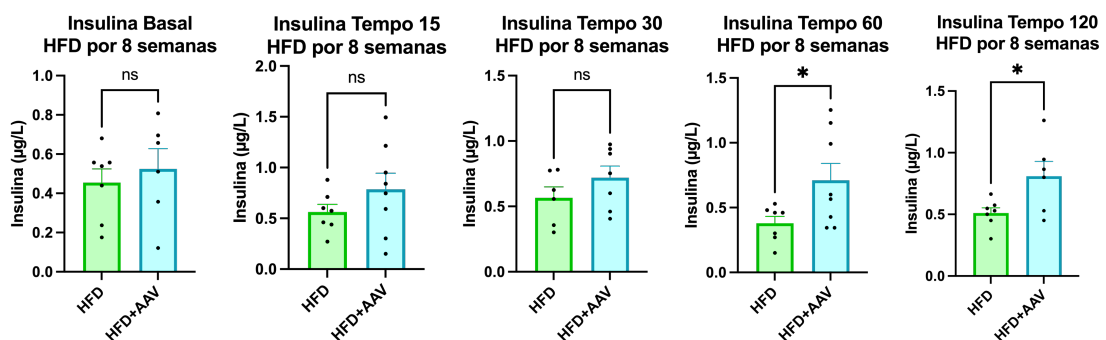
Legenda: (a) Curvas de tolerância à glicose em camundongos HFD e CD, tanto no grupo controle quanto no experimental, após administração intraperitoneal de glicose. (b) AUC de tolerância à glicose nos grupos HFD e CD. (c) Níveis de glicose basal nos grupos HFD e CD, controle e experimental. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ indica diferença significativa em relação ao grupo controle HFD; ** $p < 0,01$ denota diferença altamente significativa.

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.5 Resposta Insulínica amplificada a partir dos 60 minutos em camundongos com redução de ER α mediada por AAV alimentados com HFD por 8 semanas

No estudo da dosagem de insulina, analisamos o grupo de camundongos alimentados com uma HFD por 8 semanas em diferentes intervalos de tempo após a administração de glicose. Embora não tenha sido observada uma alteração significativa nas concentrações de insulina no grupo HFD no início (Basal) e aos 15 e 30 minutos, o grupo AAV apresentou valores elevados em comparação ao grupo controle. A partir de 60 minutos, e mantendo-se até os 120 minutos, registramos uma elevação significativa das concentrações de insulina no grupo AAV, que foram cerca de duas vezes maiores em relação ao grupo controle.

Figura 6
Efeito da HFD na concentração de insulina ao longo do tempo em camundongos do grupo AAV.



Legenda: As medições foram feitas em diferentes intervalos de tempo após a administração de glicose: Basal (inicial), 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos. O grupo AAV apresentou uma concentração de insulina consistentemente mais alta, com aumentos significativos observados a partir dos 60 minutos, sendo cerca de duas vezes maior em comparação com o grupo controle.

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.6 Parâmetros Bioquímicos são afetados pela redução da Expressão Hepática de ER α em camundongos fêmeas C57BL/6 alimentados com HFD por 8 semanas

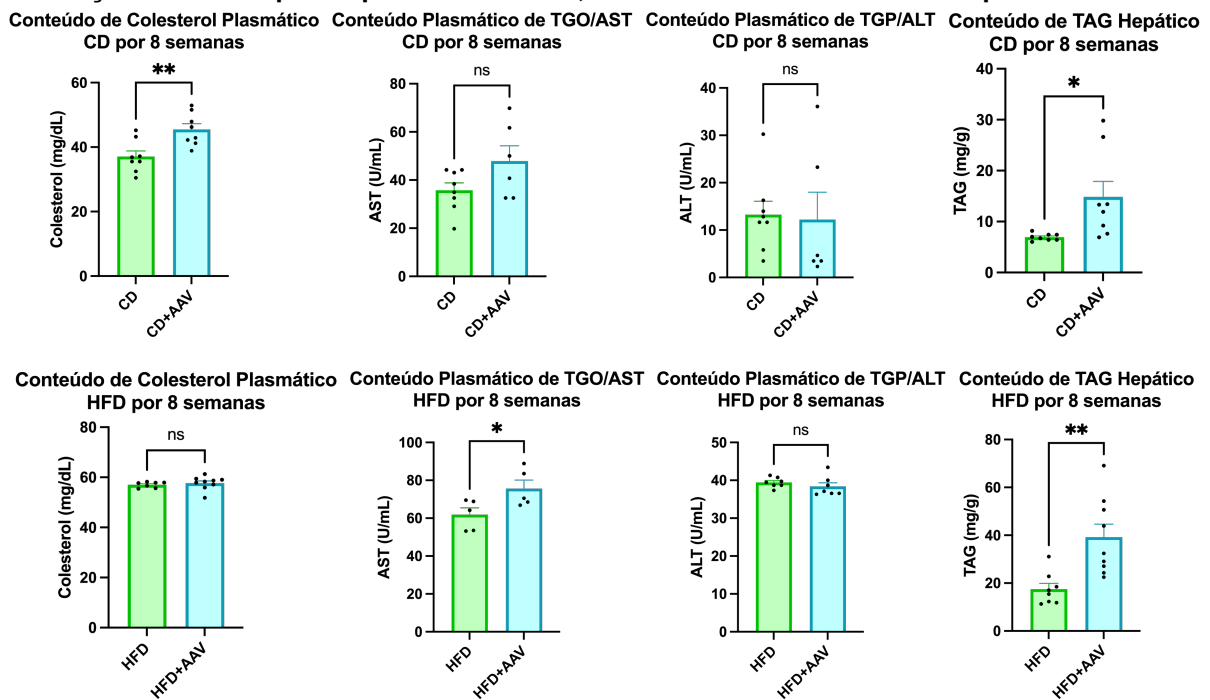
Na análise dos resultados referentes aos níveis bioquímicos do grupo submetido à CD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), observou-se uma elevação estatisticamente significativa na concentração de colesterol e nos níveis de TAG em comparação ao grupo controle. As enzimas AST e ALT, no entanto, não apresentaram diferenças significativas neste grupo em relação

ao grupo controle. A análise histológica com colorações HE e ORO mostrou acúmulo de TAG no fígado, porém não tão evidente quanto no grupo HFD.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), não foram observadas diferenças significativas na concentração de colesterol em comparação ao grupo controle. Entretanto, a atividade da enzima AST foi estatisticamente elevada neste grupo, assim como os níveis de TAG. A enzima ALT não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos. A análise histológica com colorações HE e ORO evidenciou acúmulo de TAG no fígado dos animais deste grupo, sendo esse acúmulo muito maior quando comparado ao grupo CD.

Figura 7

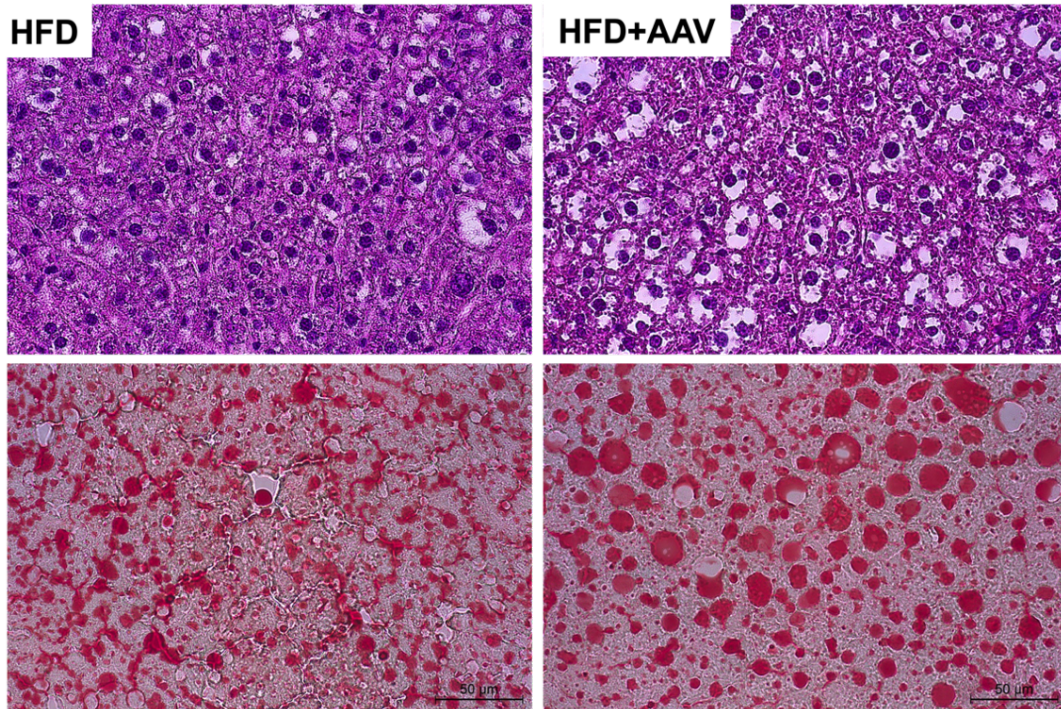
Comparação do acúmulo de lipídios e atividade enzimática no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma HFD ou CD por 8 semanas.



