

**BRUNA DE ARAUJO CARDOSO DOS SANTOS**

**DELEÇÃO DA OLIGOPEPTIDASE THOP1 REGRIDE QUADRO DE  
ESTEATOHEPATITE SEVERA EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEL INTERAÇÃO  
ENTRE PEPTÍDEOS E microRNAs**

SÃO PAULO

2021

**BRUNA DE ARAUJO CARDOSO DOS SANTOS**

**DELEÇÃO DA OLIGOPEPTIDASE THOP1 REGRIDE QUADRO DE  
ESTEATOHEPATITE SEVERA EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEL INTERAÇÃO  
ENTRE PEPTÍDEOS E MICRORNAs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências

SÃO PAULO

2021

**BRUNA DE ARAUJO CARDOSO DOS SANTOS**

**DELEÇÃO DA OLIGOPEPTIDASE THOP1 REGRIDE QUADRO DE  
ESTEATOHEPATITE SEVERA EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEL INTERAÇÃO  
ENTRE PEPTÍDEOS E MICRORNAs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa Dra. Alice Cristina  
Rodrigues

Coorientador: Prof Dr. Emer Suavinho Ferro

Versão Original

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Araujo Cardoso dos Santos, Bruna  
DELEÇÃO DA OLIGOPEPTIDASE THOP1 REGRIDE QUADRO  
DE ESTEATOHEPATITE SEVERA EM CAMUNDONGOS: POSSÍVEL  
INTERAÇÃO ENTRE PEPTÍDEOS E MICRORNAs / Bruna de  
Araujo Cardoso dos Santos; orientadora Alice  
Cristina Rodrigues; coorientador Emer Suavinho  
Ferro. -- São Paulo, 2021.  
93 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2.  
microRNAs. 3. Peptídeos. I. Cristina Rodrigues,  
Alice, orientador. II. Suavinho Ferro, Emer,  
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Bruna de Araujo Cardoso dos Santos

Título da Dissertação: Deleção da oligopeptidase thop1 regride quadro de esteatohepatite severa em camundongos: possível interação entre peptídeos e microRNAs

Orientador: Profa Dra Alice Cristina Rodrigues

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata:

(     ) **Aprovada**

(     ) **Reprovada**

Examinador(a):           Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):           Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):           Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:               Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.88.2019

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **138/2015/CEUA**, válido até **11/03/2020**, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Emer Suavinho Ferro**, do Departamento de **Farmacologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Bruna de Araujo Cardoso dos Santos** na equipe do Projeto de Pesquisa "*Caracterização fenotípica de animais knockout para a thimet oligopeptidase e duplo knockout thimet oligopeptidase/neurolisina*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 16 de maio de 2019.

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

Dedico esta dissertação aos meus pais Regina Araujo e Givaldo Santos por sempre me apoiarem e me mostrarem que tudo é possível.

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, professora doutora Alice Cristina Rodrigues, por acreditar no meu potencial, me orientar e estar sempre me incentivando a ser uma pesquisadora melhor. E também pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório.

Gostaria de agradecer a minha família, especialmente aos meus pais por me ensinarem que eu posso alcançar qualquer objetivo e me incentivarem a realizar meus sonhos. E ao meu parceiro, Renato Scaroni, por me apoiar e acreditar em mim.

Também agradeço aos meus colegas de laboratório por toda a assistência e amizade durante o mestrado. Em especial gostaria de agradecer à Nayara Preste, Anaysa Paola Bolin e Karina Moraes pela amizade que foi muito além do laboratório, pelas risadas, happy-hours e festas. Aos meus outros colegas Alexandre Spagnolli, Érica Sousa, Gabriela Akemi, Karina Cunha Rocha, Lucas Fernandes Rocha e Mariana de Mendonça por fazerem do laboratório um lugar amistoso e gostoso de trabalhar.

Agradeço ao meu coorientador professor doutor Emer Suavinho Ferro por abrir as portas do seu laboratório para mim e estar sempre apto a ouvir as nossas idéias e me orientar.

Agradeço especialmente à técnica doutora Rosangela Eichler por toda a assistência com o cuidado dos animais, com os experimentos e pela paciência em me ensinar.

Gostaria de agradecer também ao professor doutor Daniel Martins de Souza, do laboratório de neuroproteômica do departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia da UNICAMP, por ter realizado a parte final do peptidoma que era de suma importância para o fechamento deste trabalho.



Agradeço também ao professor doutor José César Rosa Neto e ao doutor Alexandre A. S. Teixeira por abrir as portas do seu laboratório e me auxiliar na realização do ELISA.

Agradeço ainda aos professores José Donato, Lúcia Lopes, Luiz Roberto Giorgetti de Britto por permitirem que eu utilizasse recursos e tivesse livre acesso aos seus laboratórios para desenvolver meus experimentos

Agradeço a Universidade de São Paulo, ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) - Código de Financiamento 30242/2019-5 - e ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo 2019/15965-8 - por me oferecerem a estrutura física e financeira para desenvolver esse estudo.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”*

Isaac Newton

## RESUMO

Santos, BAC. Deleção da oligopeptidase thop1 regride quadro de esteatohepatite severa em camundongos: possível interação entre peptídeos e microRNAs, [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende um espectro de doenças que vai desde a presença de esteatose hepática (acúmulo de gordura no parênquima hepático sem inflamação) na ausência do consumo excessivo de álcool até a esteatohepatite, caracterizada pela esteatose junto à hipertrofia do hepatócito e inflamação lobular, podendo progredir, a longo prazo, para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Camundongos *knockout* para a enzima thimet-oligopeptidase (THOP<sup>-/-</sup>) se mostram resistentes à indução da obesidade e DHGNA por dieta hiperlipídica, e apresentam alteração na expressão de microRNAs previamente associados à DHGNA. Com o intuito de clarificar como a deleção da THOP1 protege o animal de desenvolver esteatohepatite e como esse mecanismo pode estar associado aos microRNAs, utilizamos animais C57Bl/6 *wild type* e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com dieta controle ou deficiente em colina e hiperlipídica, que mimetiza melhor a evolução da doença, por 8, 15 e 24 semanas. Após o tempo de experimentação, os animais foram eutanasiados e o fígado foi recolhido para análise da histologia hepática e das vias metabólicas através da expressão gênica por qPCR. Os resultados obtidos indicam que, a longo prazo, o genótipo THOP<sup>-/-</sup> promove um fenótipo resistente a obesidade, esteatohepatite e fibrose. Essa melhora do fenótipo está relacionada à diminuição do miR-34a e das vias metabólicas e inflamatórias que envolvem Pparg, Ucp2, Tnfa, IL-6, IL-10, IL-17, Tgfb, a-sma, Col1a1 e Timp1. A diminuição dessas vias parece estar relacionada com o acúmulo de VDPVNFK, ao longo do tempo, que pode modular a expressão do miR-34a, assim inibindo a ação deste microRNA e permitindo que as vias de sinalização funcionem para diminuir o acúmulo lipídico e suas consequências.

Palavras chave: thimet oligopeptidase; microRNA; peptídeos intracelulares; DHGNA

## ABSTRACT

Santos, BAC. Deletion of thop1 oligopeptidase regresses severe steatohepatitis in mice: possible interaction between peptides and microRNAs. [dissertation (Master in Pharmacology)] - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a spectrum of diseases ranging from the presence of hepatic steatosis (accumulation of fat in the liver parenchyma without inflammation) in the absence of excessive alcohol consumption to steatohepatitis, characterized by steatosis along with hypertrophy of the hepatocyte and lobular inflammation, which may progress, in the long term, to fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Mouse knockout for an enzyme thimet oligopeptidase (THOP<sup>-/-</sup>) is resistant to the induction of obesity and NAFLD by a high-fat diet, and shows changes in the expression of microRNAs previously associated with NAFLD. In order to clarify how the THOP1 deletion protects the animal from developing steatohepatitis and how this mechanism can be associated with microRNAs, we used C57Bl/6 wild type and THOP<sup>-/-</sup> animals fed a choline-deficient and hyperlipidic diet, which better mimics the evolution of the disease, for 8, 15 and 24 weeks. After the experimentation period, the animals were euthanized and the liver was collected for analysis of liver histology and metabolic pathways through gene expression by qPCR. The results obtained indicate that, in the long term, the THOP<sup>-/-</sup> genotype promotes a phenotype resistant to obesity, steatohepatitis and fibrosis. This improvement in the phenotype is related to the downregulation of miR-34a and the metabolic and inflammatory pathways that involves Pparg, Ucp2, Tnfa, IL-6, IL-10, IL-17, Tgfb,  $\alpha$ -sma, Col1a1 and Timp1. The decrease in these pathways seems to be related to the accumulation of VDPVNFK, over time, which can modulate the expression of miR-34a, thus inhibiting the action of this microRNA and allowing the signaling pathways to work to decrease lipid accumulation and its consequences.

Keywords: thimet oligopeptidase; microRNA; intracellular peptides; NAFLD

## Lista de Figuras

- Figura 1.** *Multiple Hit Hypothesis*. 28
- Figura 2.** Implicação de microRNAs nas principais transições da patogênese da DHGNA. 31
- Figura 3.** Diagrama de diagnóstico para DHGNA de roedores. 37
- Figura 4.** Efeito da dieta DC no peso corpóreo de animais WT e KO THOP<sup>-/-</sup> (Ganho de peso e delta peso). 45
- Figura 5.** Consumo alimentar ao longo do período experimental. 46
- Figura 6.** Efeito da dieta DC sobre a composição corporal de animais WT e THOP<sup>-/-</sup>. 47
- Figura 7.** Efeito macroscópico do genótipo no fígado de animais alimentados com DC. 50
- Figura 8.** Efeito do genótipo na histologia de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC e C. 51
- Figura 9.** Distribuição das características histológicas da DHGNA em animais WT e THOP<sup>-/-</sup>. 52
- Figura 10.** Efeito da dieta deficiente em colina na indução de fibrose em camundongos WT e THOP<sup>-/-</sup>. 54
- Figura 11.** Expressão de genes relacionados à fibrose no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC. 55
- Figura 12.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de gênica de citocinas envolvidas na inflamação hepática de camundongos alimentados com DC. 56
- Figura 13.** Efeito da deleção da THOP1 sobre o conteúdo de citocinas no fígado de camundongos alimentados com dieta C e DC. 57

- Figura 14.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos na inflamação hepática de camundongos alimentados com DC. **58**
- Figura 15.** Efeito da deleção da THOP1 no metabolismo lipídico de camundongos alimentados com DC. **60**
- Figura 16.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de *Atgl* hepática de camundongos alimentados com DC. **61**
- Figura 17.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos na beta-oxidação hepática de camundongos alimentados com DC. **62**
- Figura 18.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos no fluxo de HDL e VLDL hepático de camundongos alimentados com DC. **63**
- Figura 19.** Heatmap dos microRNAs diferencialmente expressos no fígado de animais selvagens alimentados com dieta deficiente em colina ou controle por 8 semanas. **64**
- Figura 20.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de microRNAs de camundongos alimentados com DC. **65**
- Figura 21.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de pri-miR-34a e dicer. **66**
- Figura 22.** *Heatmap* da razão de variação dos peptídeos intracelulares no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC com relação ao WT alimentado com dieta controle. **68**
- Figura 23.** Heatmap da razão de variação de peptídeos intracelulares no fígado de animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC com relação aos WT. **68**
- Figura 24.** Variação de peptídeos intracelulares semiquantitativamente identificados no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC. **69**
- Figura 25.** Mecanismo proposto para os efeitos da deleção da THOP1 na DHGNA. **75**

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados para quantificar expressão de microRNAs.	<b>38</b>
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos primers utilizados para quantificar a expressão de RNAm.	<b>39</b>
<b>Tabela 3.</b> Combinação das amostras para espectrometria de massas.	<b>42</b>
<b>Tabela 4.</b> Características da obesidade de animais WT e THOP <sup>-/-</sup> alimentados com DC.	<b>48</b>
<b>Tabela 5.</b> Faixa obtida do score de NAFLD de camundongos WT e THOP <sup>-/-</sup> .	<b>53</b>
<b>Tabela 6.</b> Faixa obtida do escore de fibrose de camundongos WT e THOP <sup>-/-</sup> .	<b>54</b>
<b>Tabela 7.</b> Peptídeos intracelulares e proteínas precursoras semiquantitativamente identificados no fígado de animais WT e THOP <sup>-/-</sup> alimentados com DC.	<b>67</b>

## Lista de Abreviaturas

ACC: Acetil-Coa Carboxilase

ACTA2; a-sma: Actina de músculo liso alfa (gene)

AdipoR1: Receptor de adiponectina 1

AdipoR2: Receptor de adiponectina 2

AG: Ácido Graxo

AGLs: Ácidos Graxos Livres

Ago2: Argonaute 2

Akt: Proteína quinase B

AMPK: Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

APOA5: Apolipoproteína A-V

APOB: Apolipoproteína B

ATGL: Lipase de triacilglicerol do tecido adiposo

ATP: Adenosina trifosfato

AUC: Área sob a curva

C: Dieta controle

Cb1: receptor endocanabinóide 1

CD206: Cluster de diferenciação 206; receptor de manose

CD36: Cluster de Diferenciação 36; glicoproteínas de plaquetas 4

CD86: Cluster de diferenciação 86

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar



Cebpa: Proteína alfa de ligação ao estimulador de CCAAT

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CO<sub>2</sub>: Gás Carbonico

CPT1a: carnitina palmitoiltransferase I

Col1a1: colágeno do tipo 1 alfa 1

DC: Dieta deficiente em colina

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EHA: Esteatohepatite Alcoólica

EHNA: Esteatohepatite Não Alcoólica

FASN: Ácido graxo sintase

FGF-21: fator de crescimento dos fibroblastos 21

FOxO1: Forkhead box protein O1

FOXO3: Forkhead box O3

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GTT: Teste de Tolerância à Glicose

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone Hormônio liberador de gonadotrofina

HE: Hematoxilina – Eosina

HDL: High Density Lipoproteins ou Lipoproteínas de alta densidade

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IL-10: Interleucina 10

IL-1b: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-17: Interleucina 17

IL-18: Interleucina 18

IMC: Índice de massa corporal

ITT: Teste de tolerância à insulina

JNK: Jun N-terminal kinases

KO: knockout

Kitt: Taxa de decaimento da glicose

LPS: lipopolissacarídeo; endotoxina

LXR: receptor x do fígado

miRNA: microRNAs

MHC-I: Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I

mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

n: número

NaBH<sub>3</sub>CN: cianoborohidreto

NAFLD: *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*

NASH: *Nonalcoholic steatohepatitis*

NCOR1: Nuclear Receptor Corepressor 1

NF-Kb: factor nuclear kappa B

P53: proteína tumoral 53

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PNPLA3: proteína 3 contendo o domínio fosfolipase do tipo patatina

PGC1 $\alpha$ : Coativador 1-alfa dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama

PPAR $\alpha$ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo alfa

PPAR $\beta$ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo bet

PPAR $\gamma$ : Receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo gama

Rictor: Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ácido ribonucleico

RNA $m$ : Ácido ribonucleico mensageiro

ROR $\gamma$ : RAR-related orphan receptor gamma

ROS: espécies reativas de oxigênio

Rpl0: Proteína ribossomal L0

Rpm: rotações por minuto

RT-qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Sirt1: Sirtuína 1

SREBP: Proteínas de ligação a elemento regulador de esterol

TEAB: brometo de tetraetilamônio

TG: Triglicérides

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador beta 1

THOP1: Thimet Oligopeptidase; EP.24.15

THOP<sup>-/-</sup>: Animal nocaute para THOP1

TIMP1: Inibidor tecidual de metaloproteinases 1

TLR4: receptor do tipo Toll 4

TLR9: receptor do tipo Toll 9

TM6SF2: transmembrana 6 membro da superfamília 2

TNF $\alpha$ : Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TRAF6: Receptor de TNF relacionado ao fator 6

UCP1: Proteína desaclopadora 1

U/kg p.c: unidade por quilo de peso corpóreo

VLDL: very low density lipoprotein–triglyceride

WT: Wild Type; selvagem

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>22</b>
1.1. Epidemiologia da DHGNA	22
1.2. Etiologia da DHGNA	24
1.3. Patogênese da DHGNA	25
1.4. THOP1 e a DGHNA	29
1.5. Relação entre a THOP1, microRNAs e a DHGNA	30
<b>2. Justificativa</b>	<b>33</b>
<b>3. Objetivo</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
<b>4. Metodologia</b>	<b>35</b>
4.1. Animais	35
4.2. Protocolo experimental e terapêutico	35
4.3. Análise de composição corporal	36
4.4. Ingestão alimentar, ganho de peso e massa de gordura	36
4.5. Avaliação da responsividade à insulina	36
4.6. Análise histopatológica do fígado	36
4.7. Extração de RNA	38
4.8. Expressão de microRNA por qPCR	38
4.9. Expressão de RNAm por qPCR	38
4.10. Extração de proteínas	40
4.11. Quantificação de citocinas inflamatórias	40
4.12. Extração de peptídeos	40
4.13. Marcação isotópica de peptídeos por dimetilação com formaldeídos modificados P03	41
4.14. Espectrometria de massa e análise de dados	42
4.15. Análise Estatística	44
<b>5. Resultados</b>	<b>45</b>
5.1. Dieta deficiente em colina gera alterações metabólicas de forma dependente do genótipo	45
5.2. A DC causa hepatomegalia de forma dependente do genótipo	49
5.3. Efeito da deleção da THOP <sup>-/-</sup> na indução da esteatohepatite por dieta deficiente em colina.	50
5.4. Efeito da deleção da THOP1 na progressão da esteatohepatite em animais alimentados com DC	53
5.5. Efeito do genótipo na inflamação hepática de animais WT e THOP <sup>-/-</sup> alimentados com DC	56

5.6. Expressão de RNAm de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático de animais WT e THOP <sup>-/-</sup> alimentados com DC	59
5.7. Efeito da deleção da THOP1 na expressão hepática de microRNAs em camundongos alimentados com DC	63
5.8. Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de peptídeos intracelulares de camundongos alimentados com DC.	67
<b>6. Discussão</b>	<b>70</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>75</b>
<b>8. Referências</b>	<b>76</b>

## 1. Introdução

As mudanças no estilo de vida desenvolvidas no último século levaram ao aumento do sedentarismo, propiciando um desbalanço na quantidade de calorias ingeridas e calorias gastas (Younossi et al, 2019) que junto à fatores genéticos levou a um aumento de sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9 m<sup>2</sup>) e obesidade (IMC ≥ 30 m<sup>2</sup>) na população mundial (Sivell, 2019). A obesidade é um fator de risco para síndrome metabólica e comorbidades que incluem diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica, hipertensão, hiperlipidemia, doença renal crônica, doença cardiovascular, apneia obstrutiva do sono e osteoartrite, elevando a mortalidade em indivíduos obesos (Polyzos et al, 2018). De acordo com Chang et al (2016), pacientes com sobrepeso obesos metabolicamente saudáveis, tem 2,15 e 3,55 vezes, respectivamente, mais chances de desenvolver DHGNA (doença hepática gordurosa não alcoólica) do que pacientes com peso normal.

A DHGNA é a forma mais comum da doença hepática crônica ao redor do mundo, impulsionada principalmente pela epidemia de obesidade (Younossi et al, 2019). Desde a década de 30 há indícios da relação entre a esteatose hepática e a obesidade, no entanto apenas na década de 80 Ludwig junto ao seu grupo de pesquisa conseguiu distinguir histologicamente a esteatohepatite alcoólica (EHA) da não alcoólica (EHNA), e relacioná-la à obesidade (Sanyal, 2019).

A mortalidade causada pela DHGNA tem aumentado em contrapartida ao decréscimo da mortalidade causada pelas hepatites virais por conta da introdução de terapias virais de ação direta (Polyzos et al, 2018; Kim et al, 2018). Além disso, atualmente a DHGNA é a segunda maior causa do transplante de fígado, ficando atrás apenas da hepatite C crônica, e a tendência é que ela chegue ao primeiro lugar (Younossi et al, 2019).

### 1.1. Epidemiologia da DHGNA

Em 2018, estimou-se que 25% da população mundial era afetada pela DHGNA. Na América do Norte, a prevalência é de 24% e na América do Sul, observou-se que a incidência era de 32% sobre a população e que essa estava intimamente ligada à prevalência da obesidade em cada continente. Na Europa a incidência é estimada de 20 - 30%; essa variação ocorre pelas diferenças, entre os

países, nos índices populacionais de obesidade e diabetes mellitus tipo 2. Na Ásia a prevalência varia entre 15 e 40% pelos mesmos motivos europeus. Na África os números variam entre 5 e 30%, essa oscilação ocorre porque há poucos estudos epidemiológicos de DHGNA na África (Younossi et. al., 2019).

Em 2011 Cotrim et al., realizaram um estudo multicêntrico no Brasil em pacientes com DHGNA e observaram que 53,3% dos pacientes eram homens, 85% eram assintomáticos, 44,7% eram obesos e 41,3% tinham desenvolvido síndrome metabólica. Além disso, o mesmo grupo também observou que nos casos em que foi realizada biópsia hepática havia alto índice de esteatohepatite – 58%, e destes 27% também apresentavam fibrose.

Andrade et al (2016), realizaram um estudo epidemiológico com 62 pacientes em São José do Rio Preto - São Paulo e observaram que 76% dos pacientes com DHGNA eram mulheres, 71% eram assintomáticos, 39% tinham sobrepeso e 45% eram obesos. Coelho (2019) realizou outro estudo no hospital geral de Fortaleza e observou que dos 83 pacientes com DHGNA, 80,7% eram mulheres, 88% apresentavam sobrepeso ou obesidade. Coelho ainda observou que dos 60 pacientes submetidos à elastografia hepática, 65% exibiram pelo menos um grau de fibrose e 10% apresentaram cirrose.

De acordo com Than et al (2015), a prevalência da DHGNA em pacientes com peso normal sem a presença de fatores de riscos metabólicos é de 16%, aumentando para 43-60% em pacientes com diabetes, 91% para pacientes obesos submetidos a bariátrica e até 90% para pacientes com hiperlipidemia. Além disso, a prevalência da DHGNA também aumenta com a idade de menos de 20% abaixo de 20 anos para mais de 40% com idade acima de 60 anos.

Apesar da alta incidência da DHGNA, apenas de 20% evoluem para casos de EHNA, dos quais 25%, em decorrência do acúmulo de gordura no parênquima hepático com inflamação, progridem para fibrose, que, de acordo com o estágio, pode avançar para cirrose, que de maneira progressiva causa carcinoma hepatocelular. Os outros 75% não obrigatoriamente evoluem para cirrose, se permanecerem nos estágios de fibrose compensados (Than et al, 2015). Menos de 1% dos pacientes com esteatose ainda podem progredir para CHC (carcinoma hepatocelular) não cirrótico (Buzzetti et al., 2016)

Indo de encontro ao descrito no parágrafo anterior, Cotrim et al. (2016), realizaram uma pesquisa em 6 estados brasileiros com 110 pacientes com CHC



derivado da DHGNA e mostraram que destes, 65,5% eram homens, 52,7% eram obesos e 60% tinham síndrome metabólica, além disso ela ainda demonstrou que um número elevado de pacientes (30,8%) desenvolveram CHC com esteatohepatite sem cirrose.

## 1.2. Etiologia da DHGNA

A DHGNA integra um espectro de doenças que vai desde uma simples esteatose até a EHNA que é o acúmulo de gordura no parênquima hepático com inflamação, fibrose, cirrose e podendo progredir para CHC a longo prazo. (Than et al, 2015; Buzzeti et al, 2016).

A doença hepática gordurosa não alcoólica é caracterizada pelo acúmulo de gordura no parênquima hepático sem inflamação na ausência do consumo excessivo de álcool ( $\leq 20$ /dia para homens e 10g/dia para mulheres) ou do uso de fármacos esteatogênicos de longo prazo, como amiodarona ou corticosteróides (Than et al, 2015; Buzzeti et al, 2016; Sivell, 2019).

A relação da DHGNA com a síndrome metabólica pode ser bidirecional, principalmente quando relacionado à diabetes e hipertensão, o que sugere que assim como a síndrome metabólica aumenta o risco de DHGNA, a DHGNA também aumenta diversas características e comorbidades da síndrome metabólica. Logo, um tratamento eficaz para DHGNA pode ter o benefício adicional de melhorar as características da síndrome metabólica (Friedman et al, 2018).

De interesse diferentes grupos étnicos têm propensões díspares à doença avançada: indivíduos hispânicos são mais suscetíveis que pacientes brancos, enquanto pacientes negros tem menos suscetibilidade (Sanyal, 2019; Sivell, 2019; Younossi et al, 2017). A menor incidência do espectro DHGNA em pacientes afro americanos nos Estados Unidos é relativa às diferenças genéticas no metabolismo lipídico, ou seja, esse grupo de pacientes têm níveis séricos de triglicérides menores e maiores níveis de HDL (Lipoproteína de alta densidade) que pacientes hispânicos ou brancos com DHGNA (Younossi et al, 2017). Além disso, fatores genéticos, como o polimorfismo do gene *PNPLA3* (proteína 3 contendo o domínio fosfolipase do tipo patatina), que regula a lipólise das vesículas de lipídios nos hepatócitos; *TM6SF2* (transmembrana 6 membro da superfamília 2), *CD14* e *GCLC* (*Glutamate—cysteine*

*ligase catalytic subunit*) são relacionados a uma progressão mais agressiva do espectro DHGNA (Yilmaz, 2012; Younossi et al, 2017; Friedman et al, 2018).

O polimorfismo de *PNPLA3* é um dos fatores genéticos mais relacionados à EHNA (Younossi et al, 2017). Ocorre por polimorfismo de nucleotídeo único rs738409 C>G que resulta em uma substituição de isoleucina por uma metionina na posição 148 (p.Ile148Met) (Yilmaz, 2012), anulando a atividade de hidrólise de triglicerídeos de *PNPLA3* (Kawaguchi et al, 2012). Esse polimorfismo foi relacionado à presença de necroinflamação hepática (Kawaguchi et al, 2012), inflamação portal, inflamação lobular e fibrose (Rotman et al, 2010; Yilmaz, 2012).

Todavia a predisposição genética deve ser inserida no contexto de fatores ambientais, pois estes também possuem papel significativo no desenvolvimento da doença. Os principais fatores não genéticos são os hábitos alimentares, o sedentarismo e fatores socioeconômicos (Younossi et al, 2017). Estudos socioeconômicos mostram que a insegurança alimentar pode ser um fator de risco não genético independente associado à DHGNA em famílias de baixa renda (Golovaty et al, 2019).

A insegurança alimentar é definida como “disponibilidade limitada ou incerta de alimentos nutricionalmente adequados e seguros ou capacidade limitada ou incerta de adquirir alimentos aceitáveis de formas socialmente aceitáveis” (Frohme et al, 2020). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), entre 2017 e 2018, dos 68,9 milhões de lares brasileiros, 36,7% apresentaram algum nível de insegurança alimentar. Segundo Golovaty et al. (2019), a insegurança alimentar pode provocar um ciclo complexo de ingestão alimentar deficiente e consumo excessivo compensatório de alimentos de má qualidade, causando um risco metabólico aumentado. Além disso, baixos níveis de atividade física estão associados ao desenvolvimento de DHGNA (Younossi et al, 2017).

### **1.3. Patogênese da DHGNA**

Atualmente, o modelo mais aceito para desenvolvimento da EHNA é o da teoria de múltiplos *hits* (*Multiple-hits Hypothesis*), na qual se propõe que vários *hits* podem atuar em paralelo, finalmente resultando em inflamação do fígado. Nessa teoria os hábitos alimentares, fatores genéticos, epigenéticos e ambientais podem conduzir ao desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade com proliferação

de adipócitos e mudanças na microbiota intestinal (Tilg & Moschen, 2010; Buzzetti et al., 2016; Friedman et al., 2018; Tilg, Adolph & Moschen, 2021) (**Figura 1**).

De acordo com essa teoria, a condição inicial para acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos é a resistência à insulina, pois resulta em um aumento da *de novo lipogênese* (DNL) hepática (isto é, conversão de carboidratos em lipídeos para armazenamento), diminuição da oxidação de ácidos graxos livres (AGLs), prejudica a lipólise do tecido adiposo, com consequente aumento do influxo de AGLs para o fígado e diminuição da secreção hepática de VLDL (*very low density lipoprotein-triglyceride*) (Tilg & Moschen, 2010; Buzzetti et al., 2016; Friedman et al., 2018).

A resistência à insulina também causa disfunção no tecido adiposo, levando a uma alteração na produção e secreção de adipocinas e citocinas pró inflamatórias (Tilg & Moschen, 2010; Buzzetti et al., 2016; Friedman et al., 2018). A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória que sinaliza através dos receptores de adiponectina adipor1 e adipor2. Ao se ligar ao adipor1 hepático, a adiponectina ativa a via Ampk/Sirt1 que leva a inibição do acúmulo hepático de lipídeos. No entanto, a obesidade provoca hipoadiponectinemia, inibindo esse mecanismo e contribuindo para o acúmulo lipídico hepático (Tilg & Moschen, 2010; Buzzetti et al., 2016). Em pacientes obesos os níveis de leptina aumentam como consequência da resistência à leptina e ela passa a ter um papel pró fibrinogênico (Buzzetti et al., 2016). A leptina estimula as células de Kupffer a produzir Tgf- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformador beta 1) e posteriormente também ativa as células estreladas através das vias *hedgehog* e *mTOR* (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) (Buzzetti et al., 2016).