Legenda: A análise incluiu medições de colesterol, AST, ALT e TAG. O grupo HFD apresentou maior acúmulo de TAG e atividade de AST quando comparado ao grupo CD. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle; **p<0,01 denota diferença altamente significativa.

Fonte: Autoria Própria (2023).

Figura 8
Análise de coloração HE e ORO em camundongos submetidos a uma HFD por 8 semanas e tratados com a redução do ER α hepático via AAV, comparando-os ao grupo controle.



Legenda: Colorações histológicas com HE e ORO para visualizar o acúmulo de TAG no fígado. Fonte: Autoria Própria (2023).

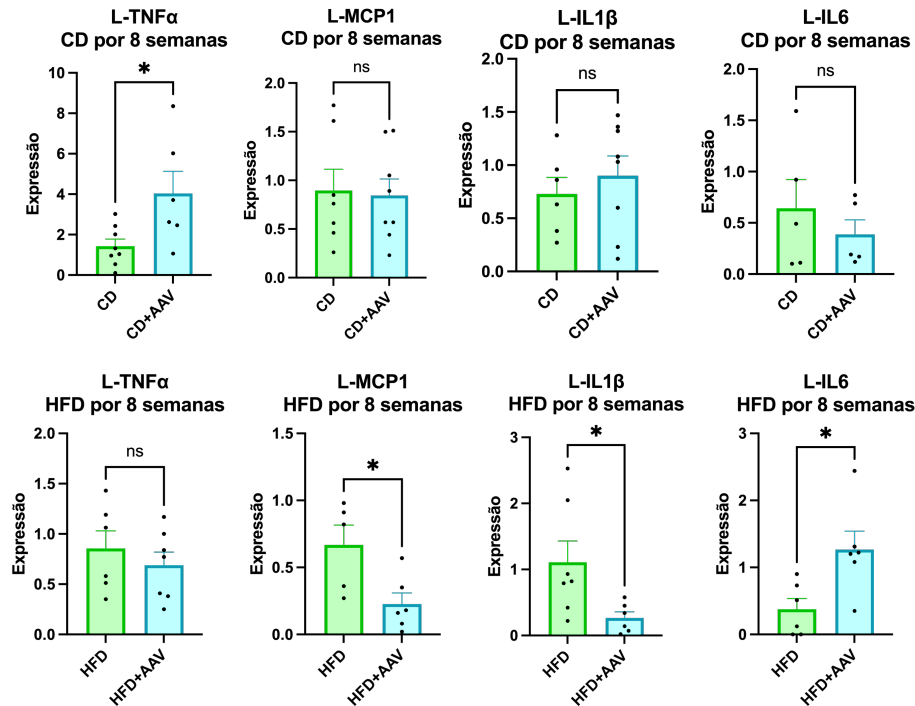
6.7 Tendências na Expressão de Marcadores de Inflamação Hepática em camundongos submetidos à CD e HFD: Marcadores Pró-Inflamatórios

Na análise da expressão de marcadores pró-inflamatórios no fígado de camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD por 8 semanas (grupo AAV), observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão do marcador TNF- α em comparação ao grupo controle. No entanto, os marcadores MCP1, IL-1 β e IL-6 não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), a expressão do marcador pró-inflamatório TNF- α não apresentou diferenças significativas em comparação ao grupo controle. Entretanto, a expressão dos marcadores MCP1 e IL-1 β foi estatisticamente diminuída neste grupo, enquanto a expressão de IL-6 foi estatisticamente elevada em relação ao grupo controle.

Figura 9

Comparação da expressão de marcadores pró-inflamatórios no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: A análise incluiu a quantificação da expressão de TNF- α , MCP1, IL1 β e IL-6. O grupo HFD apresentou alterações variadas na expressão dos marcadores, enquanto o grupo CD apresentou aumento estatisticamente significativo apenas na expressão de TNF- α . Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle.

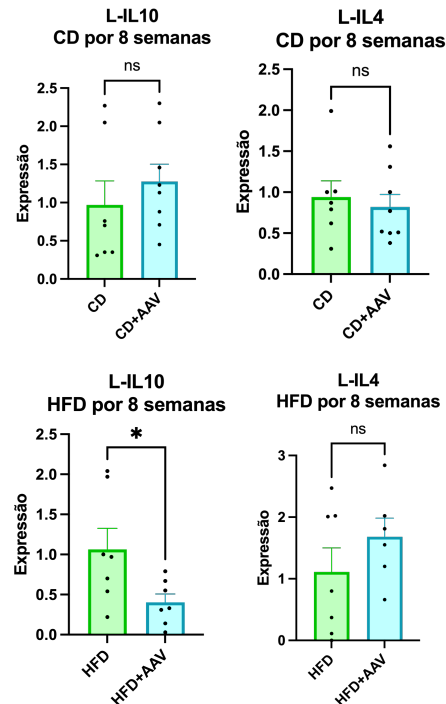
Fonte: Autoria Própria (2023).

6.8 Tendências na Expressão de Marcadores de Inflamação Hepática em camundongos submetidos à CD e HFD: Marcadores Anti-Inflamatórios

Ao avaliar a expressão de marcadores anti-inflamatórios no fígado de camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD por 8 semanas (grupo AAV), não foram observadas diferenças significativas na expressão dos marcadores IL-10 e IL-4 em comparação ao grupo controle.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), a expressão do marcador anti-inflamatório IL-10 apresentou uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. No entanto, a expressão de IL-4 não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos.

Figura 10
Comparação da expressão de marcadores anti-inflamatórios no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: A análise incluiu a quantificação da expressão de IL-10 e IL-4. O grupo HFD apresentou diminuição estatisticamente significativa na expressão de IL-10, enquanto o grupo CD não apresentou diferenças significativas na expressão dos marcadores anti-inflamatórios. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle.

Fonte: Autoria Própria (2023).

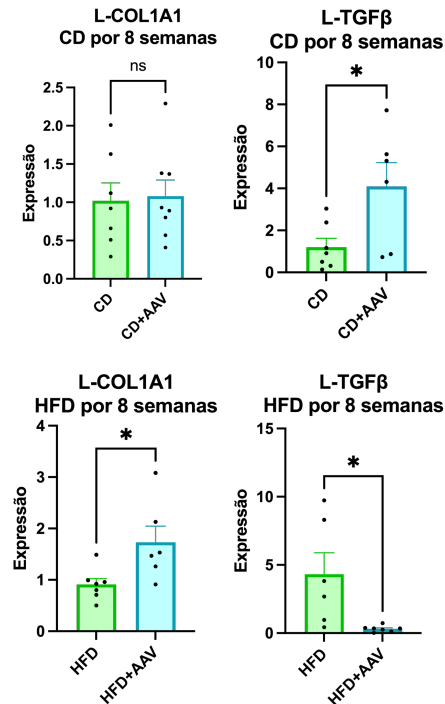
6.9 Expressão de Marcadores de Fibrose Hepática em camundongos alimentados com HFD é afetada pela redução da Expressão Hepática de ER α

Ao analisar a expressão de marcadores de fibrose hepática em camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD por 8 semanas (grupo AAV), não foram observadas diferenças significativas na expressão de COL1A1 em comparação ao grupo controle. No entanto, a expressão do marcador TGF β foi estatisticamente elevada neste grupo em relação ao grupo controle.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), a expressão do marcador de fibrose hepática COL1A1 apresentou um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a expressão de TGF β foi estatisticamente diminuída neste grupo em relação ao grupo controle.

Figura 11

Comparação da expressão de marcadores de fibrose hepática no fígado de camundongos com redução do ER α hepático por meio do AAV, submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: A análise incluiu a quantificação da expressão de COL1A1 e TGF β . O grupo HFD apresentou aumento estatisticamente significativo na expressão de COL1A1 e diminuição na expressão de TGF β , enquanto o grupo CD apresentou elevação significativa apenas na expressão de TGF β . Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle.

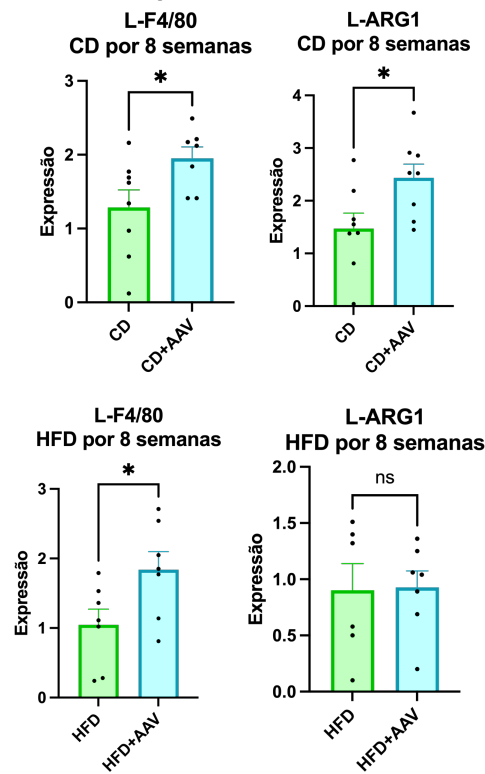
Fonte: Autoria Própria (2023).