A disfunção no tecido adiposo ainda provoca o aumento da produção de citocinas como Il-6, Tnfa e Jnk pelo tecido adiposo, que ao serem liberadas para a circulação passam a favorecer a inflamação hepática ao ativar as células estreladas quiescentes, assim promovendo a deposição de matriz fibrosa (Tilg et al, 2010; Buzzetti et al, 2016).

A gordura se acumula no fígado na forma de triglicerídeos (TG), o que ocorre contemporaneamente com aumento da lipotoxicidade gerada pelos AGLs, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos. Os AGLs e o colesterol, principalmente quando acumulados nas mitocôndrias, são tidos como os lipídeos “agressivos” que levam ao

dano hepático mediado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tilg & Moschen, 2010).

Além disso, a alteração da microbiota intestinal causa a produção adicional de AG no intestino, aumento da permeabilidade do intestino delgado e, portanto, aumento da absorção de AG. Como consequência, a disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e produção de ROS e mecanismos associados ao estresse do retículo endoplasmático são ativados, sendo esses os principais fatores para o desenvolvimento da inflamação, apoptose celular e fibrose (Buzzetti et al, 2016).

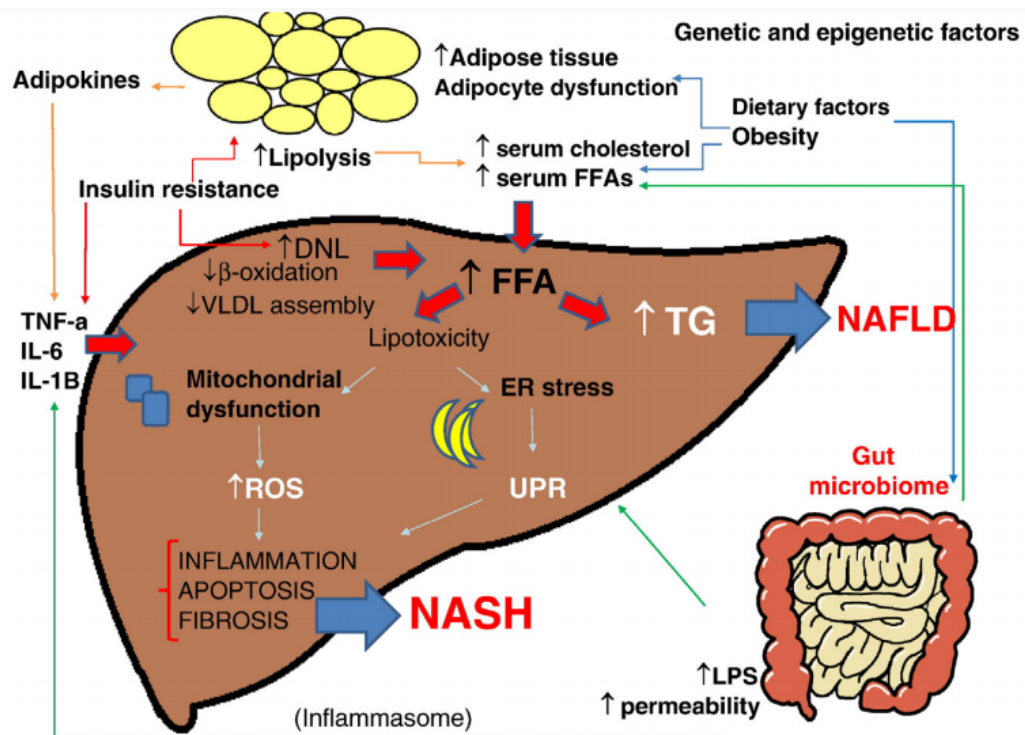
As mudanças na microbiota intestinal e aumento da permeabilidade do intestino podem causar aumento circulante de lipopolissacarídeo (LPS; endotoxina), denominada endotoxemia (inflamação de baixo grau), que exerce importante papel nas respostas imunes inatas (Tilg & Morshen, 2010; Kirpich et al., 2015; Ghetti et al., 2017). O LPS promove a produção de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos hepáticos, resultando na inflamação hepatocelular (Kirpich et al., 2015).

O LPS é reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões, dentre eles os receptores *toll-like* (TLR), principalmente o TLR4 e TLR9 (Kirpich et al., 2015; Ghetti et al., 2017). No fígado saudável as vias dos TLRs são quiescentes, no entanto, com o aumento de LPS circulante que chega ao fígado, essas vias são ativadas (Miura & Ohnishi, 2014). A estimulação de TLR4 em células de Kupffer induz a produção de citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$ , e ROS. A interação entre LPS e TLR4 também ativa receptores em células estreladas hepáticas, resultando na fibrogênese hepática (Ghetti et al., 2017). O aumento dos níveis de LPS ainda pode causar lesão hepática através de um mecanismo mediado por inflamassoma que inclui proteínas NLRP (*Nucleotide-binding oligomerization domain*), que por sua vez manipulam a clivagem de interleucinas pró-inflamatórias como as interleucinas 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e 18 (IL-18) (Kirpich et al., 2015; Ghetti et al., 2017).

Em indivíduos com predisposição genética (Yilmaz, 2012; Younossi et al, 2017; Friedman et al, 2018) ou modificações epigenéticas (incluindo metilação do DNA, modificação de histonas e alteração na expressão de microRNAs) (Buzzetti et al, 2016; Xu et al, 2020) podem afetar o conteúdo de gordura nos hepatócitos e o ambiente inflamatório no fígado, e assim levando a um estado de inflamação crônica por vias heterogêneas de danos hepatocelulares, com possível progressão a morte hepatocelular, ativação de células hepática estrelada e deposição de matriz fibrosa (Buzzetti et al, 2016).

Apesar do conhecimento geral que esteatose precede a inflamação, há evidências de que a EHNA e a esteatose podem surgir como duas condições similares independentes e a inflamação pode preceder a esteatose (Tig & Moschen 2010): o momento em que se combinam os fatores genéticos, eventos externos e intracelulares, em vez da soma simples de insultos hepáticos resultam em diferentes vias que levam a esteatose ou à EHNA, respectivamente (Yilmaz et al, 2012).

**Figura 1. Multiple Hit Hypothesis.**



Legenda: Hipótese de múltiplos *hits* para o desenvolvimento da DHGNA. Fatores alimentares e ambientais junto à obesidade elevam os níveis séricos de AGLs e colesterol, desenvolvimento de resistência à insulina, incremento do tecido adiposo, alterações na microbiota intestinal. A resistência à insulina induz a lipólise do tecido adiposo e liberação de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$  e IL-6. No fígado a resistência à insulina amplifica a lipogênese de novo. O aumento do influxo de AGLs para o fígado deriva dos processos acima e de uma atividade alterada da microbiota intestinal. A síntese e o acúmulo de TG, níveis tóxicos de AGLs e colesterol causam disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e produção de ROS pelo retículo endoplasmático, levando à inflamação hepática. Além disso, as alterações na microbiota intestinal causam a liberação de LPS e citocinas pró-inflamatórias que irão contribuir para o agravamento da inflamação. Fatores genéticos e modificações epigenéticas podem influenciar o risco de progressão para inflamação e

fibrose (EHNA) ou a permanência em um estágio estável da doença (DHGNA) (Buzzetti et al, 2016).

#### **1.4. THOP1 e a DGHNA**

A Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15; EP 24.15; THOP1) é uma oligopeptidase com 77 kDa que metaboliza peptídeos na faixa ideal de 8-12 aminoácidos, pois seu sítio catalítico fica profundamente localizado no fundo de um canal estreito (Brown, 2001; Ray, 2004; Gewehr et al, 2020). Esta oligopeptidase pertence à família M3 das metaloproteases, que por sua vez, possui outras oito oligopeptidases que possuem sequência similar a THOP1, como por exemplo a neurolisina (EP. 24.16) (Brown, 2001; Ray, 2004). Além da sequência similar, esta família de oligopeptidases também tem em comum o domínio: His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), que faz parte do sítio ativo de ligação para o cofator de metal (Ray, 2004, Ferro et al, 2020).

A THOP1 é amplamente distribuída nos tecidos dos mamíferos, com altos níveis de expressão no cérebro, glândula pituitária, testículos e fígado (Ray et al, 2004; Gioli-Pereira et al, 2003). A THOP1 está presente em diferentes localizações subcelulares, conforme o tipo celular, já tendo sido descrita em sua forma secretada e citosólica, associada a membrana e ao núcleo, o que é consistente com uma diversidade de papéis fisiológicos (Ray, 2004; Icimoto et al, 2017, Gewehr et al, 2020). Já foi descrito que a THOP1 está presente principalmente nos hepatócitos peri centrolobulares (zona 3), o que é de extrema relevância visto que a maioria das hepatotoxinas que induzem necrose, além da lesão isquêmica, é predominante nesta região (Pereira, 2003).

A THOP1 hidrolisa variados peptídeos do sistema nervoso central e de outros tecidos, incluindo bradicinina, neurotensina, peptídeos opióides, angiotensina I e GnRH (Rioli et al, 2003; Icimoto et al, 2017; Ferro et al, 2020). Estudos mostram que a THOP1 tem um aumento de expressão relacionado a interações epigenéticas em adenocarcinoma de pulmão de mau prognóstico; e também está associada à apresentação de antígeno MHC-I e à inativação de diversos neuropeptídeos (Silva et al., 1999; Rioli et al, 2003; Heimann et al, 2005). Além disso, a THOP1 também demonstrou ter função na sepse, no metabolismo periférico da bradicinina relacionado à resposta inflamatória à dor e em afetar o comportamento dos animais, como depressão, atenção e retenção de memória (Santos et al, 2019). A THOP1

ainda foi relacionada ao Alzheimer e à retinopatia diabética precoce (Sundstrom et al, 2018).

Ainda que a maior atividade da THOP1 seja considerada no sistema neuroendócrino, sua expressão é relativamente mais alta no fígado (Nomoto et al, 2014). Nomoto et. al., 2014 e Shimizu et al, 2017, observaram que no carcinoma hepatocelular humano, a expressão da THOP1 se correlaciona positivamente com a evolução do carcinoma hepatocelular, o que sugere que a THOP1 possa ser um bom biomarcador preditivo para a evolução do carcinoma. Em um modelo primata de obesidade materna a THOP1 estava diminuída no fígado dos fetos e sua expressão era inversamente proporcional aos microRNA miR-130a-3p e miR-143-3p, que por sua vez tem a THOP1 como alvo (Puppala et al, 2018).

Um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo, demonstrou que camundongos nocaute para THOP1 são protegidos da indução de obesidade e consequentemente de esteatose por dieta hiperlipídica, podendo ser esse um novo tratamento para obesidade e suas comorbidades (Gewehr et al, 2020). De interesse, os camundongos nocautes para THOP1 quando desafiados com dieta hiperlipídica apresentam uma regulação diferente de microRNAs no fígado encontrada nos animais selvagens obesos (Gewehr et al, 2020). Deste modo, surge a hipótese de que peptídeos possam interagir com microRNAs ou regular sua expressão.

### **1.5. Relação entre a THOP1, microRNAs e a DHGNA**

Os microRNAs (miRNAs; miRs) são pequenos RNAs não codificadores que possuem de 19-22 nucleotídeos de tamanho. Eles se localizam em regiões intergênicas ou em íntrons de outros genes e estão geralmente envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão gênica atuando por repressão translacional, promovendo a degradação do RNAm, através do pareamento parcial de bases na região 3'UTR dos RNAs alvos (Ambros et. al., 2004; Bartel et. al., 2004).

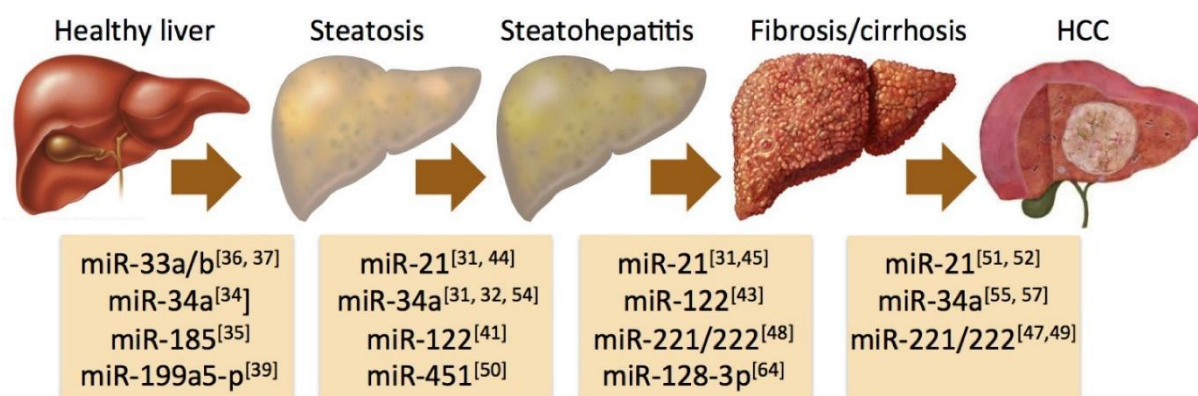
A biogênese canônica dos microRNAs tem início no núcleo da célula, a partir da transcrição do pri-miRNA a partir da RNA polimerase II, que por sua vez é clivado pelo complexo DROSHA+DGCR8 originando o pré-miRNA. A exportina-5 transporta o pré-microRNA para o citoplasma, onde mais uma vez ele é clivado pelo complexo Dicer, que separa a dupla fita, assim gerando o microRNA maduro. O microRNA

maduro é carregado para o seu alvo pelo conjunto de proteínas RISC e AGO2. Quando interage com seus alvos, as ações do microRNA podem causar a repressão do RNAm ou inibir a tradução proteica (Bartel, 2004; Szabo et. al. 2013; Baffy, 2015).

Estudos recentes mostram que microRNAs circulantes podem atuar como biomarcadores da DHGNA e sua progressão (**Figura 2**) (Szabo et. al., 2013; Pirola et. al., 2014; Baffy, 2015; Becker et. al. 2015; Liu et. al., 2018). Um dos microRNAs mais responsivos a lipídeos é o miR-34a, que é altamente expresso no fígado e no soro de camundongos mantidos em dieta rica em gordura e em humanos seus níveis se correlacionam positivamente com a gravidade da EHNA (Castro et al, 2012; Baffy, 2015; ). Um dos principais alvos do miR-34a é a SIRT-1, que tem papel fundamental na homeostase energética ao ativar fatores de transcrição como o PPAR $\alpha$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa), LXR (receptor x do fígado) e p53 (proteína tumoral 53) (Pogribny et al., 2010; Rottiers & Näär, 2012; Baffy, 2015).

A ativação de p53 aumenta a expressão do miR-34a, que por sua vez induz apoptose e parada do ciclo celular na fase G1 (Tarasov et al., 2007; Rottiers & Näär, 2012). Ainda foi observado que a estimulação do receptor de endocanabinóide 1 (CB1) favorece a expressão do miR-34a via ativação de p53 que agrava a injúria hepática pela via PPAR $\alpha$ /SIRT1.

**Figura 2.** Implicação de microRNAs nas principais transições da patogênese da DHGNA.



Legenda: miRNAs que apresentam ter um impacto na progressão da DHGNA. (Baffy, 2015)

Estudos recentes têm demonstrado que a interação dos microRNAs com proteínas vai além da participação destas em sua biogênese. Pai et. al. (2016)



demonstraram, *in vitro*, que os peptídeos LKKLLKLLKKWLKLKG e LKKLLKLLKKLWKLKG inibiram a maturação do miR-155 catalisado pela Dicer e aumentaram a expressão dos genes alvos do miR-155. Pai et. al., utilizando modelagem molecular, sugere que um inibidor peptídico se liga preferencialmente à região apical do pré-miR-155, desta forma suprimindo o processamento do miR-155 pela Dicer. De forma similar ao estudo anterior, Shortridge et. al. (2017) demonstraram que o peptídeo L50 se liga ao pré-miR-21 em uma região que se sobrepõe ao local de clivagem da Dicer, assim inibindo o processamento do pré-miR-21. Usando modelagem molecular, Gewehr et al. (2020) observaram que os peptídeos May1 (AQGGVLPNIQAVLLPK) e May7 (SQTFPNADFAEITKL) interagem com pré-miR-143 e pré-miR-222 murino na região correspondente ao microRNA maduro, assim sugerindo que os que os peptídeos intracelulares poderiam regular as funções do microRNA interferindo em seu processamento e/ou estabilidade endógena.

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que a deleção da THOP promove o acúmulo de oligopeptídeos que vão interferir, de forma direta e/ou indireta, no processamento de microRNAs, causando assim a melhora do quadro esteatótico e fibrótico.

## 2. Justificativa

A EHNA faz parte de um espectro de doenças relativas à síndrome metabólica que afeta, aproximadamente, 24% da população mundial, o que corresponde a mais de 1,8 milhões de pessoas, visto que a maior parte das pessoas afetadas apresentam sobrepeso ou obesidade associado a um estilo de vida sedentário e com dieta rica em carboidratos e lipídeos (Younossi et al, 2017; Younossi et al, 2019).

Dado a alta incidência da EHNA e a falta de fármacos específicos para o seu tratamento, se faz necessária a busca por novos alvos terapêuticos para enfrentar essa pandemia. O silenciamento da THOP1 é eficaz para proteger os animais da indução da esteatose por dieta hiperlipídica, no entanto, ainda não está elucidado o mecanismo pelo qual essa proteção ocorre e nem qual o papel dos microRNAs neste processo.

Neste tudo, hipotetizamos que os animais nocautes para THOP1 (THOP<sup>-/-</sup>) alimentados com dieta deficiente em colina são resistentes ou possuem o fenótipo mais brando de EHNA. Com o intuito de elucidar como os microRNAs estão relacionados aos peptídeos processados pela THOP1, associamos o fenótipo dos animais à expressão hepática dos microRNAs e seus alvos. Além disso, avaliamos também o peptidoma do fígado dos animais THOP<sup>-/-</sup> ao longo do tempo para entender qual a modulação dos peptídeos após deleção da THOP1.

A partir dos resultados obtidos nesse projeto, sugerimos que peptídeos acumulados por consequência da deleção da THOP1 podem regular a expressão de microRNAs envolvidos com a etiopatogenia da DHGNA. Nossos resultados podem contribuir na busca de novos alvos terapêuticos para o tratamento da EHNA.

### 3. Objetivo

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar a modulação dos peptídeos intracelulares processados pela THOP1 e a sua correlação com a regulação de microRNAs em um modelo de esteatohepatite.

#### 3.2. Objetivos específicos

- i. Caracterizar o modelo THOP<sup>-/-</sup> alimentado com dieta hiperlipídica deficiente em colina através da avaliação de mudanças fenotípicas e metabólicas.
- ii. Evidenciar as alterações morfológicas hepáticas decorrentes do consumo da dieta hiperlipídica deficiente em colina.
- iii. Examinar a expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico hepático.
- iv. Avaliar diferenças na expressão de microRNAs, relacionados à DHGNA, entre o animal THOP<sup>-/-</sup> e *wild type* alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina.
- v. Avaliar diferenças no conteúdo peptídico hepático entre o animal THOP<sup>-/-</sup> e *wild type* alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina.

## **4. Metodologia**

### **4.1. Animais**

Foi utilizada a linhagem de camundongos C57BL/6 selvagem (WT) ou knockout para THOP1 (KO ou THOP<sup>-/-</sup>). Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 horas e temperatura de 23±2° C, com ração Nuvlab e água ad libitum até o início dos tratamentos (8 semanas de idade). Todos os procedimentos deste estudo seguiram os princípios éticos de experimentos animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (138/2015).

### **4.2. Protocolo experimental e terapêutico**

Animais machos WT e KO com 8 semanas de idade foram alimentados com dieta hiperlipídica deficiente em colina (DC) (31.5% gordura, 14.0%Kcal proteína e 54.5% carboidrato - Rhoster RH19576, Brasil - Tiburcio et al., 2017) ou alimentados com dieta padrão de biotérios (C) (76%kcal carboidratos, 9% kcal gordura, 15% kcal proteínas, Nuvlab CR1), a qual tem colina e metionina e L-aminoácidos definidos. Os animais foram alimentados com essas dietas por 8, 15 e 24 semanas para acompanhar a progressão da doença.

A DC foi baseada no estudo de Matsumoto et al (2013) que mostrou que a dieta mimetiza melhor o quadro de esteatohepatite em humanos, além disso não induz caquexia como a dieta deficiente em colina e metionina. A colina é um componente da fosfatidilcolina (PC) e a PC é o principal constituinte dos VLDLs, se fazendo necessário para a secreção e exportação de gordura do fígado (Zeizel et al, 2018). Logo, uma dieta com deficiência em colina é hábil em induzir esteatose porque dificulta a saída da gordura do fígado.

Foram formados 4 grupos: 1) WT-C, 2) WT-DC, 3) KO-C, 4) KO-DC. Após 8, 15 e 24 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados e coletou-se amostras de sangue, fígado e tecidos adiposos. O soro foi separado e utilizado para dosagens bioquímicas. O fígado foi utilizado para análises histopatológicas, quantificação da expressão de microRNAs e RNAm por transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR) e peptidoma.

### **4.3. Análise de composição corporal**

A gordura corporal total, massa magra e fluído corporal livre foram mensurados por ressonância magnética nuclear no domínio do tempo (TD-NMR, do inglês time-domain nuclear magnetic resonance) usando o analisador de composição corporal de camundongos minispec LF50 (Bruker, Germany). Esta análise foi realizada antes do início da dieta para indução de esteatose e no final do período de cada protocolo.

### **4.4. Ingestão alimentar, ganho de peso e massa de gordura**

O peso e a ingestão alimentar foram acompanhados ao longo dos tratamentos. Ao final foi mensurado o peso do depósito da gordura epididimal, retroperitoneal e mesentérica para cálculo do índice de adiposidade.

### **4.5. Avaliação da responsividade à insulina**

A responsividade à insulina foi avaliada pela determinação da glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT). Para o ensaio de GTT, os animais em jejum prévio de 6 horas receberam uma dose de glicose (2 g/kg p.c.) por injeção intraperitoneal. A glicemia foi mensurada e monitorada por um glicosímetro por coleta de sangue caudal nos seguintes tempos: 0 (pré-injeção), 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração de glicose.

Para o ensaio de ITT, os animais em jejum de 6h receberam 0,5UI/kg p.c. de insulina regular (Novolin R). A glicemia foi então mensurada e monitorada a cada 4min através do glicosímetro por coleta de sangue capilar caudal, nos seguintes tempos: 0 (pré-injeção), 4, 8, 12, 16, 20 minutos após a administração de insulina. A constante de decaimento de glicose do plasma ( $K_{ITT}$ ) foi calculada a partir da curva glicêmica obtida do ITT entre os intervalos de 4-16min.

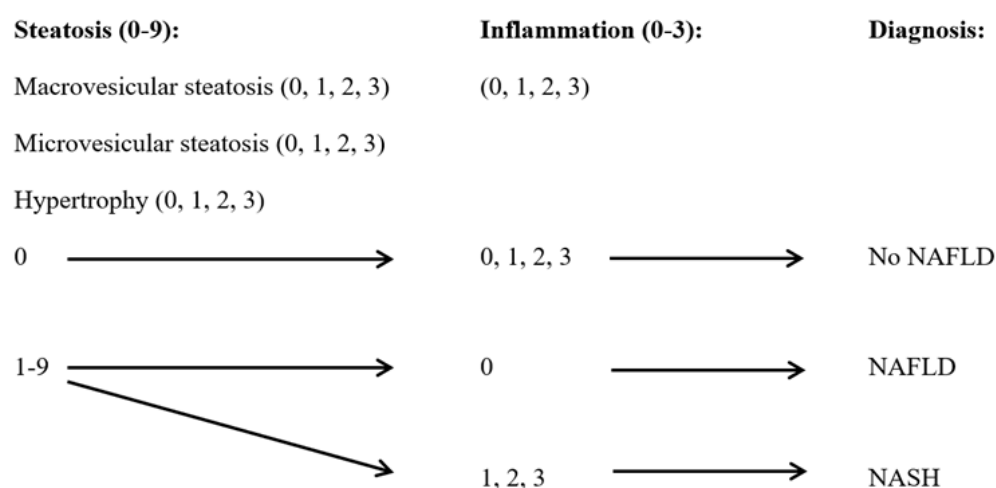
### **4.6. Análise histopatológica do fígado**

Uma seção de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> do lobo médio do fígado dos animais foi separada para histologia. As seções foram divididas ao meio e uma parte foi fixada em solução tamponada de formol a 10%. Após fixação, procedeu-se a

lavagem em álcool 70G°L para desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilóis, inclusão em parafina, microtomia de 5 µm e coloração pela técnica de Hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson. Foram analisados e fotomicrografados 3 cortes de cada fígado em microscópio óptico.

As lâminas coradas em HE foram utilizadas para avaliação do score NAFLD, o qual estabelece uma escala de 0 a 3 para cada um dos parâmetros avaliados, isto é: esteatose macrovesicular, esteatose microvesicular, hipertrofia e inflamação. Ao final, formou-se o score de esteatose (0-9) e o de inflamação (0-3). Ling et al, propõe que se o score de esteatose for 0 e o de inflamação for 0-3, não há DHGNA; se o score de esteatose for 0-9 e o de inflamação for 0, há DHGNA; e por fim, se o score de esteatose for 0-9 e o de inflamação for 1-3, há EHNA (Figura 1) (Liang et al., 2014).

**Figura 3.** Diagrama de diagnóstico para DHGNA de roedores.



Legenda: As duas características principais da EHNA, esteatose (0–9) e inflamação (0–3), foram usadas no sistema de pontuação proposto para roedores (Liang et al., 2014).

As lâminas coradas com tricrômico de masson foram utilizadas para avaliação de tecido conjuntivo (fibrose) no parênquima hepático através do critério de Brunt, o qual gradua a fibrose de 0 a 4 da seguinte forma: 0 (ausente), 1 (fibrose perisinusoidal/pericelular), 2 (fibrose periportal), 3 (fibrose em ponte) e 4 (cirrose). (Brunt et al, 1999; Santiago-Rolón et al, 2015)

#### 4.7. Extração de RNA

O RNA total do fígado foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do RNA total foram medidas usando um espectrofotômetro BioDrop  $\mu$ LITE (BioDrop, Cambridge, UK).

#### 4.8. Expressão de microRNA por qPCR

A quantificação relativa dos microRNAs miR-149, miR-212, miR-127, miR-182 e miR-34a foi realizada por RT seguido de qPCR pelo sistema de detecção Taqman. Inicialmente a reação de transcrição reversa de microRNA foi realizada a partir de 10ng de RNA total utilizando o kit síntese de cDNA miRNA TaqMan advanced (Thermo Fisher). O cDNA obtido foi diluído (1/10) em água livre de nucleases e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para a PCR, os iniciadores necessários para cada miRNA foram adquiridos da Applied Biosystems (**Tabela 1**). A expressão dos miRNAs foi realizada por qPCR com detecção por Taqman®, utilizando o equipamento QuantiStudio3, seguindo o protocolo universal de amplificação:  $95^{\circ}\text{C}$  10 min seguido de 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15s e  $60^{\circ}\text{C}$  1min, seguido de curva de dissociação. Para a quantificação da expressão gênica utilizou-se o método de quantificação relativa, utilizando-se o miR451a-5p como constitutivo.

**Tabela 1.** Primers utilizados para quantificar expressão de microRNAs

Primer	ID
mmu-miR-451a-5p	mmu482766_mir
mmu-miR-127-3p	mmu480910_mir
mmu-miR-149-5p	mmu480946_mir
mmu-miR-182-5p	mmu480960_mir
mmu-miR-212-3p	mmu478318_mir
mmu-miR-34a-5p	mmu481304_mir

#### 4.9. Expressão de RNAm por qPCR

A expressão do RNAm dos genes relacionados ao metabolismo lipídico, inflamação e fibrose foi quantificada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por qPCR (RT-qPCR). A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o

kit High Capacity (Life Technologies) a partir de 1000 ng de RNA total do fígado. A quantificação do RNAm dos genes alvos foi realizada por PCR em tempo real no equipamento QuantiStudio 3, utilizando os iniciadores descritos na **Tabela 2**. Para normalização da expressão utilizou-se a média entre os genes constitutivos Gapdh e 36b4.