6.10 Expressão de Marcadores de Atividade Macrófagica Hepática é afetada pela redução da Expressão Hepática de ER α em camundongos submetidos à HFD por 8 semanas

Ao avaliar os resultados relacionados à expressão de marcadores de atividade macrófagica hepática, no grupo submetido à CD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão dos marcadores F4/80 e Arg1 em comparação ao grupo controle.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), observou-se um aumento significativo na expressão do marcador F4/80 em comparação ao grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão de Arg1 em comparação ao grupo controle.

Figura 12
Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de marcadores de atividade macrófaga hepática F4/80 e Arg1 em camundongos submetidos a uma CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle.

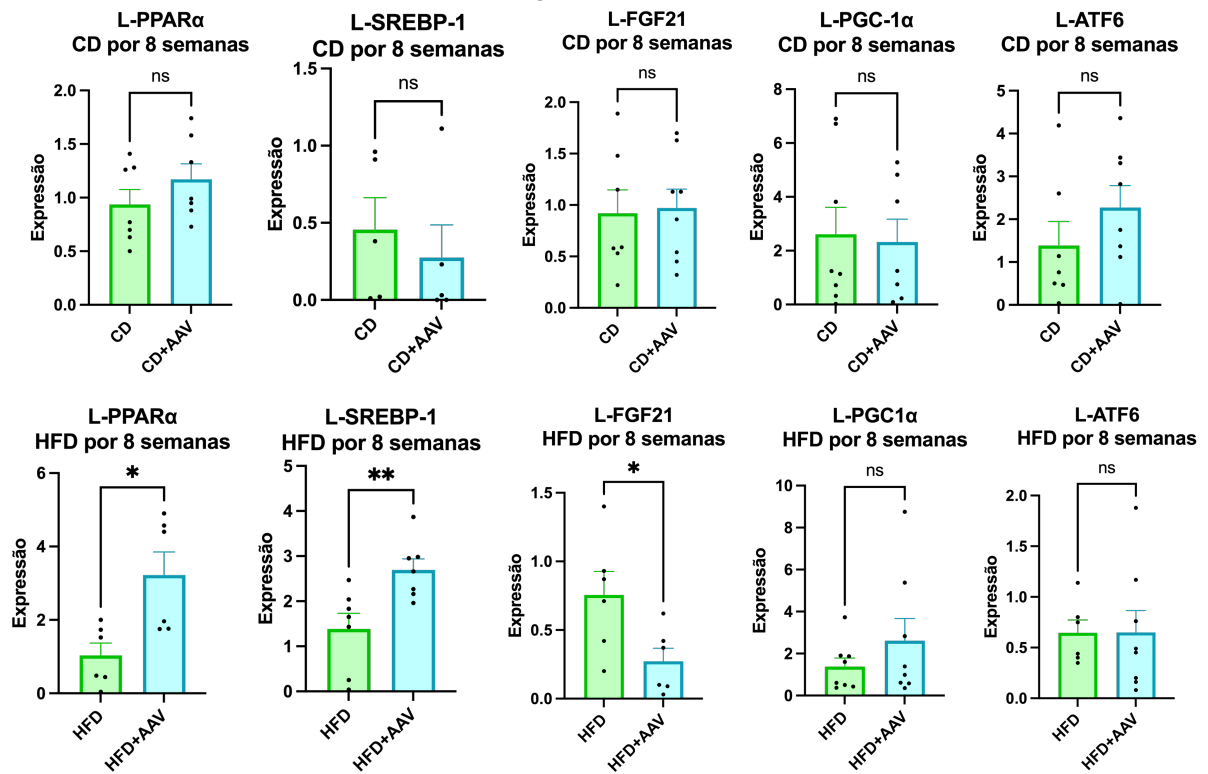
Fonte: Autoria Própria (2023).

6.11 Expressão de PPAR α , SREBP1 e FGF21 é afetada pela redução da Expressão Hepática de ER α em camundongos submetidos a HFD por 8 semanas, enquanto PGC-1 α e ATF6 não são afetados

Na análise dos fatores de transcrição e hormônios em camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD por 8 semanas (grupo AAV), não foram observadas diferenças significativas na expressão de PPAR α , SREBP1, FGF21, PGC-1 α e ATF6 em comparação ao grupo controle.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão de PPAR α e SREBP1 e uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de FGF21 em comparação ao grupo controle. No entanto, não foram observadas alterações significativas na expressão de PGC-1 α e ATF6.

Figura 13
Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de fatores de transcrição (PPAR α , SREBP1, PGC-1 α e ATF6) e hormônio (FGF21) em camundongos submetidos à CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle; **p<0,01 denota diferença altamente significativa.

Fonte: Autoria Própria (2023).

6.12 Variações nos Marcadores de Estresse e Sinalização Celular em camundongos com redução da Expressão Hepática de ER α submetidos à CD e HFD por 8 semanas

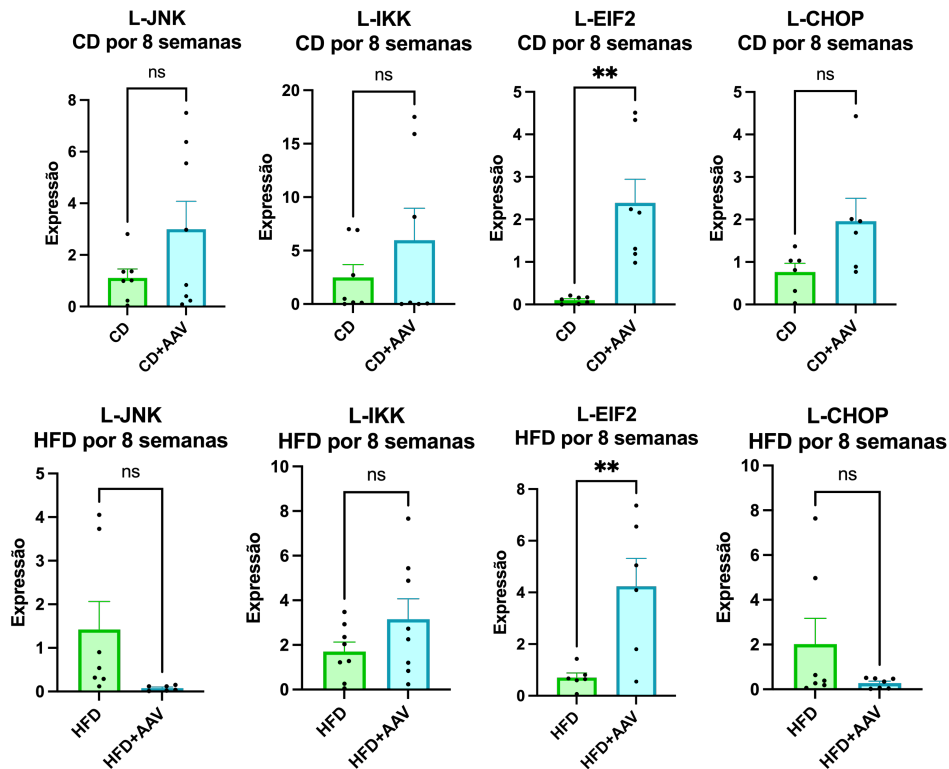
Na análise dos marcadores de estresse e sinalização celular em camundongos com redução da expressão hepática de ER α , foram observadas variações nos grupos submetidos à CD e HFD por 8 semanas. No grupo CD, JNK apresentou um aumento não significativo em relação ao grupo controle, enquanto IKK não mostrou alterações significativas. Além disso, EIF2 teve um aumento significativo no grupo AAV em comparação ao grupo controle, e CHOP, embora sem alterações significativas, também foi elevado em relação ao grupo controle.

Por outro lado, no grupo HFD com redução de ER α , JNK apresentou uma diminuição não significativa em relação ao grupo controle, e IKK manteve-se sem alterações significativas. O marcador EIF2 apresentou um aumento significativo no

grupo AAV, chegando a aproximadamente o dobro do valor observado no grupo CD. Por fim, CHOP não exibiu alterações significativas, mas apresentou uma diminuição em relação ao grupo controle.

Figura 14

Análise de marcadores de estresse e sinalização celular em camundongos com redução da expressão hepática de ER α submetidos à CD e HFD por 8 semanas.



Legenda: Os resultados mostram as variações nos marcadores JNK, IKK, EIF2 e CHOP em ambos os grupos. A expressão de EIF2 apresentou um aumento significativo no grupo AAV, tanto no grupo CD quanto no grupo HFD, em comparação ao grupo controle. As expressões de JNK e CHOP mostraram alterações não significativas, mas estavam elevadas (JNK) ou diminuídas (CHOP) em relação ao grupo controle. IKK manteve-se sem alterações significativas nos dois grupos. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). * $p < 0,05$ indica diferença significativa em relação ao grupo controle; ** $p < 0,01$ denota diferença altamente significativa.

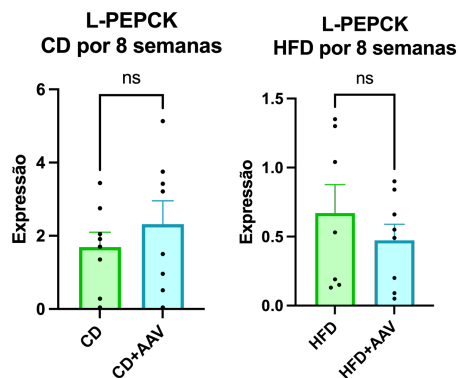
Fonte: Autoria Própria (2023).

6.13 Alterações na Expressão da Enzima PEPCK em camundongos submetidos à CD e HFD por 8 semanas com redução da Expressão Hepática de ER α

A análise das enzimas envolvidas no metabolismo energético, com foco na PEPCK, revelou que nos grupos submetidos à CD e HFD por 8 semanas com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), houve variações na expressão dessa enzima. No grupo CD com redução de ER α , PEPCK não apresentou alterações

significativas, mas mostrou uma elevação leve em relação ao grupo controle. Já no grupo HFD com redução de ER α , PEPCK não apresentou alterações significativas, porém sua expressão estava levemente diminuída em relação ao grupo controle. Adicionalmente, tanto o grupo controle quanto o grupo AAV da HFD apresentaram níveis de PEPCK reduzidos quando comparados ao grupo CD.

Figura 15
Variação na expressão da enzima PEPCK em camundongos submetidos à CD e HFD por 8 semanas.



Legenda: Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo).

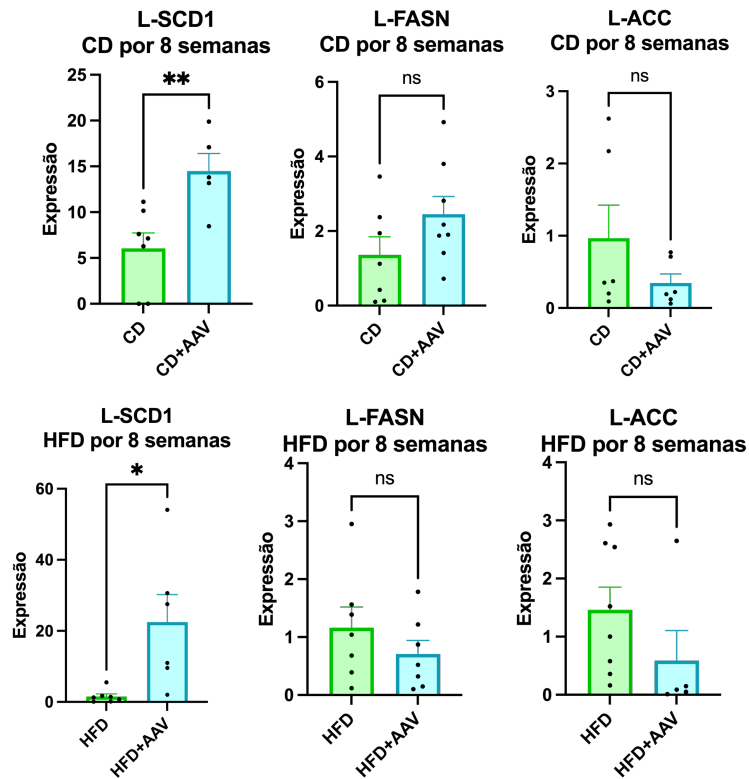
Fonte: Autoria Própria (2023).

6.14 Expressão Hepática de SCD1 é significativamente elevada em camundongos alimentados com HFD e CD após redução da Expressão Hepática de ER α , enquanto FASN e ACC permanecem inalterados

Na análise das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, no grupo submetido à CD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão de SCD1 em comparação ao grupo controle. No entanto, a expressão de FASN e ACC não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos.

No grupo submetido à HFD por 8 semanas e com redução da expressão hepática de ER α (grupo AAV), a expressão de SCD1 foi estatisticamente elevada, sendo aproximadamente o dobro em comparação ao grupo CD. A expressão de FASN e ACC, no entanto, não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Figura 16
Efeitos da redução da expressão hepática de ER α sobre a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (SCD1, FASN e ACC) em camundongos submetidos à CD ou HFD por 8 semanas.



Legenda: Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n = 6-8 animais por grupo). *p<0,05 indica diferença significativa em relação ao grupo controle; **p<0,01 denota diferença altamente significativa.

Fonte: Autoria Própria (2023).

7 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, avaliamos com sucesso a redução de ER α mediada por AAV. Demonstramos que a manipulação genética permite diminuir de maneira seletiva a expressão de ER α no fígado, sem interferir com ER β . Essa estratégia permitiu investigar com maior especificidade o papel de ER α na regulação do metabolismo hepático e na resposta ao HFD em camundongos fêmeas, contornando possíveis efeitos compensatórios devido à modulação de ambos os receptores de estrogênio (CAMPOREZ et al., 2013a). Confirmamos ainda que a modificação genética produziu efeitos específicos no fígado, não alterando de maneira significativa a expressão gênica de ER α no tecido muscular esquelético e adiposo dos animais avaliados.

Nossa análise revelou que a redução da expressão de ER α mediada pelo AAV não afeta consideravelmente o peso corporal total de camundongos alimentados com uma dieta padrão (CD) por 8 semanas. Entretanto, quando os camundongos foram submetidos a uma dieta rica em gordura (HFD) pelo mesmo período, observamos um aumento significativo no peso corporal total no grupo com ER α KD. Estes dados sugerem uma possível interação sinérgica entre a redução da expressão hepática de ER α e a HFD, que pode levar a um aumento no peso corporal, possivelmente devido a um desequilíbrio na captação e oxidação de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo (HAN et al., 2014; LIAO et al., 2015).

Em relação à composição corporal, notamos que a redução de ER α não resultou em mudanças significativas na massa magra dos camundongos alimentados com HFD, sugerindo um papel limitado de ER α na regulação da massa magra. Contudo, o papel do ER α se tornou mais evidente quando observamos a massa gorda. Após 8 semanas de HFD, identificamos um aumento significativo na massa gorda no grupo ER α KD em comparação com o grupo controle. Este resultado enfatiza a participação crítica do ER α na regulação do acúmulo de gordura, com implicações diretas no metabolismo hepático e na susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças metabólicas.

Com base nesses achados, propomos que as diferenças no ganho de peso e na composição corporal observadas entre os grupos são devidas às alterações metabólicas induzidas pela redução da expressão de ER α no fígado. Isso pode incluir alterações na lipólise, lipogênese, metabolismo da glicose e inflamação hepática

(HEINE et al., 2000; LOUET; LEMAY; MAUVAIS-JARVIS, 2004; CAMPOREZ et al., 2013a).

O impacto negativo da redução de ER α mediada por AAV na regulação da glicemia e na AUC é aparente em camundongos alimentados com HFD, mas não com CD. Esta observação sublinha a interação crucial entre a diminuição da expressão hepática de ER α e a HFD no comprometimento da homeostase glicêmica e do metabolismo da glicose, com implicações potenciais na patogênese da resistência à insulina e diabetes tipo 2 (HAN et al., 2014; DISTEFANO, 2020).

O aumento da glicemia e da AUC no grupo experimental HFD pode ser consequência de maior resistência à insulina, desencadeada pelas mudanças metabólicas e inflamatórias provocadas pela HFD em sinergia com a redução da expressão de ER α (DISTEFANO, 2020; DUELL et al., 2022).

No experimento de dosagem de insulina com camundongos alimentados com HFD por 8 semanas, observamos uma resposta distinta no grupo AAV, com níveis de insulina consistentemente mais elevados a partir dos 60 minutos. Isso pode indicar resistência à insulina, condição frequentemente associada à obesidade e diabetes tipo 2 (MUOIO; NEWGARD, 2008; ZAMORA; VILLENA, 2014). A manipulação genética no grupo AAV parece potencializar essa resposta à HFD, refletindo possivelmente uma dinâmica metabólica complexa (CAMPOREZ et al., 2013a). Esses achados sublinham a necessidade de investigar a interação entre dieta e manipulação genética na regulação da insulina e homeostase da glicose (PERLA et al., 2017; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência à insulina é fundamental (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

O papel fundamental do estrogênio e seus receptores, como ER α , na regulação do metabolismo energético e na homeostase glicêmica é bem documentado (DISTEFANO, 2020; JIANG et al., 2021). A diminuição da expressão de ER α pode prejudicar a sinalização do estrogênio, intensificando as alterações metabólicas provocadas pela HFD e contribuindo para o desenvolvimento de resistência à insulina e disfunção metabólica (DISTEFANO, 2020; WANG et al., 2020). A estabilidade da glicemia e AUC em camundongos alimentados com CD corrobora a hipótese de que a combinação de redução da expressão hepática de ER α e HFD é essencial para o aparecimento de desordens metabólicas e glicêmicas (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; HAN et al., 2020).