**Tabela 2.** Sequência dos primers utilizados para quantificar a expressão de RNAm.

Gene	Empresa	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 3' - 5'
<i>36B4 (RPLP0)</i>	EXXTEND	TAAAGACTGGAGACAAGGTG	GTGTA CT CAGTCTCCACAGA
<i>ACC</i>	EXXTEND	CCAGCAGATTGCCAACATC	ACTTCGGTACCTCTGCACCA
<i>APOA5</i>	SIGMA	GAGTCGAGTGCTGCACCATA	TCGCCTTACGTGTGAGTTTG
<i>APOB</i>	EXXTEND	GTCTACTTCCACCCACAGTCCC	TGCTTTTTAGGGAGCCTAGCA
<i>ASMA</i>	EXXTEND	CAGGGAGTAATGGTTGGAAT	TCTCAAACATAATCTGGGTCA
<i>ATGL (PNPLA2)</i>	EXXTEND	GGTCTCTGCATCCCTCCTT	AGACATTGGCCTGGATGAGC
<i>CD206</i>	SIGMA	AACAAGAATGGTGGGCAGTC	TTTGCAAAGTTGGGTTCTCC
<i>CD36</i>	EXXTEND	TGGAGCTGTTATTGGTGCAAG	TGGGTTTTGCACATCAAAGA
<i>CD86</i>	SIGMA	GACCGTTGTGTGTGTTCTGG	GATGAGCAGCATCACAAGGA
<i>COL1A1</i>	EXXTEND	CGATGGATTCCCGTTTCGAGT	GAGGCCTCGGTGGACATTAG
<i>CPT1A</i>	EXXTEND	GGCCACAAATTATGTGAGTGA	GAGCATCTCCATGGCGTAGT
<i>DICER</i>	EXXTEND	ACCAAGTGATCCGTTTACGC	CAACCGTACACTGTCCATCG
<i>FGF-21</i>	EXXTEND	CTGCTGGGGGTCTACCAAG	CTGCGCCTACCACTGTTCC
<i>IL-10</i>	SIGMA	ACTGCTATGCTGCCTGCTCT	TCATTTCCGATAAGGCTTGG
<i>IL-1B</i>	SIGMA	CAGGC AGGCAGTATCACTCA	AGCTCATATGGGTCCGACAG
<i>IL-6</i>	EXXTEND	TGATGCACTTGCAAGAAACA	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC
<i>IRS1</i>	EXXTEND	CCCTCTCAACAGCAGTCCCT	TTACGCTATTGACGATCCTC
<i>NCOR1</i>	EXXTEND	CTGCTCCGCATCAAGTGATAA	CCAGGAGTTCCTGTGAGATA
<i>NF-KB</i>	IDT	CGTTTTACTCTTTATCTCGCTTTTCG	GGCTATATGGCCTAAGGCATGG
<i>PGC1A</i>	EXXTEND	CACCAAACCCACAGAAAACAG	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG
<i>PPARA</i>	EXXTEND	TCGAATATGTGGGGACAAGG	TCTTGCAGCTCCGATCACAC
<i>PPARB</i>	EXXTEND	GGATTCTGCGGAGCCTGC	AGATGGACTGCCTTTACCGTG
<i>PPARG</i>	EXXTEND	CAAACCTGATGGCATTGTGAG	ATCTTAACTGCCGGATCCAC
<i>RORG</i>	SIGMA	TGCAAGACTCATCGACAAGG	GGGGATTCAACATCAGTGCT
<i>TGFB1</i>	EXXTEND	GTGGAAATCAACGGGATCAG	ACTTCCAACCCAGGTCCTTC
<i>TIMP1</i>	EXXTEND	GTAAGGCCTGTAGCTGTGCC	AGGTGGTCTCGTTGATTTCT
<i>TNFA</i>	EXXTEND	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
<i>TRAF6</i>	SIGMA	GCCCAGGCTTGTTATAATGT	AGCTCGCCACGTACATACT
<i>UCP2</i>	EXXTEND	CTGCGGTCCGGACACAATA	CCCGATCCCCTCGATTTTC



#### **4.10. Extração de proteínas**

O tecido hepático (0,1-0,3g) foi homogeneizado com o tampão cell disruption buffer do kit miRVana (600ul). O homogenato foi incubado no gelo e depois centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi retirado e a concentração protéica foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

#### **4.11. Quantificação de citocinas inflamatórias**

A avaliação quantitativa de IL-6, IL-10, IL-1b e IL-17 foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) para camundongos, de acordo com as fabricações do fabricantes (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN)

#### **4.12. Extração de peptídeos**

Os peptídeos foram extraídos a partir de ~50 mg de fígado macerado congelado em Nitrogênio líquido. Adicionou-se ~3,5 ml de água deionizada ultrapura a 80°C e incubou-se as amostras em banho-maria a 80°C por 20 minutos e em seguida foram deixadas em gelo 30 minutos. As amostras foram acidificadas com HCl para um concentração final de 10 mM e então foram centrifugadas a 3000 rpm por 50 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e foi transferido para filtros de exclusão molecular de 10 kDa (MCWO 10000, Amicon Ultra™, MILLIPORE, St. Louis, MO, EUA), os quais foram centrifugados a 3000 rpm por 45 minutos à 4°C. O volume que passou pelo filtro de exclusão foi então transferido para a coluna OASIS do tipo C18 (WATERS, Milford, MA, EUA). Depois de passar pela coluna, as amostras foram liofilizadas e então ressuspensas com 100 uL de água ultrapura e quantificadas no nanodrop a 214 nM. O peptídeo 5A (LTLRTKL), de composição e concentração conhecidas, foi usado como referência padrão para determinar a concentração de peptídeo.

#### 4.13. Marcação isotópica de peptídeos por dimetilação com formaldeídos modificados P03

Este método de marcação isotópica baseia-se na dimetilação de grupamentos amina com formaldeído (forma leve) e formaldeído deuterado (forma pesada), na presença de cianoborohidreto ou cianoborohidreto deuterado. O produto final das reações de acordo com as combinações entre tipos de formaldeído e de cianoborohidreto adiciona 28, 30, 32 ou 36 Da à massa final de cada peptídeo em cada sítio de marcação disponível (lisina ou N-terminal). Por exemplo, a combinação de formaldeído Leve + Cianoborohidreto normal adiciona 28 Da, formaldeído Leve + Cianoborohidreto Deuterado adiciona 30 Da, formaldeído Pesado + Cianoborohidreto normal adiciona 34 Da, formaldeído Pesado + Cianoborohidreto Deuterado adiciona 36 Da. Essas reações produzem uma diferença de massa de 2 ou 4 Da dos peptídeos marcados de acordo com a combinação realizada e essa diferença pode ser observada no espectro de massas.

Assim, 20 µg de extrato peptídico foram reconstituídas em 100 mM de brometo de tetraetilamônio (TEAB) e o pH ajustado para ficar entre 5 e 6, com volume final de 100 µL. Adicionou-se formaldeído leve ou pesado para concentração final de 0,16% e cianoborohidreto normal ou deuterado para concentração final de 24 mM gerando um marcador para cada amostra, uma de cada grupo de acordo com as combinações citadas acima. Então, as amostras foram incubadas por 16 horas na capela protegidas da luz. Após a incubação, adicionou-se 16 µL de bicarbonato de amônio 1% e 8 µL de ácido fórmico 5%, o pH foi ajustado para 5-6, e as amostras foram combinadas, conforme a **tabela 3**, sendo uma de cada grupo experimental por tubo, e purificadas em coluna OASIS, foram, por fim, liofilizadas e submetidas à espectrometria de massas. A adição de uma amostra de cada grupo por tubo garante que cada corrida no espectrômetro de massas contemple todos os grupos e possibilita, assim, a comparação relativa dos níveis de peptídeos de animais controles com os dos demais grupos experimentais.

**Tabela 3.** Combinação das amostras para espectrometria de massas.

Corrida	Marcador			
	28	30	32	36
1	WT 8S 1	KO 8S 1	WT DC 8s 1	KO DC 8s 1
2	WT 8S 2	KO 8S 2	WT DC 8s 2	KO DC 8s 2
3	WT 8S 3	KO 8S 3	WT DC 8s 3	KO DC 8s 3
4	WT 8S 4	KO 8S 4	WT DC 8s 4	KO DC 8s 4
5	WT 16S 1	KO 16S 1	WT DC 16s 1	KO DC 16s 1
6	WT 16S 2	KO 16S 2	WT DC 16s 2	KO DC 16s 2
7	WT 16S 3	KO 16S 3	WT DC 16s 3	KO DC 16s 3
8	WT 16S 4	KO 16S 4	WT DC 16s 4	KO DC 16s 4
9	WT 24S 1	KO 24S 1	WT DC 24s 1	KO DC 24s 1
10	WT 24S 2	KO 24S 2	WT DC 24s 2	KO DC 24s 2
11	WT 24S 3	KO 24S 3	WT DC 24s 3	KO DC 24s 3
12	WT 24S 4	KO 24S 4	WT DC 24s 4	KO DC 24s 4

#### 4.14. Espectrometria de massa e análise de dados

Os peptídeos foram ressuspensos em 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O 0,01% de ácido fórmico. Foram injetados na coluna 1  $\mu$ g total de peptídeos. Estes foram submetidos a um sistema de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução Synapt G2-Si (Waters Corp.) (LC-MS). Foi empregada uma coluna C18 de fase reversa HSS-T3, 300Å, 300 $\mu$ m x 150mm (Waters Co.), passando por um gradiente linear de 120 minutos onde iniciou-se com 3% de solução B (Acetonitrila e 0.01% de ácido fórmico) e 97% de solução A (Água e 0.01% de ácido fórmico) chegando a 40% de B em 95 minutos e elevado a 85% de B por 5 minutos e retornando para 3% de solução B para re-equilibrar a coluna. Os peptídeos eluídos foram analisados em modo dependente de dados (DDA) em modo positivo, tendo sido utilizado uma faixa de MS de 50 a 2500 Da, scan time de 1s, threshold de 1000, tendo sido selecionado para MS/MS os 12 íons mais intensos por ciclo de aquisição,

com um scan time de 0.5s por MS/MS. Somente foram selecionados íons com carga +2,+3 e +4 e excluídos os íons adquiridos após 20s de aquisição, utilizando para a fragmentação uma rampa de energia de colisão indo de 65V a 75V.

Os arquivos de dados brutos foram convertidos em um formato de lista de pico (mgf) pelo Mascot Distiller versão 2.7.1 (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido) e analisados usando o mecanismo de busca MASCOT versão 2.6. 2 (Matrix Science Ltd., London, UK) e Peaks para identificar peptídeos. Os bancos de dados usados para a pesquisa incluíram SwissProt (555.100 sequências; 198.754.198 resíduos) e a taxonomia *Mus musculus* (16.916 sequências). Nenhum local de clivagem foi especificado e uma tolerância de massa de 0,5 Da foi aplicada aos íons MS e MS / MS. As modificações variáveis incluídas foram acetilação de proteína N-terminal, oxidação de metionina e também os marcadores Me redutores: Dimetil (K), Dimetil (N-term), Dimetil: 2H (2) (N-term), Dimetil: 2H (2 ) (K), Dimetil: 2H (4) (K), Dimetil: 2H (4) (N-term), Dimetil: 2H (6) 13C (2) (K), e Dimetil: 2H (6) 13C ( 2) (termo N).

Todos os resultados da pesquisa foram interpretados manualmente para eliminar falsos positivos. Em resumo, os critérios incluíram (1) massa observada dentro de 40 ppm da massa teórica; (2) o número de marcadores Me observados que correspondem ao número de aminos livres disponíveis (isto é, resíduo de Lys e terminal N se não acetilado); (3) o (s) estado (s) de carga observado (s) do peptídeo eram consistentes com o número esperado de cargas positivas; e, (4)  $\geq 80\%$  dos fragmentos principais que foram observados em íons b ou y compatíveis com MS / MS, com um mínimo de cinco correspondências. Quantificação relativa de cada peptídeo presente em WT e THOP<sup>-/-</sup> de camundongos alimentados com dieta controle ou deficiente em colina, rotulados como “Light 1”, “Light 2”, “Intermediate” ou isótopos “Pesados”, foram executados automaticamente durante o uso do software Mascot (<http://www.matrixscience.com>), versão 2.6.2 (Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido). Os peptídeos que mostraram diferenças entre os tratamentos na quantificação automática foram confirmados manualmente durante o uso de múltiplas varreduras dos espectros de MS. A quantificação manual foi realizada determinando a intensidade relativa de cada pico isotópico, considerando tanto o pico monoisotópico quanto o pico contendo um átomo de <sup>13</sup>C e, em seguida, subtraindo a linha de base devido à sobreposição de picos de massa inferior. A intensidade de cada peptídeo (marcado com uma das formas isotópicas) foi

comparada com o mesmo peptídeo que foi marcado com outra forma isotópica (espectrometria de massa, informação de suporte). Nessas análises, apenas os peptídeos que apareceram nos três tempos de protocolo (8, 15 e 24 semanas) foram selecionados. Foi considerado significativamente diferente peptídeos que aumentaram mais de 100% (duas vezes) ou diminuíram mais de 50% (0,5 vezes) em comparação com os respectivos camundongos WT de controle, alimentados com DC.

#### **4.15. Análise Estatística**

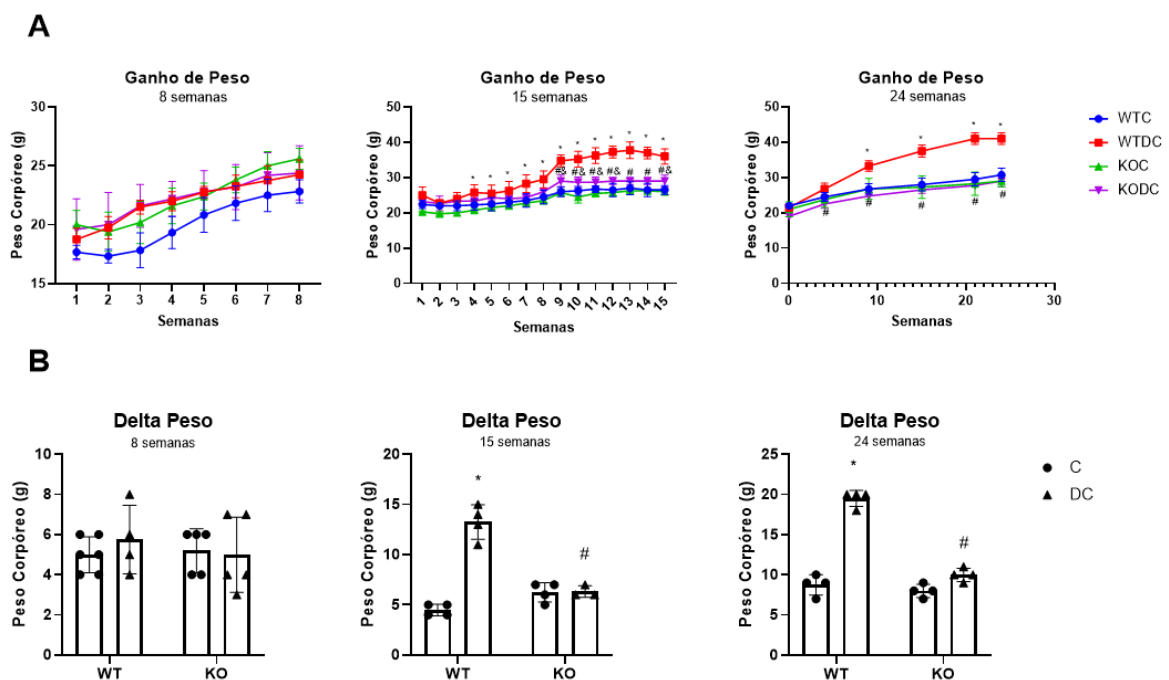
Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey e foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou média  $\pm$  desvio padrão (DP), conforme o caso. O nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. Dieta deficiente em colina gera alterações metabólicas de forma dependente do genótipo

Antes do início do protocolo experimental, os animais apresentavam peso corporal similar e após 8 semanas não houve diferença de peso entre os grupos (**Figura 4**). Ao final de 15 e 24 semanas os animais WTDC apresentaram aumento do peso corpóreo de aproximadamente 40% em relação aos outros grupos (**Figura 4**).

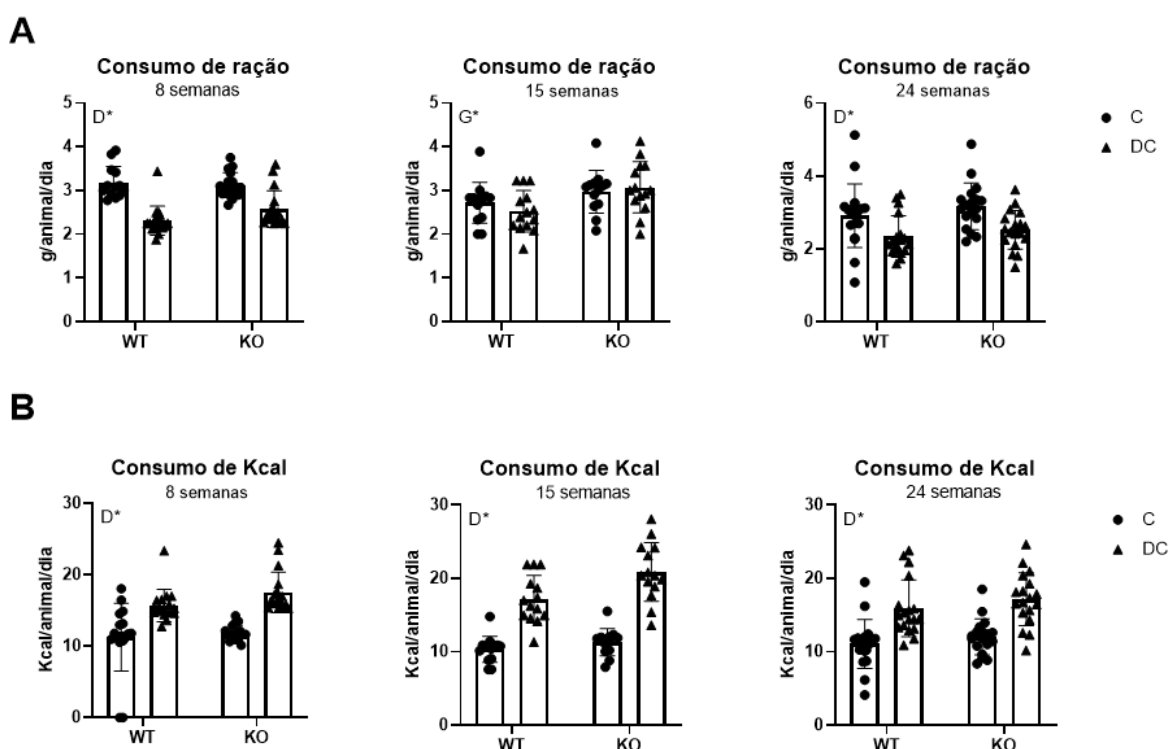
**Figura 4.** Efeito da dieta DC no peso corpóreo de animais WT e KO THOP<sup>-/-</sup> (Ganho de peso e delta peso).



Legenda: (A) Peso corpóreo semanal; (B) Delta peso de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

O aumento de peso não foi relacionado à hiperfagia visto que o consumo de ração dos grupos que foram alimentados com a dieta deficiente em colina foi menor nos protocolos de 8 e 24 semanas (**Figura 5**). Entretanto, devido a maior proporção de lipídios e densidade calórica, o consumo de calorias foi maior nos grupos que receberam dieta deficiente em colina.

**Figura 5.** Consumo alimentar ao longo do período experimental.



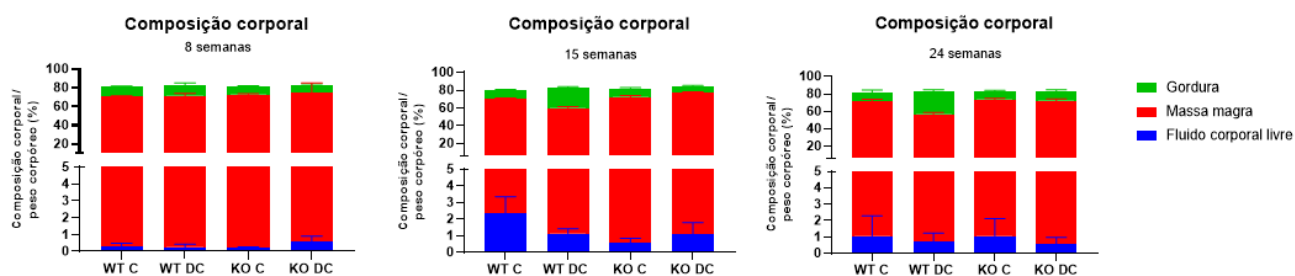
Legenda: (A) Consumo de ração em gramas (g); (B) Consumo de ração em calorias (Kcal) de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

O ganho de peso dos animais WTDC dos protocolos de 15 e 24 semanas foi associado ao aumento das gorduras viscerais (retroperitoneal, perirenal e epididimal), subcutânea (inguinal) e marrom (**Tabela 4**). Os animais WTDC, ao final de 15 e 24 semanas, apresentaram ~24% e 30% mais gordura do que o grupo KODC, respectivamente. Em relação à massa muscular, o peso do sóleo foi similar

entre os grupos em todos os tempos. Ao final de 24 semanas, o gastrocnêmio o peso do gastrocnêmio foi menor nos animais THOP<sup>-/-</sup>. No entanto, na análise de composição corporal a massa magra, assim como o fluido livre corporal, permaneceu de forma similar aos outros grupos. (**Figura 6**).

Na **Tabela 4** descreve-se os dados metabólicos dos animais. Ao final de 8 semanas, a glicemia de jejum estava menor nos animais que receberam a dieta deficiente em colina em relação aos animais que foram alimentados com a dieta controle. No entanto, ao final de 15 semanas, a glicemia de jejum se mostrou maior nos animais nocaute e ao fim de 24 semanas não houve diferença entre os grupos. Os grupos não apresentaram intolerância à glicose, visto que as curvas de decaimento do GTT e áreas sob a curva (AUC) do GTT são similares. Por outro lado, ao final de 8 e 15 semanas, os animais THOP<sup>-/-</sup> que foram alimentados com a dieta deficiente em colina, mostraram maior sensibilidade à insulina do que os grupos WTDC e KOC, refletindo em um maior  $K_{ITT}$  nesses grupos. E ao final de 24 semanas essa diferença se preservou apenas entre os grupos KOC e KODC (**Tabela 4**).

**Figura 6.** Efeito da dieta DC sobre a composição corporal de animais WT e THOP<sup>-/-</sup>.



Legenda: Composição corporal em porcentagem de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. (n ± 6 animais)



**Tabela 4.** Características da obesidade de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC.

Protocolo		WT C	WT DC	KO C	KO DC	DG	DxG
8 semanas	Tecido adiposo Inguinal (g)	0,275 ± 0,02	0,473 ± 0,12	0,222 ± 0,05	0,370 ± 0,08	*	
	Tecido adiposo retroperitoneal (g)	0,062 ± 0,02	0,158 ± 0,08	0,044 ± 0,01	0,103 ± 0,03	*	
	Tecido adiposo epididimal (g)	0,369 ± 0,02	0,675 ± 0,21	0,297 ± 0,04	0,452 ± 0,07	*	
	Tecido adiposo mesentérico (g)	0,141 ± 0,01	0,174 ± 0,11	0,188 ± 0,04	0,113 ± 0,06		
	Tecido adiposo marrom (g)	0,064 ± 0,01	0,068 ± 0,01	0,061 ± 0,01	0,66 ± 0,11		
	Tecido adiposo perirenal (g)	0,047 ± 0,01	0,056 ± 0,02	0,048 ± 0,01	0,064 ± 0,01		
	Gastrocnêmio (g)	0,124 ± 0,01	0,128 ± 0,01	0,136 ± 0,02	0,136 ± 0,02		
	Sóleo (g)	0,010 ± 0,00	0,011 ± 0,00	0,008 ± 0,00	0,018 ± 0,02		
	Glicemia de jejum (mg/dl)	116 ± 21	97 ± 22	108 ± 12,43	82 ± 16	*	
	K <sub>ITT</sub> (%glicose/min)	4,7 ± 1,0	6,4 ± 1,0	5,0 ± 0,5	5,8 ± 1,5	*	
	GTT (AUC)	1150 ± 176	1295 ± 262	1237 ± 287	972 ± 236		
15 semanas	Tecido adiposo inguinal (g)	0,24 ± 0,15	<b>1,38 ± 0,22*</b>	0,29 ± 0,06	<b>0,317 ± 0,06 #</b>	*	*
	Tecido adiposo retroperitoneal (g)	0,10 ± 0,05	<b>0,59 ± 0,09 *</b>	0,08 ± 0,03	<b>0,116 ± 0,03 #</b>	*	*
	Tecido adiposo epididimal (g)	0,471 ± 0,09	<b>1,726 ± 0,17 *</b>	0,341 ± 0,11	<b>0,474 ± 0,13 #</b>	*	*
	Tecido adiposo mesentérico (g)	0,164 ± 0,07	<b>0,447 ± 0,16 *</b>	0,135 ± 0,02	<b>0,164 ± 0,06 #</b>	*	*
	Tecido adiposo marrom (g)	0,066 ± 0,01	<b>0,133 ± 0,03 *</b>	0,060 ± 0,01	<b>0,056 ± 0,01 #</b>	*	*
	Tecido adiposo perirenal (g)	0,074 ± 0,02	<b>0,246 ± 0,03 *</b>	0,043 ± 0,002	<b>0,055 ± 0,01 #</b>	*	*
	Gastrocnêmio (g)	0,151 ± 0,01	0,154 ± 0,01	0,140 ± 0,01	0,157 ± 0,01		
	Sóleo (g)	0,011 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,006 ± 0,00		
	Glicemia de jejum (mg/dL)	165 ± 17	157 ± 12,27	174 ± 16,15	199 ± 24,58	*	
	K <sub>ITT</sub> (%glicose/min)	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,9	5,6 ± 0,6	<b>8,2 ± 1,0 #&amp;</b>	*	*
	GTT (AUC)	1603 ± 1,12	1838 ± 0,32	1789 ± 0,19	1460 ± 0,42		

24 semanas	Tecido adiposo Inguinal (g)	0,358 ± 0,13	<b>2,134 ± 0,36</b> *	0,308 ± 0,06	<b>0,514 ± 0,06</b> #		
	Tecido adiposo retroperitoneal (g)	0,154 ± 0,08	<b>0,655 ± 0,08</b> *	0,086 ± 0,02	<b>0,258 ± 0,05</b> #		
	Tecido adiposo epididimal (g)	0,601 ± 0,19	<b>2,033 ± 0,14</b> *	0,430 ± 0,02	<b>0,729 ± 0,14</b> #&		
	Tecido adiposo mesentérico (g)	0,056 ± 0,03	0,165 ± 0,08	0,045 ± 0,02	0,064 ± 0,03	*	
	Tecido adiposo marrom (g)	0,071 ± 0,01	<b>0,161 ± 0,05</b> *	0,073 ± 0,01	<b>0,084 ± 0,02</b> #		
	Tecido adiposo perirenal (g)	0,087 ± 0,03	<b>0,316 ± 0,08</b> *	0,046 ± 0,03	<b>0,086 ± 0,01</b> #		
	Gastrocnêmio (g)	0,159 ± 0,01	0,164 ± 0,01	0,144 ± 0,01	0,145 ± 0,01	*	
	Sóleo (g)	0,010 ± 0,00	0,017 ± 0,01	0,007 ± 0,00	0,028 ± 0,04		
	Glicemia de jejum (mg/dL)	150 ± 11	147 ± 13	150 ± 11	136 ± 11		
	K <sub>ITT</sub> (%glicose/min)	2,5 ± 1,3	2,0 ± 0,1	1,3 ± 0,9	<b>2,8 ± 1,9</b> &		*
	GTT (AUC)	1479 ± 197	1558 ± 266	1758 ± 735	1567 ± 203		

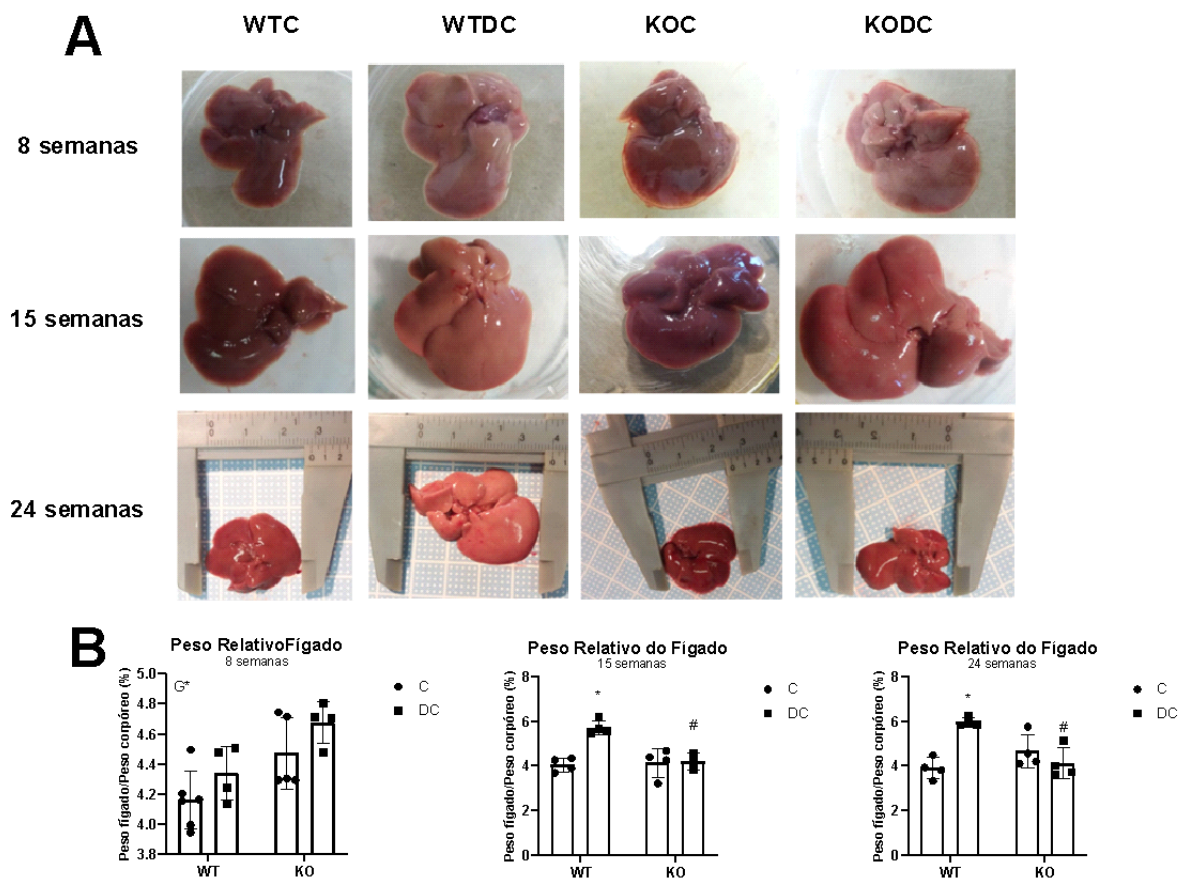
Legenda: Camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média ± DP . \*p<0,05 analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*\*& p<0,05; \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. (n ± 6 animais) GTT: teste de tolerância à glicose; AUC: área sob a curva; ITT: teste de tolerância à insulina.