A análise bioquímica indica que a redução de ER α mediada por AAV pode influenciar o metabolismo hepático, notadamente em camundongos alimentados com HFD. A elevação de AST e TAG pode ser indicativa de lesão hepatocelular e esteatose hepática, respectivamente, possivelmente decorrentes da regulação do ER α no fígado. Esses dados são corroborados pela histologia, que apresenta maior acúmulo hepático de TAG nos camundongos do grupo HFD.

A interação entre a HFD e a redução da expressão hepática de ER α pode intensificar o acréscimo de TAG hepático, comprometendo a capacidade do fígado de metabolizar e exportar lipídios, o que realça a importância do estrogênio via ER α na regulação do metabolismo lipídico (PERLA et al., 2017; DUELL et al., 2022; CHO; KWON; HWANG, 2023).

Depois de 8 semanas, a elevação nos níveis de AST no grupo AAV sugere uma possível correlação entre a diminuição da expressão hepática de ER α e uma maior incidência de estresse ou lesão hepática crônica (JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Porém, a estabilidade dos níveis de ALT indica ausência de lesão hepática aguda. O aumento dos níveis de AST pode também refletir alterações metabólicas ou inflamatórias em outros tecidos, como músculos e coração (ZOU et al., 2020; O'FARRELL et al., 2022).

Níveis elevados de colesterol e TAG no grupo CD podem estar relacionados a respostas compensatórias no metabolismo lipídico do fígado ou à influência do contexto metabólico e nutricional na redução da expressão de ER α (PERLA et al., 2017). No entanto, a ausência de diferenças significativas nos níveis de AST e ALT sugere que a diminuição da expressão de ER α pode não ser suficiente para provocar lesão hepática significativa nesse grupo (HADIZADEH; FAGHIHIMANI; ADIBI, 2017).

Contrastando com o grupo CD, no grupo HFD, os níveis de colesterol permanecem estáveis após 8 semanas, o que sugere que a HFD impõe uma sobrecarga no metabolismo lipídico do fígado, alterando a metabolização do colesterol e mitigando o impacto da redução da expressão de ER α (PAN et al., 2017; PERLA et al., 2017).

Em resumo, a redução da expressão hepática de ER α em camundongos alimentados com HFD afeta a histologia hepática e o acúmulo de TAG, sugerindo uma influência no desenvolvimento de esteatose hepática crônica. Estes achados destacam a importância do estrogênio via ER α na regulação do metabolismo lipídico

e ressaltam a interação entre a HFD e a redução da expressão hepática de ER α no surgimento de anormalidades metabólicas e glicêmicas, considerando também os mecanismos compensatórios e contextos metabólicos e nutricionais distintos entre os grupos de camundongos.

Ao investigar a expressão de marcadores pró-inflamatórios no fígado, observou-se que a redução da expressão hepática de ER α pelo AAV impacta diferentemente esses marcadores em camundongos alimentados com HFD. Observou-se uma atenuação da resposta inflamatória, indicada pela diminuição na expressão de MCP1 e IL-1 β . No entanto, a expressão elevada de IL-6 sugere uma inflamação hepática potencializada nesse grupo de animais (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Já em camundongos submetidos à CD por 8 semanas, com a redução da expressão hepática de ER α , detectou-se um aumento significativo na expressão do marcador TNF- α , comparado ao grupo controle. Surpreendentemente, essa alteração não foi reproduzida no grupo HFD com redução de ER α , onde a expressão de TNF- α não apresentou variação significativa (CAELLES et al., 2016; TANASE et al., 2020).

As diferenças na expressão de TNF- α entre os grupos sugerem a existência de mecanismos ainda não descobertos que podem influenciar a regulação deste marcador pró-inflamatório, além da interação entre a modulação do ER α e a dieta adotada. Portanto, esses resultados sinalizam uma complexa interação entre a modulação do ER α e a regulação da inflamação hepática, cujos detalhes ainda necessitam de investigação mais aprofundada.

A análise da expressão de marcadores anti-inflamatórios no fígado evidencia um impacto distinto da modulação da expressão hepática de ER α e da dieta hiperlipídica nos marcadores anti-inflamatórios hepáticos de camundongos. No grupo alimentado com CD, a invariabilidade na expressão de IL-10 e IL-4 sugere que a redução da expressão hepática de ER α , neste contexto, não afeta de forma significativa a resposta anti-inflamatória (FONTES-CAL et al., 2021).

Já no grupo alimentado com HFD, a expressão significativamente reduzida de IL-10 sinaliza um possível desequilíbrio na resposta inflamatória, favorecendo a prevalência de mediadores pró-inflamatórios. A expressão de IL-4, no entanto, não se alterou significativamente, indicando que este marcador pode ser menos suscetível à interação entre a dieta hiperlipídica e a redução da expressão hepática de ER α .

Os dados resultantes da análise da expressão de marcadores de fibrose hepática sugerem um impacto diferenciado da redução da expressão hepática de ER α , dependendo da dieta a que os camundongos foram submetidos. No grupo que recebeu CD, um aumento relevante na expressão de TGF β pode sinalizar uma tendência ao aumento do risco de fibrose hepática, mesmo sob condições de CD (YANG et al., 2013). A ausência de alterações na expressão de COL1A1, contudo, indica a possível contribuição de outros fatores na sua regulação em resposta à modulação do ER α (QI et al., 2017).

Em contrapartida, para o grupo com HFD, observa-se um aumento expressivo na expressão de COL1A1 e diminuição na expressão de TGF β . Esses resultados apontam para a existência de uma complexa inter-relação entre a HFD, a redução da expressão hepática de ER α e o surgimento de fibrose hepática (PELLICANO et al., 2021). A expressão elevada de COL1A1 sugere um risco aumentado de fibrose hepática, enquanto a diminuição de TGF β pode indicar uma possível compensação na resposta fibrogênica (NAIR; NATH, 2020).

Os dados resultantes da análise da expressão de marcadores de atividade macrofágica hepática indicam que a redução da expressão hepática de ER α modula a atividade macrofágica no fígado de camundongos sob dietas variadas. No grupo de CD, observa-se um aumento relevante na expressão de F4/80 e Arg1, sugerindo que a redução de ER α pode promover a ativação macrofágica hepática, mesmo em condições de dieta normal (DONG, 2017; THOMSEN et al., 2023).

No grupo de HFD, a expressão elevada de F4/80 combinada à invariabilidade na expressão de Arg1 sugere uma influência diferenciada da redução de ER α na atividade macrofágica hepática sob condições de HFD. Especula-se que, devido à agressão hepática mais acelerada promovida pela HFD, os macrófagos podem ter sido ativados precocemente - possivelmente antes das 8 semanas de intervenção (THOMSEN et al., 2023). Tal ativação precoce pode induzir uma adaptação dos macrófagos, resultando em uma resposta inflamatória modulada e, conseqüentemente, na estabilidade da expressão de Arg1 (DONG, 2017).

Essas mudanças podem impactar o desenvolvimento de patologias hepáticas, como a esteatose e a fibrose (THOMSEN et al., 2023). Em resumo, a redução de ER α exerce efeitos distintos na atividade macrofágica hepática dos camundongos, variando com as condições dietéticas e o tempo de exposição à dieta (DONG, 2017). O entendimento dessas diferenças temporais e adaptativas na

resposta macrofágica pode ser vital para a elaboração de estratégias terapêuticas mais eficientes no tratamento de doenças hepáticas relacionadas à dieta (PAN et al., 2017).

Os dados derivados da avaliação da expressão de fatores de transcrição e hormônios sugerem que a redução da expressão hepática de ER α modifica a regulação do metabolismo lipídico e a resposta inflamatória no fígado de camundongos expostos à HFD (HAN et al., 2014; GUILLAUME et al., 2019; DISTEFANO, 2020). Observou-se aumento de PPAR α , ligado à oxidação de ácidos graxos e catabolismo lipídico (GOEDEKE et al., 2018), e de SREBP1, associado à regulação da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos (WANG et al., 2020), no grupo HFD com redução de ER α . Essas alterações na regulação lipídica podem contribuir para o desenvolvimento de doenças hepáticas, como a esteatose e a esteatohepatite (DING et al., 2020).

Contudo, a diminuição da expressão de FGF21 nesse mesmo grupo pode sugerir uma interferência na resposta hormonal ao estresse metabólico hepático (DEMIR et al., 2021). FGF21, um hormônio peptídico, é crucial na regulação do metabolismo energético, estimulando a oxidação de ácidos graxos, a termogênese e a manutenção da homeostase glicêmica (CAMPOREZ et al., 2013b). A redução na expressão de FGF21, provocada pela diminuição de ER α e conseqüentemente, menor ação do estrogênio no fígado, pode acarretar variadas conseqüências metabólicas e celulares.