## 5.2. A DC causa hepatomegalia de forma dependente do genótipo

Ao final de 15 e 24 semanas, o consumo da dieta deficiente em colina provocou uma hepatomegalia nos animais WTDC enquanto os animais KODC permaneceram com tamanho similar aos animais que receberam dieta controle (**Figura 7A**). Após 15 e 24 semanas observamos que o fígado dos animais WT alimentados com dieta deficiente em colina estava 38% e 47%, respectivamente, maior que os animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com a mesma dieta (**Figura 7B**).

O aumento do tamanho e consequentemente do peso do fígado dos animais WT em relação aos THOP<sup>-/-</sup>, em concordância com o subcapítulo anterior, indica um maior aporte de gordura para o fígado devido ao aumento dos tecidos adiposos.

**Figura 7.** Efeito macroscópico do genótipo no fígado de animais alimentados com DC.



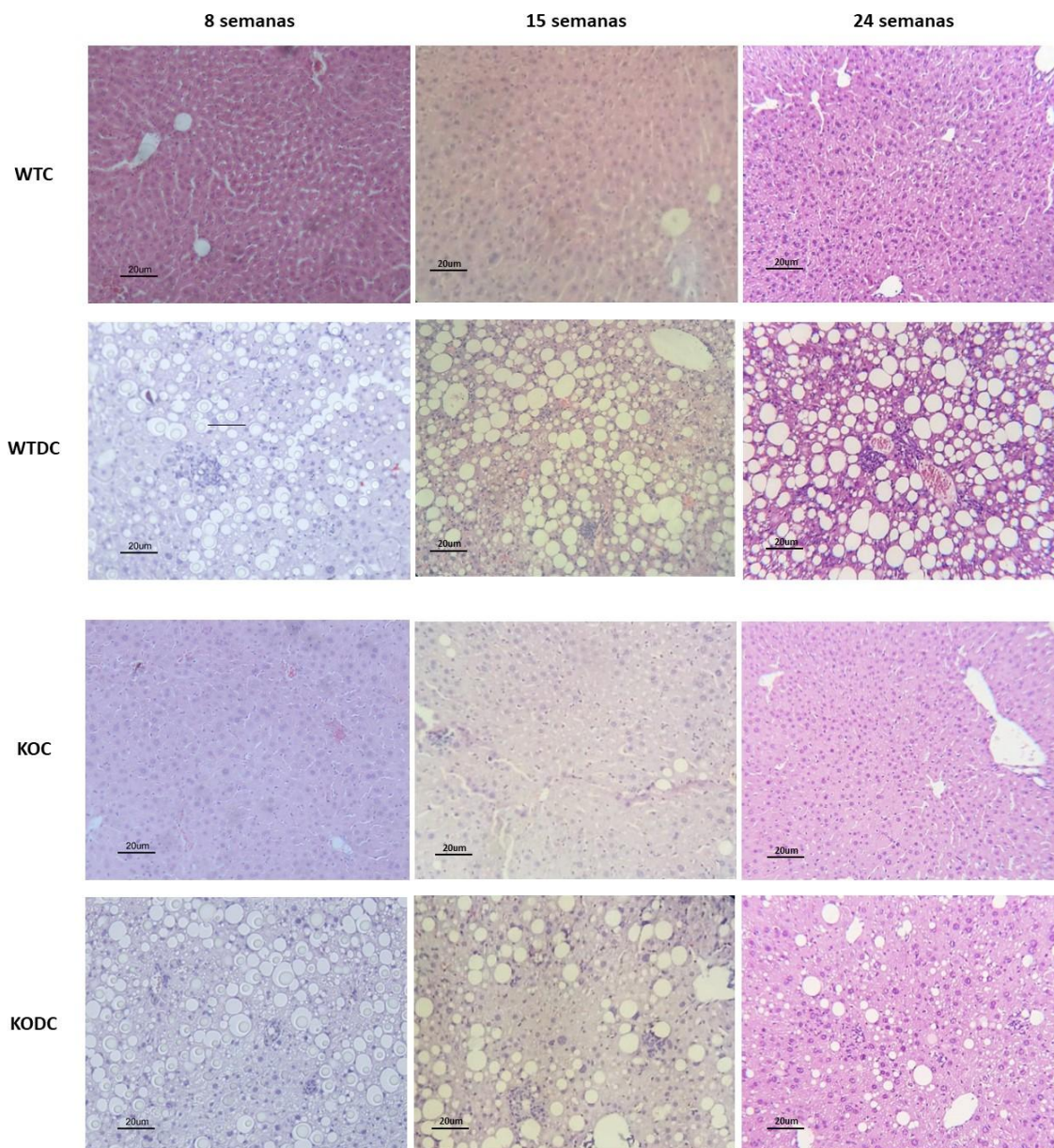
Legenda: (A) Fotografia do fígado após eutanásia; (B) Peso relativo do camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

### 5.3. Efeito da deleção da THOP<sup>-/-</sup> na indução da esteatohepatite por dieta deficiente em colina.

Sabendo que o aumento de peso hepático está relacionado à injúria provocada pela dieta hiperlipídica deficiente em colina, realizamos uma análise histopatológica da atividade da DHGNA, como proposto por Liang et al em 2014. Observamos que em um primeiro momento os animais desenvolvem a esteatohepatite de forma independente do genótipo. No entanto, após 15 e 24

semanas, os animais THOP<sup>-/-</sup> apresentaram uma forma mais branda do espectro DHGNA frente ao grupo WT alimentando com a DC (**Figura 8**).

**Figura 8.** Efeito do genótipo na histologia de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC e C.



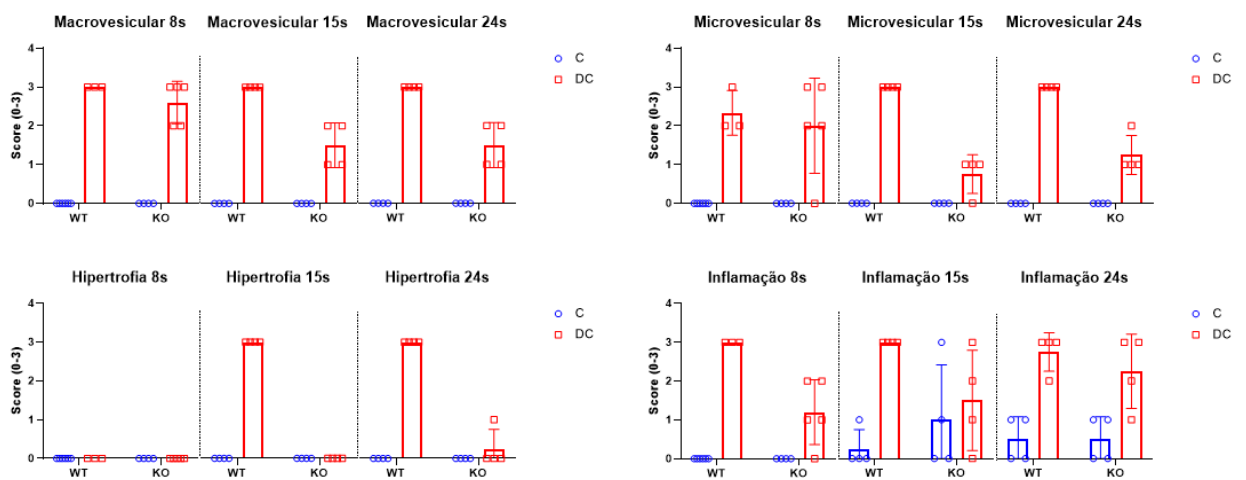
Legenda: Fotomicrografias representativas do fígado após coloração de H&E. Fígado de animais WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. ( $n \pm 6$  animais)

Ao observar a frequência dos fenômenos que provocam a DHGNA, observou-se que nas 8 primeiras semanas de dieta, os vacúolos lipídicos macro e

microvesicular foram as principais características da esteatose em ambos genótipos que receberam a DC. No entanto, ao fim de 15 e 24 semanas, essas características se mostraram mais frequentes nos animais WT que foram alimentados com a DC, assim como a hipertrofia do hepatócito e inflamação (**Figura 9, Tabela 5**).

A dieta deficiente em colina age reduzindo a secreção de triglicérides como VLDL do fígado e portanto causando acúmulo de gordura nos hepatócitos (Raubenheimer et al., 2006). O animal THOP<sup>-/-</sup>, ao longo do tempo, apresenta uma regressão da EHNA causada pela dieta deficiente em colina, assim indicando que o genótipo THOP<sup>-/-</sup> tem efeito hepatoprotetor na indução da EHNA.

**Figura 9.** Distribuição das características histológicas da DHGNA em animais WT e THOP<sup>-/-</sup>.



Legenda: Distribuição dos fenômenos que induzem a DHGNA. Fígado de animais WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. (n ± 6 animais)

**Tabela 5.** Faixa obtida do score de NAFLD de camundongos WT e THOP<sup>-/-</sup>.

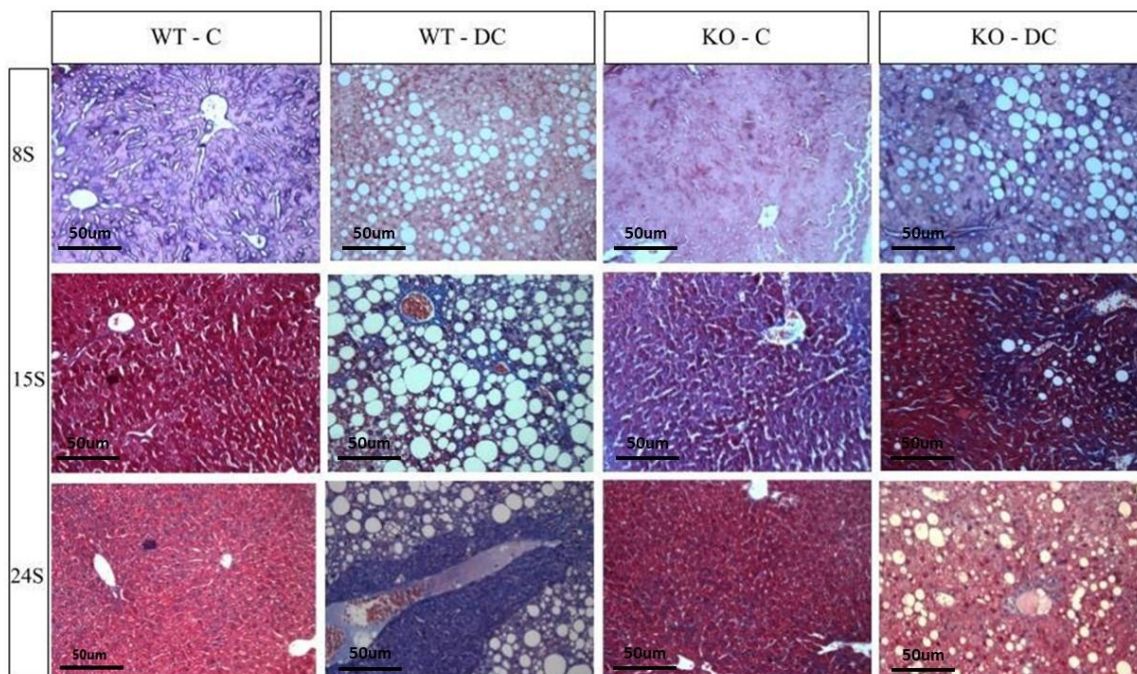
Protocolo	Grupo	Grau de Esteatose	Microvesicular	Macrovesicular	Hipertrofia	Inflamação
8 semanas	WT C	0	0	0	0	0
	WT DC	5  — 6	2  — 3	3	0	3
	KO C	0	0	0	0	0
	KO DC	2  — 6	0  — 3	2  — 3	0	1  — 2
15 semanas	WT C	0	0	0	0	0
	WT DC	9	3	3	3	3
	KO C	0	0	0	0	0  — 3
	KO DC	1  — 3	0  — 1	1  — 2	0	0  — 3
24 semanas	WT C	0	0	0	0	0  — 1
	WT DC	9	3	3	3	2  — 3
	KO C	0	0	0	0	0  — 1
	KO DC	2  — 5	1  — 2	1  — 2	0  — 1	1  — 3

Legenda: Score NAFLD do fígado de animais WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. O grau de esteatose (0-9) é a soma dos scores microvesicular, macrovesicular e hipertrofia. (n ± 6 animais).

#### 5.4. Efeito da deleção da THOP1 na progressão da esteatohepatite em animais alimentados com DC

Sabendo que a fibrose é o estágio seguinte da esteatohepatite no espectro da DHGNA, realizamos a análise histopatológica de acordo com o Critério de Brunt em lâminas coradas com tricrômico de Masson. Observamos que a partir de 15 semanas o grupo WTDC apresenta grau 1 de fibrose, que consiste em septos perisinusoidais e pericelulares (**Figura 10, Tabela 6**). E ao final de 24 semanas, esse mesmo grupo, apresentou grau 2 de fibrose, que consiste em fibrose periportal junto às características do grau 1 (**Figura 10, Tabela 6**). Nos animais THOP<sup>-/-</sup> o início da fibrose foi observado com 24 semanas apenas regiões de fibrose pericelular, portanto a deleção de THOP retarda o aparecimento da fibrose (**Figura 10, Tabela 6**).