Por outro lado, PGC-1 α e ATF6 não apresentaram variações expressivas nos grupos estudados, sugerindo que essas moléculas não são diretamente influenciadas pela redução da expressão hepática de ER α em camundongos submetidos à HFD por 8 semanas (KANG; TSAI; ROSEN, 2016; GUO et al., 2022). Assim, supõe-se que outros fatores podem regular a expressão de PGC-1 α e ATF6 (LEE et al., 2017), mantendo suas funções mesmo com a redução de ER α .

A diminuição da expressão de FGF21 pode comprometer a capacidade celular de oxidar ácidos graxos e regular o metabolismo energético adequadamente, resultando em acúmulo de lipídios no fígado e contribuindo para o desenvolvimento de doenças hepáticas, como a esteatose (FANG et al., 2020). Além disso, pode afetar a resposta celular ao estresse oxidativo e inflamatório, aumentando a vulnerabilidade hepática e agravando patologias hepáticas.

Essa alteração na expressão de FGF21, atrelada à redução de ER α e menor ação estrogênica no fígado, pode prejudicar a comunicação entre fígado e outros órgãos, como tecido adiposo e músculo esquelético, desequilibrando a regulação metabólica global e afetando a homeostase energética e glicêmica (CHO; KWON; HWANG, 2023). Portanto, é essencial compreender o papel de ER α e FGF21 na progressão de doenças hepáticas e criar estratégias terapêuticas, como agonistas de PPAR e moduladores de FGF21 (GOEDEKE et al., 2018), para prevenir e tratar a DHGNA e suas complicações. A identificação de biomarcadores e personalização de terapias podem aperfeiçoar o tratamento da DHGNA.

A análise de marcadores de estresse e sinalização celular revela mudanças no padrão de resposta ao estresse em camundongos com redução da expressão hepática de ER α , submetidos à CD e HFD por 8 semanas. No grupo CD, embora a elevação de JNK e CHOP não seja significativa, sugere-se um incremento na ativação das vias relacionadas ao estresse celular (GUO et al., 2022). A elevação substancial de EIF2 no grupo AAV sugere uma resposta ao estresse do retículo endoplasmático (DEMIR et al., 2021), que pode estar ligada às alterações no metabolismo lipídico destes animais (GUO et al., 2022).

Em contrapartida, no grupo submetido à HFD, uma redução, embora não significativa, de JNK e CHOP pode indicar uma possível adaptação celular ao estresse induzido pela HFD (SHOELSON, 2006; CAELLES et al., 2016). Porém, a elevação de EIF2 revela que a resposta ao estresse do retículo endoplasmático se mantém, ainda mais intensificada que no grupo CD, possivelmente associado ao maior desafio metabólico imposto pela HFD (DEMIR et al., 2021).

As mudanças nos marcadores de estresse e sinalização celular podem ser ligadas às alterações na expressão de fatores de transcrição e hormônios já discutidos (GUO et al., 2022). A inter-relação entre as vias de sinalização celular e a regulação do metabolismo lipídico e energético é complexa e pode ser alterada pela redução da expressão hepática de ER α , ocasionando um desequilíbrio na homeostase metabólica e favorecendo o surgimento de doenças hepáticas (SOLINAS; BECATTINI, 2017).

A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), essencial na gliconeogênese, processo que o fígado utiliza para produzir glicose a partir de precursores não-glicídicos (HONMA et al., 2018), demonstra variações na sua expressão nos grupos HFD e CD. Tais variações sugerem que o metabolismo energético pode ser alterado devido à diminuição de ER α no fígado dos

camundongos. A redução na expressão de PEPCK no grupo HFD com diminuição de ER α pode indicar uma baixa na gliconeogênese, possivelmente desequilibrando o metabolismo energético e a homeostase glicêmica (HONMA et al., 2018). No entanto, as variações na expressão de PEPCK não se mostraram estatisticamente significativas, necessitando de mais investigação para confirmar e detalhar essas observações.

A redução da expressão hepática de ER α influencia seletivamente a expressão de SCD1 em camundongos submetidos à CD e HFD, sem afetar a expressão de FASN e ACC, enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (HU et al., 2021; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Esta elevação de SCD1 indica uma possível modulação no metabolismo lipídico e síntese de ácidos graxos, fator que pode impulsionar o desenvolvimento de doenças hepáticas associadas à disfunção metabólica.

A expressão acentuada de SCD1 nos grupos experimentais (HFD e CD), responsável pela síntese de ácidos graxos monoinsaturados essenciais para as membranas celulares e diversas vias metabólicas, sugere possíveis alterações na homeostase lipídica (JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022).

A interação entre a HFD e a redução de ER α pode amplificar o impacto na expressão de SCD1, sugerindo que a combinação desses fatores pode agravar a disfunção metabólica hepática e aumentar o risco de doenças hepáticas associadas à obesidade e ao consumo de dietas ricas em gorduras (CAO et al., 2020; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022).

A inalteração na expressão de FASN e ACC indica que a redução de ER α pode não afetar diretamente esse processo. Entretanto, a elevação na expressão de SCD1 sugere influências em outros aspectos do metabolismo lipídico, potencialmente relevantes no desenvolvimento de doenças metabólicas, como resistência à insulina e esteatose hepática (HONMA et al., 2018; HU et al., 2021; JEYAKUMAR; VAJRESWARI, 2022). Essa complexidade e multifatorialidade na regulação da síntese de ácidos graxos envolve diferentes mecanismos e vias de sinalização.

8 CONCLUSÃO

Nesta pesquisa, destacou-se a importância primordial do ER α na regulação do metabolismo hepático, do peso corporal e da homeostase glicêmica. Demonstrou-se que a redução da expressão de ER α no fígado, mediada pelo AAV, especialmente quando combinada com uma dieta rica em gorduras, conduz a alterações metabólicas significativas.

Observou-se que o ER α desempenha um papel essencial na resposta à dieta rica em gorduras. A redução de sua expressão pode intensificar as alterações metabólicas induzidas por esta dieta, contribuindo potencialmente para a patogênese da resistência à insulina e da disfunção metabólica.

Os resultados deste trabalho ampliaram o entendimento sobre a interação entre estrogênio e regulação metabólica. Os achados abrem caminho para futuras pesquisas, especialmente no que se refere à exploração de terapias que possam modular a expressão ou atividade de ER α com o objetivo de prevenir ou tratar doenças metabólicas.

Entretanto, é preciso considerar que esses resultados promissores são derivados de estudos em modelos murinos. A complexidade da regulação hormonal e metabólica no organismo humano requer investigações adicionais para determinar a aplicabilidade e a relevância dessas descobertas na saúde humana. Futuros estudos devem considerar a interação entre ER α e outros receptores de estrogênio, assim como a influência de outros hormônios e fatores dietéticos.

Em suma, este estudo fornece uma base sólida para pesquisas futuras com o objetivo de desenvolver terapias mais eficazes para o tratamento de doenças metabólicas hepáticas.

CONFLITOS DE INTERESSE

Durante a execução deste estudo de mestrado, asseguramos a inexistência de conflitos de interesse. Preservamos a integridade da pesquisa, sempre mantendo uma abordagem objetiva e imparcial. Não detemos vínculos com organizações ou entidades que pudessem influenciar inadequadamente nossas conclusões. Além disso, não recebemos financiamento, remuneração ou benefícios de empresas ou instituições que pudessem criar um possível conflito. O estudo foi conduzido com independência, evitando interferências que pudessem comprometer a veracidade dos resultados.

Garantimos a ética na manipulação de todos os dados coletados, respeitando a privacidade e a confidencialidade das informações. Os dados não foram utilizados além do escopo desta dissertação, e nenhum favorecimento que pudesse caracterizar um conflito de interesse ocorreu.

Portanto, confirmamos a ausência de conflitos que pudessem comprometer a objetividade e a validade deste trabalho. Comprometemo-nos a divulgar qualquer conflito potencial que venha a surgir após a conclusão deste estudo.

FINANCIAMENTO

Expresso minha gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela contribuição essencial que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. O suporte financeiro da CAPES ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia tem sido crucial e merece reconhecimento em todas as suas atividades. A bolsa de estudos nacional da FAPESP (2021/03406-4) possibilitou minha dedicação integral à pesquisa que culmina nesta dissertação de mestrado. Adicionalmente, o financiamento de estudos no exterior (2022/04763-8) permitiu-me enriquecer meu arcabouço acadêmico, ampliar perspectivas e aplicar aprendizados valiosos neste projeto. A atuação fundamental tanto da CAPES quanto da FAPESP no suporte e financiamento a projetos de pesquisa é digna de reconhecimento. Este trabalho é uma evidência de seu comprometimento com a educação e a pesquisa. Finalmente, destaco que a oportunidade e a responsabilidade de ter sido beneficiado por tal apoio reverberam em minha contribuição para o avanço do conhecimento na área.

REFERÊNCIAS

ABEGUNDE, Dele O et al. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, [S.L.], v. 370, n. 9603, p. 1929-1938, dez. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61696-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61696-1).

AHMED, Hammad et al. TGF- β 1 signaling can worsen NAFLD with liver fibrosis backdrop. *Experimental And Molecular Pathology*, [S.L.], v. 124, p. 1-12, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104733>.

ALISI, Anna et al. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators Of Inflammation*, [S.L.], v. 2017, p. 1-15, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8162421>.

ANSTEE, Quentin M. *et al.* Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, [S.L.], v. 150, n. 8, p. 1728-1744, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.037>.

BESSONE, Fernando; RAZORI, María Valeria; ROMA, Marcelo G.. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular And Molecular Life Sciences*, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 99-128, 20 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-018-2947-0>.

BOTELLO-MANILLA, Alan Eduardo et al. Genetics and epigenetics purpose in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Review Of Gastroenterology & Hepatology*, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 733-748, 22 jun. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17474124.2020.1780915>.

BOURA-HALFON, Sigalit; ZICK, Yehiel. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, [S.L.], v. 296, n. 4, p. 581-591, abr. 2009. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90437.2008>.

BRIL, Fernando; CUSI, Kenneth. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America*, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 765-781, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2016.06.005>.

CAELLES, Carme et al. The role of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in insulin resistance. In: MUÑOZ-TORRERO, Diego; VINARDELL, M. Pilar; PALAZÓN, Javier. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. 6. ed. Kerala: Research Signpost, 2016. Cap. 5. p. 77-90. (978-81-308-0566-5).

CAMPOREZ, João Paulo G. et al. Cellular Mechanism by Which Estradiol Protects Female Ovariectomized Mice From High-Fat Diet-Induced Hepatic and Muscle Insulin Resistance. *Endocrinology*, [S.L.], v. 154, n. 3, p. 1021-1028, 1 mar. 2013a. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2012-1989>.

CAMPOREZ, João Paulo G. et al. Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. *Endocrinology*, [S.L.], v. 154, n. 9, p. 3099-3109, 13 jun. 2013b. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1191>.

CAMPOREZ, João Paulo Gabriel et al. Dehydroepiandrosterone protects against oxidative stress-induced endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *The Journal Of Physiology*, [S.L.], v. 589, n. 10, p. 2585-2596, 13 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2011.206078>.

CAO, Baige et al. Maternal High-Fat Diet Leads to Non-alcoholic Fatty Liver Disease Through Upregulating Hepatic SCD1 Expression in Neonate Rats. *Frontiers In Nutrition*, [S.L.], v. 7, p. 1-14, 17 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.581723>.

CHEN, Yi-Hsun; WU, Wei-Kai; WU, Ming-Shiang. Microbiota-Associated Therapy for Non-Alcoholic Steatohepatitis-Induced Liver Cancer: a review. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 21, n. 17, p. 5999, 20 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21175999>.

CHO, Ye Eun; KWON, Yong Seong; HWANG, Seonghwan. Heterogeneous population of macrophages in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 16-25, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livres.2022.06.001>.

COHEN, Jonathan C.; HORTON, Jay D.; HOBBS, Helen H.. Human Fatty Liver Disease: old questions and new insights. *Science*, [S.L.], v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 24 jun. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1204265>.

COTTER, Thomas G.; RINELLA, Mary. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: the state of the disease. *Gastroenterology*, [S.L.], v. 158, n. 7, p. 1851-1864, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>.

DEMIR, Sevgican et al. Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications. *Advanced Science*, [S.L.], v. 8, n. 18, p. 2100275, 28 jul. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adv.202100275>.

DING, Lingling et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Prevention And Treatment Of Atherosclerosis, [S.L.], p. 233-269, 2020. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/164_2020_352.

DISTEFANO, Johanna K. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: implications for diagnosis and treatment. Endocrinology, [S.L.], v. 161, n. 10, p. 1-29, 11 ago. 2020. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endocr/bqaa134>.

DONG, X. Charlie. FOXO transcription factors in non-alcoholic fatty liver disease. Liver Research, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 168-173, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livres.2017.11.004>.

DUELL, P. Barton et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk: a scientific statement from the american heart association. Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 168-185, jun. 2022. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atv.000000000000153>.

EL-KASSAS, Mohamed et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: current global burden. Seminars In Liver Disease, [S.L.], v. 42, n. 03, p. 401-412, 26 maio 2022. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-1862-9088>.

ESLAM, Mohammed et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. Journal Of Hepatology, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 202-209, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>.

FANG, Penghua et al. San-Huang-Tang protects obesity/diabetes induced NAFLD by upregulating PGC-1 α /PEPCK signaling in obese and galr1 knockout mice models. Journal Of Ethnopharmacology, [S.L.], v. 250, p. 112483-112483, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2019.112483>.

FIORENTINO, T. V. et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with a decreased myocardial mechano-energetic efficiency. Journal Of Internal Medicine, [S.L.], v. 289, n. 2, p. 221-231, 30 jul. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13155>.

FONTES-CAL, Tereza C. M. et al. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression. Frontiers In Immunology, [S.L.], v. 12, p. 1-10, 10 ago. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.708959>.

GOEDEKE, Leigh et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents.

Hepatology, [S.L.], v. 68, n. 6, p. 2197-2211, 29 nov. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.30097>.

GREFHORST, Aldo et al. The Role of Lipophagy in the Development and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers In Endocrinology*, [S.L.], v. 11, p. 1-12, 1 fev. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2020.601627>.

GUILLAUME, Maeva et al. Selective Liver Estrogen Receptor α Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice. *Hepatology Communications*, [S.L.], v. 3, n. 7, p. 908-924, 29 abr. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep4.1363>.

GUO, Xiangyu et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 23, n. 24, p. 1-18, 7 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232415489>.

HADIZADEH, Fatemeh; FAGHIHIMANI, Elham; ADIBI, Peyman. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic biomarkers. *World Journal Of Gastrointestinal Pathophysiology*, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 11-26, 2017. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.11>.

HAMILTON, Dale J. et al. Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. *Physiological Reports*, [S.L.], v. 4, n. 17, p. 12913-12913, 31 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.14814/phy2.12913>.

HAN, Myoung Sook et al. A feed-forward regulatory loop in adipose tissue promotes signaling by the hepatokine FGF21. *Genes & Development*, [S.L.], v. 35, n. 1-2, p. 133-146, 17 dez. 2020. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.344556.120>.

HAN, Song-lee et al. Estrogen receptor ligands ameliorate fatty liver through a nonclassical estrogen receptor/Liver X receptor pathway in mice. *Hepatology*, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 1791-1802, 27 mar. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26951>.

HASSEN, Gashaw et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: an emerging modern-day risk factor for cardiovascular disease. *Cureus*, [S.L.], p. 1-15, 30 maio 2022. Cureus, Inc.. <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.25495>.

HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 97, n.

23, p. 12729-12734, 7 nov. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.23.12729>.

HONMA, Midori et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *International Journal Of Obesity*, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 1544-1555, 1 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-018-0062-9>.

HU, Yufeng et al. Fatty Acid Synthase–Suppressor Screening Identifies Sorting Nexin 8 as a Therapeutic Target for NAFLD. *Hepatology*, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 2508-2525, 21 set. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.32045>.

HUANG, Shanzhou et al. A comprehensive bioinformatics analysis on multiple Gene Expression Omnibus datasets of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-9, 16 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-25658-4>.

HUBY, Thierry; GAUTIER, Emmanuel L.. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nature Reviews Immunology*, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 429-443, 5 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00639-3>.

IKEUCHI, M. et al. Abstracts of the 25th Annual Conference of APASL, February 20–24, 2016, Tokyo, Japan. *Hepatology International*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-506, fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12072-016-9707-8>.

IPSEN, David Højland; TVEDEN-NYBORG, Pernille. Extracellular Vesicles as Drivers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: small particles with big impact. *Biomedicines*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 93-106, 19 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9010093>.

JEYAKUMAR, Shanmugam Murugaiha; VAJRESWARI, Ayyalasomayajula. Stearoyl-CoA desaturase 1: a potential target for non-alcoholic fatty liver disease?-perspective on emerging experimental evidence. *World Journal Of Hepatology*, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 168-179, 27 jan. 2022. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v14.i1.168>.

JIANG, Zewen et al. Isthmin-1 is an adipokine that promotes glucose uptake and improves glucose tolerance and hepatic steatosis. *Cell Metabolism*, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 1836-1852, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.010>.

KANG, Sona; TSAI, Linus T-Y.; ROSEN, Evan D.. Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance. *Trends In Cell Biology*, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 341-351, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.002>.

KITADE, Hironori et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: new insights and potential new treatments. *Nutrients*, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 387-390, 14 abr. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9040387>.

LEE, Jooho et al. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Aspects Of Medicine*, [S.L.], v. 54, p. 78-88, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.008>.

LI, Jiuling et al. Mendelian Randomization Analysis Reveals No Causal Relationship Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Severe COVID-19. *Clinical Gastroenterology And Hepatology*, [S.L.], v. 20, n. 7, p. 1553-1560, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2022.01.045>.

LIAO, Chen-Chung et al. Proteomics Analysis to Identify and Characterize the Molecular Signatures of Hepatic Steatosis in Ovariectomized Rats as a Model of Postmenopausal Status. *Nutrients*, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 8752-8766, 22 out. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu7105434>.

LIM, Soo; KIM, Jin-Wook; TARGHER, Giovanni. Links between metabolic syndrome and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. *Trends In Endocrinology & Metabolism*, [S.L.], v. 32, n. 7, p. 500-514, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2021.04.008>.

LONARDO, Amedeo et al. Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: state of the art and identification of research gaps. *Hepatology*, [S.L.], v. 70, n. 4, p. 1457-1469, 23 set. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.30626>.

LOUET, Jean-Francois; LEMAY, Cedric; MAUVAIS-JARVIS, Franck. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Current Atherosclerosis Reports*, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 180-185, maio 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-004-0030-9>.

MAUVAIS-JARVIS, Franck et al. Sex and gender: modifiers of health, disease, and medicine. *The Lancet*, [S.L.], v. 396, n. 10250, p. 565-582, ago. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31561-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31561-0).

MIURA, Kouichi et al. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And*

Liver Physiology, [S.L.], v. 302, n. 11, p. 1310-1321, 1 jun. 2012. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00365.2011>.

MUOIO, Deborah M.; NEWGARD, Christopher B.. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 193-205, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2327>.

NAIR, Bhagyalakshmi; NATH, Lekshmi R.. Inevitable role of TGF- β 1 in progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Journal Of Receptors And Signal Transduction*, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 195-200, 13 fev. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10799893.2020.1726952>.

O'FARRELL, Marie et al. FASN inhibition targets multiple drivers of NASH by reducing steatosis, inflammation and fibrosis in preclinical models. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-16, 19 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-19459-z>.

OATES, Jarren R. et al. Macrophage Function in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: the mac attack. *Frontiers In Immunology*, [S.L.], v. 10, p. 1-16, 12 dez. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.02893>.

PAN, Xiaoyan et al. FOXO transcription factors protect against the diet-induced fatty liver disease. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-12, 16 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep44597>.

PATERNOSTRO, Rafael; TRAUNER, Michael. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal Of Internal Medicine*, [S.L.], v. 292, n. 2, p. 190-204, 7 jul. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.13531>.

PELLICANO, Anthony J. et al. Collagen Characterization in a Model of Nonalcoholic Steatohepatitis with Fibrosis; A Call for Development of Targeted Therapeutics. *Molecules*, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 1-9, 1 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26113316>.

PERLA, Francesco et al. The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children*, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 46-60, 6 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/children4060046>.

POUWELS, Sjaak et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. *Bmc Endocrine Disorders*, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-9, 14 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12902-022-00980-1>.

QI, Shan et al. Candidate genes investigation for severe nonalcoholic fatty liver disease based on bioinformatics analysis. *Medicine*, [S.L.], v. 96, n. 32, p. 7743-7751, ago. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000007743>.

QUIÑONES, Mar; FERNØ, Johan; AL-MASSADI, Omar. Ghrelin and liver disease. *Reviews In Endocrine And Metabolic Disorders*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 45-56, 23 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-019-09528-6>.

ROCHLANI, Yogita et al. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances In Cardiovascular Disease*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 215-225, 22 jun. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753944717711379>.

SHIHA, Gamal et al. Nomenclature and definition of metabolic-associated fatty liver disease: a consensus from the middle east and north africa. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 57-64, jan. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2468-1253\(20\)30213-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2468-1253(20)30213-2).

SHOELSON, S. E.. Inflammation and insulin resistance. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 3 jul. 2006. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci29069>.

SOLINAS, Giovanni; BECATTINI, Barbara. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Molecular Metabolism*, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 174-184, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2016.12.001>.

TANASE, Daniela Maria et al. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Journal Of Diabetes Research*, [S.L.], v. 2020, p. 1-16, 4 ago. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/3920196>.

THOMSEN, Karen Louise et al. Role of Ammonia in NAFLD: an unusual suspect. *Jhep Reports*, [S.L.], p. 1-45, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100780>.

TILG, Herbert; EFFENBERGER, Maria. From NAFLD to MAFLD: when pathophysiology succeeds. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 387-388, 27 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-0316-6>.

TUFTS UNIVERSITY. Nuclear Factor kappa-B Pathway. 2023. Disponível em: https://sites.tufts.edu/hkerstjaaalislai/?page_id=541. Acesso em: 21 abr. 2023.

VACHLIOTIS, Ilias et al. Nonalcoholic fatty liver disease: lifestyle and quality of life. *Hormones*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 41-49, 1 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42000-021-00339-6>.

WANG, Jin et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids In Health And Disease*, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-19, 13 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-020-01210-0>.

XIE, Jiarong et al. The associations between modifiable risk factors and nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive mendelian randomization study. *Hepatology*, [S.L.], v. 77, n. 3, p. 949-964, 17 fev. 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.32728>.

YANG, Ling et al. Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology*, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 483-495, 18 dez. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26698>.

YE, Qian et al. Deficiency of gluconeogenic enzyme PCK1 promotes metabolic-associated fatty liver disease through PI3K/AKT/PDGF axis activation in male mice. *Nature Communications*, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-19, 14 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-37142-3>.

YOUNOSSI, Zobair M. et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*, [S.L.], v. 77, n. 4, p. 1335-1347, 3 jan. 2023. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/hep.0000000000000004>.

ZAMORA, Monica; VILLENA, Josep. Targeting Mitochondrial Biogenesis to Treat Insulin Resistance. *Current Pharmaceutical Design*, [S.L.], v. 20, n. 35, p. 5527-5557, 12 set. 2014. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140306102514>.

ZOU, Yang et al. Association between the alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase ratio and new-onset non-alcoholic fatty liver disease in a nonobese Chinese population: a population-based longitudinal study. *Lipids In Health And Disease*, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-10, 25 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-020-01419-z>.

APÊNDICES

APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS

Tabela 1 – Sequências dos Primers para qPCR:

Primer	Fw	Rv
ACC	ACCTGCTGTCACCTTCTCCG	GTATCTGAGCTGACGGAGGC
β -Actin	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	CCTCTATGCCAACACAGTGC
ARG1	GGAAGAGTCAGTGTGGTGCTGG	CAGGAGAAAGGACACAGGTTGC
ATF6	CTCAGTGTTGGAACCTCGGCT	ATGTGGCTGCTTGCTATGGT
CHOP	AGTCCCTGCCTTTCACCTTG	TCCGGAGAGACAGACAGGAG
COL1A1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
EIF2	TAGTGCGGTGCTGTGAGAAG	CACTCGGTTTCAGCAACTCCT
ER α	GAGAAGGACCACATCCACCG	GGGCACAACGTTCTTGCATT
ER β	GTGACAGATGCCCTGGTCTG	GCGTGTGAGCATTGAGCATC
F4/80	CCTGGACGAATCCTGTGAAG	GGTGGGACCACAGAGAGTTG
FASN	CTGCCTTCGGTTCAGTCTCTT	TGCCTAGTCCAACAAGCCAC
FGF21	CCTCCAGTTTGGGGGTCAAG	ACCACTGTTCCATCCTCCCT
IKK	AAGAACAGAGACCGCTGGTG	ACAACGATGTCCACTTCGCT
IL-10	TGCCAAGCCTTATCGGAAATG	AAATCGATGACAGCGCCTCAG
IL-1 β	GGCAGCTACCTGTGTCTTTCCC	ATATGGGTCCGACAGCACGAG
IL-4	ATGGATGTGCCAAACGTCCT	TCACTCTCTGTGGTGTCTTCG
IL-6	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
JNK	GGGAATCCTAGGCCTGGAA	TAGCTGCCATGGTGCATTCA
MCP1	ACCTGGATCGGAACCAAATGAG	GAAGTGCTTGAGGTGGTTGTGG
PEPCK	GCAGTGAGGAAGTTCGTGGA	AGGCCAGTTGTTGACCAA
PGC-1 α	CCCTGCCATTGTAAAGACC	TGCTGCTGTTCTGTTTTTC
PPAR α	CTCCTCTAGGCCCTCCTTT	ACTGGGCTACATCCTCGACT
SCD1	GAGTAGCTGAGCTTTGGGCT	ACTTCATCAGCGGGGACTTG
SREBP-1	GACCCTACGAAGTGCACACA	GTGGCCTAGTCACAGGTTCC
TGF- β	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
TNF- α	TCTTCTCATTCTGCTTGTGGC	CACTTGGTGGTTTGCTACGACG

Legenda: As colunas representam o nome do *primer* (*Primer*), a sequência do *primer forward* (*Fw*) - que é a sequência de 5' a 3' na fita de DNA codificante, e a sequência do *primer reverse* (*Rv*) - que é a sequência de 5' a 3' na fita de DNA não-codificante.

Fonte: Autoria Própria (2023).