**Figura 10.** Efeito da dieta deficiente em colina na indução de fibrose em camundongos WT e THOP<sup>-/-</sup>.



Legenda: Fotomicrografias representativas do fígado após coloração de tricrômico de Masson. Fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> (KO) alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. (n ± 6 animais)

**Tabela 6.** Faixa obtida do escore de fibrose de camundongos WT e THOP<sup>-/-</sup>.

Grunt Criteria		
Tempo	Grupo	Fibrose
8 semanas	WT C	0
	WT DC	0-2
	KO C	0
	KO DC	0
15 semanas	WT C	0
	WT DC	1-2
	KO C	0
	KO DC	0
24 semanas	WT C	0
	WT DC	2
	KO C	0
	KO DC	1

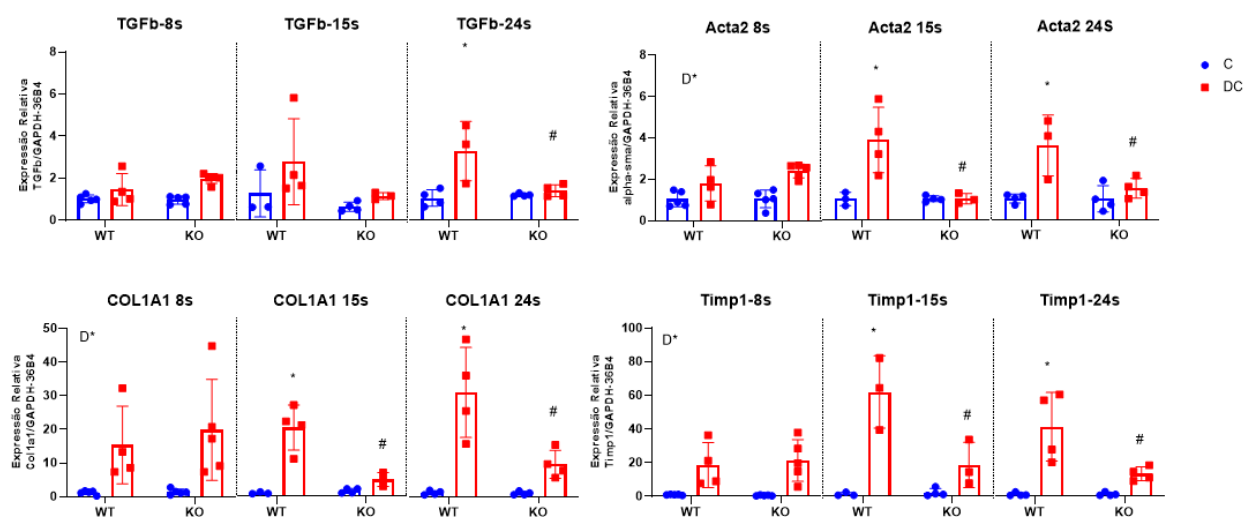
Legenda: Escore do critério de Brunt que vai de 0 a 4 (sendo 0 ausente. 1 fibrose perisinusoidal/pericelular na zona 3; 2 fibrose perisinusoidal/pericelular na zona 3 com fibrose periportal; 3 fibrose perisinusoidal/pericelular

na zona 3 com fibrose periportal e formações de pontes fibróticas ;e 4 cirrose) do fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> (KO) alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas (n ± 6 animais).

A seguir, avaliamos a expressão de genes envolvidos na ativação de células estreladas hepáticas como *Tgfb* (TGFβ), *Acta2* (α-SMA), *Col1a1* e *Timp1*. Conforme observado na análise histopatológica, observamos que após 8 semanas a expressão de *Tgfb*, *Acta2*, *Col1a1* e *Timp1* aumenta com a dieta deficiente em colina de forma independente do genótipo. No entanto, ao final de 15 e 24 semanas esses mesmos genes continuam com expressão aumentada apenas nos animais WTDC em relação ao seu controle e já no grupo KODC a expressão é reduzida em relação ao WTDC (Figura 11).

Este bloco de resultados mostra que a deleção da THOP1 atenua a ativação das células estreladas hepáticas e portanto a deposição de colágeno, assim diminuindo o grau de fibrose em relação ao animal *wild type*.

**Figura 11.** Expressão de genes relacionados à fibrose no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC.



Legenda: Expressão de RNAm de genes relacionados à fibrose de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. Os genes *Gapdh* e *Rpl0* foram utilizados como normalizadores. Resultados estão expressos relativos ao WTC de cada tempo. \*p<0,05 analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*\*#& p<0,05: \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. (n ± 6 animais).

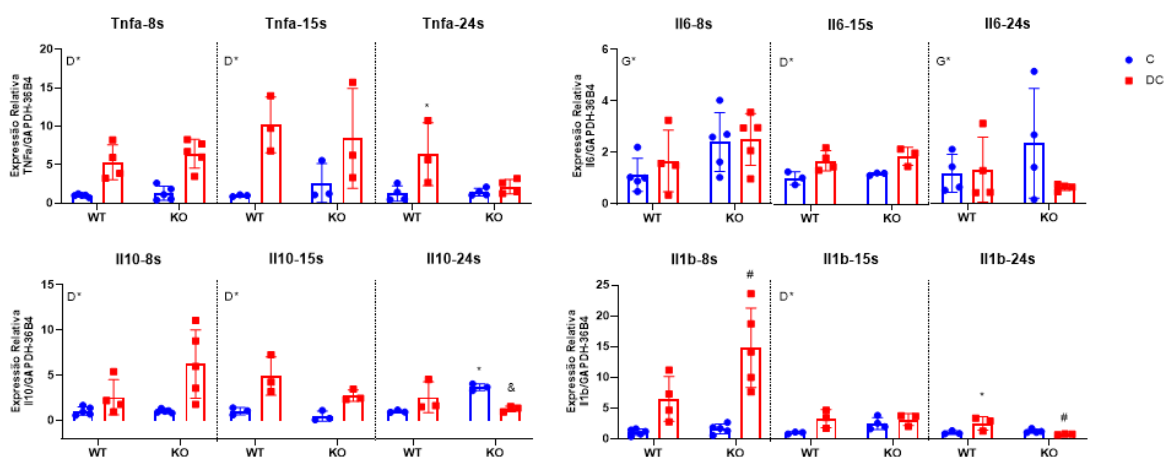


### 5.5. Efeito do genótipo na inflamação hepática de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC

Com o intuito de investigar como a lipotoxicidade provocou as vias inflamatórias no desenvolvimento da esteatohepatite, avaliamos a expressão de RNAm e o conteúdo hepático das interleucinas *Tnfa*, *Il-6*, *Il-10*, *Il-1b*, *Il-17* e expressão de genes relacionados à inflamação (*Cd86*, *Nfkβ* e *Traf-6*).

Após 8 e 15 semanas de protocolo, a expressão gênica de *Tnfa* foi maior nos grupos que foram alimentados com a dieta deficiente em colina e ao final de 24 semanas sua expressão estava elevada no grupo WTDC frente ao grupo WTC. Ao final de 8 e 24 semanas, *Il-6* teve sua expressão gênica modulada pelo genótipo, se mostrando mais elevada nos animais nocaute; no entanto, ao fim de 15 semanas, a expressão de *Il6* foi modulada pela dieta, se mostrando maior nos animais alimentados com dieta deficiente em colina. Já *Il10* se apresentou mais expressa nos animais que receberam a dieta deficiente em colina nos tempos de 8 e 15 semanas; e ao final de 24 semanas ela se apresentou mais expressa no grupo KOC frente ao grupo WTC. Em um primeiro momento, *Il1β* se mostrou mais expressa no grupo KODC frente ao grupo WTDC, no entanto ao final de 15 semanas sua expressão foi maior nos animais alimentados com DC de forma independente do genótipo; e ao final de 24 semanas a expressão de *Il1β* foi menor no grupo KODC comparado ao grupo WTDC (**Figura 12**).

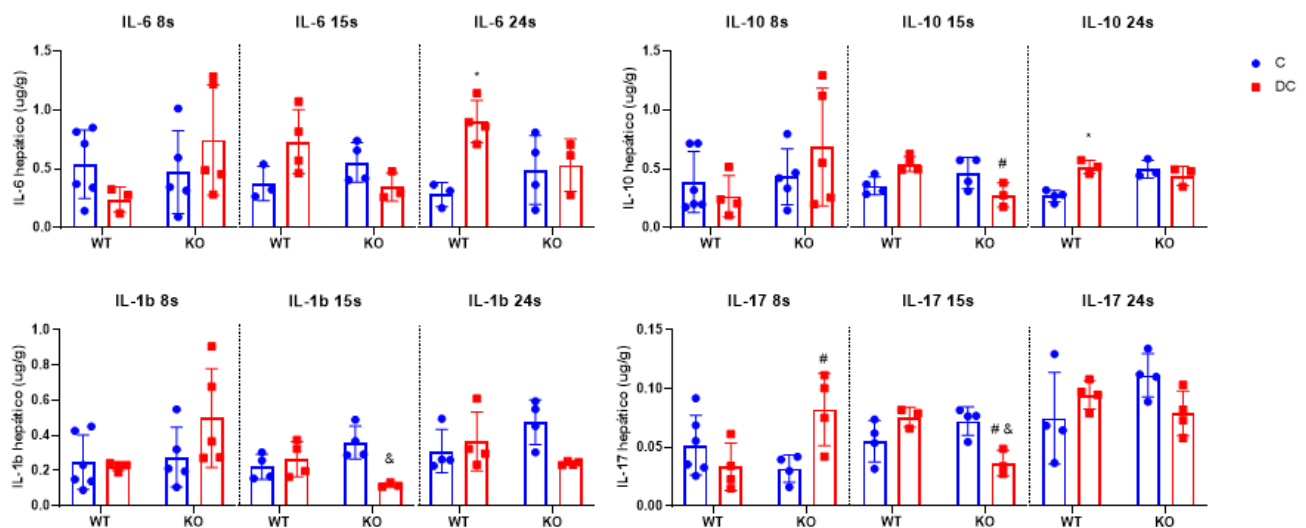
**Figura 12.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de gênica de citocinas envolvidas na inflamação hepática de camundongos alimentados com DC.



Legenda: Expressão relativa de RNAm de citocinas relacionadas à inflamação hepática de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. A expressão de *Gapd* e *Rpl* foi utilizada para normalizar os dados. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais).

Quando olhamos para o conteúdo hepático de citocinas, vemos que a concentração de IL-6, ao final de 24 semanas no fígado de animais WTDC aumenta em relação ao WT controle (**Figura 13**). Ao final de 15 semanas, a concentração hepática de IL-10 é menor nos animais nocautes alimentados com a dieta deficiente em colina comparado ao grupo WT alimentado com a mesma dieta, e após 24 semanas a concentração de IL-10 é maior no grupo WTDC frente ao seu controle (**Figura 13**). Ao final de 15 semanas a concentração hepática de IL-1 $\beta$  é menor no grupo KODC frente ao seu controle (**Figura 13**). E por fim, a concentração de IL-17 aumenta no KODC em relação ao grupo WTDC, no entanto, após 15 semanas essa relação é invertida (**Figura 13**).

**Figura 13.** Efeito da deleção da THOP1 sobre o conteúdo de citocinas no fígado de camundongos alimentados com dieta C e DC.

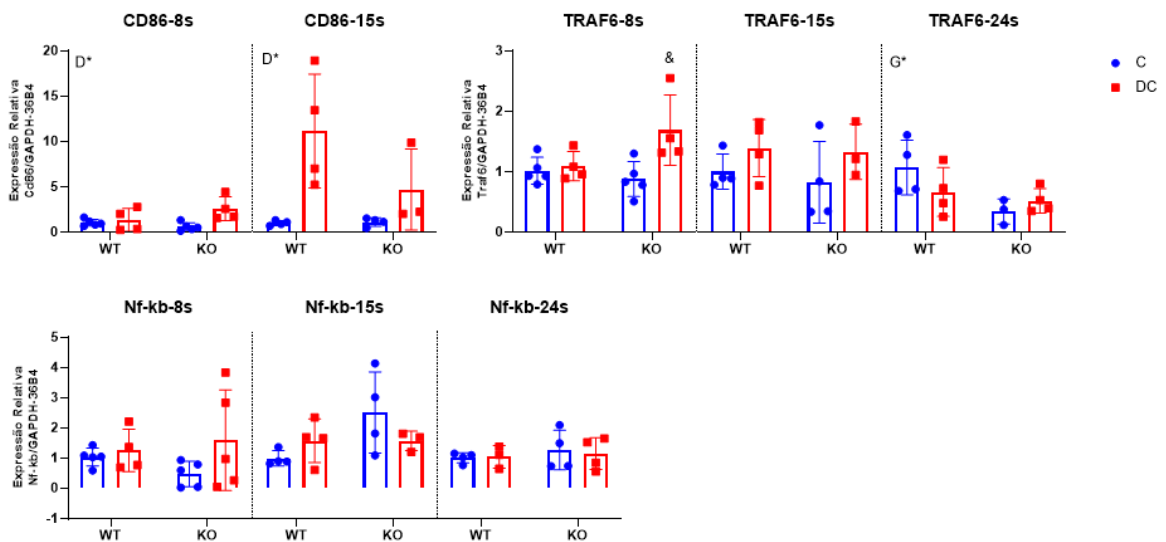


Legenda: Conteúdo de citocinas relacionadas à inflamação hepática de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais).

A menor expressão de *Tnfa* e *Il-1b* após 15 e 24 semanas nos animais KODC e a menor quantidade de IL17, Il-1b, é condizente com a menor fibrose no fígado desses animais. Essas citocinas pró-inflamatórias juntamente com *Tgfb* facilitam a produção de matriz extracelular pelo fibroblasto em resposta a *Tgfb* (Henderson et al., 2020; Van Herck et al., 2019 ).

Observamos que, ao final de 8 e 15 semanas, a expressão de *Cd86* foi maior nos grupos que receberam a dieta deficiente em colina de forma independente do genótipo. Ao de 8 semanas a expressão de *Traf6* foi mais alta no grupo KODC frente ao grupo KOC; e ao fim de 24 semanas sua expressão foi modulada pelo genótipo, se mostrando menor nos animais nocaute. Apesar dessas interações, o *Nfkb* não apresentou diferença de expressão entre os grupos em nenhum dos tempos (**Figura 14**).

**Figura 14.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos na inflamação hepática de camundongos alimentados com DC.



Legenda: Expressão relativa de RNAm genes relacionados à inflamação hepática de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. A expressão de *Gapd* e *Rpl* foi utilizada para normalizar os dados. Resultados apresentados como média. \*p<0,05 analisado por ANOVA de duas vias para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#& p<0,05: \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. (n ± 6 animais)

## 5.6. Expressão de RNAm de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC

Para melhor elucidar o acúmulo ectópico de gordura no parênquima hepático avaliamos a expressão de genes relacionados às vias metabólicas dos lipídeos: captação de ácidos graxos (*Cd36*), síntese de ácidos graxos (*Pparg*, *Pparb*, *Acc* e *Fasn*), lipólise (*Atgl* ou *Pnpla2*), oxidação de ácidos graxos (*Pgc1 $\alpha$* , *Ppara*, *Sirt-1*, *Ucp2*, *Cpt1a*, *Fgf-21*), formação de HDL (*Apoa*) e VLDL (*Apob*). Também avaliamos *RORg*, um fator de transcrição que pode agir promovendo a expressão de genes relacionados à lipogênese, como *Cd36*, *Pparg* e *Fasn*. Ainda avaliamos a expressão de *Ncor1*, um co-repressor de *RORg*.

Ao final de 15 e 24 semanas, a expressão de *Cd36* e *Pparg* se mostrou elevada nos animais WT alimentados com DC frente aos animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com a mesma dieta, indicando um menor aporte de ácidos graxos e menor lipogênese hepática nos animais nocaute (**Figura 15**).

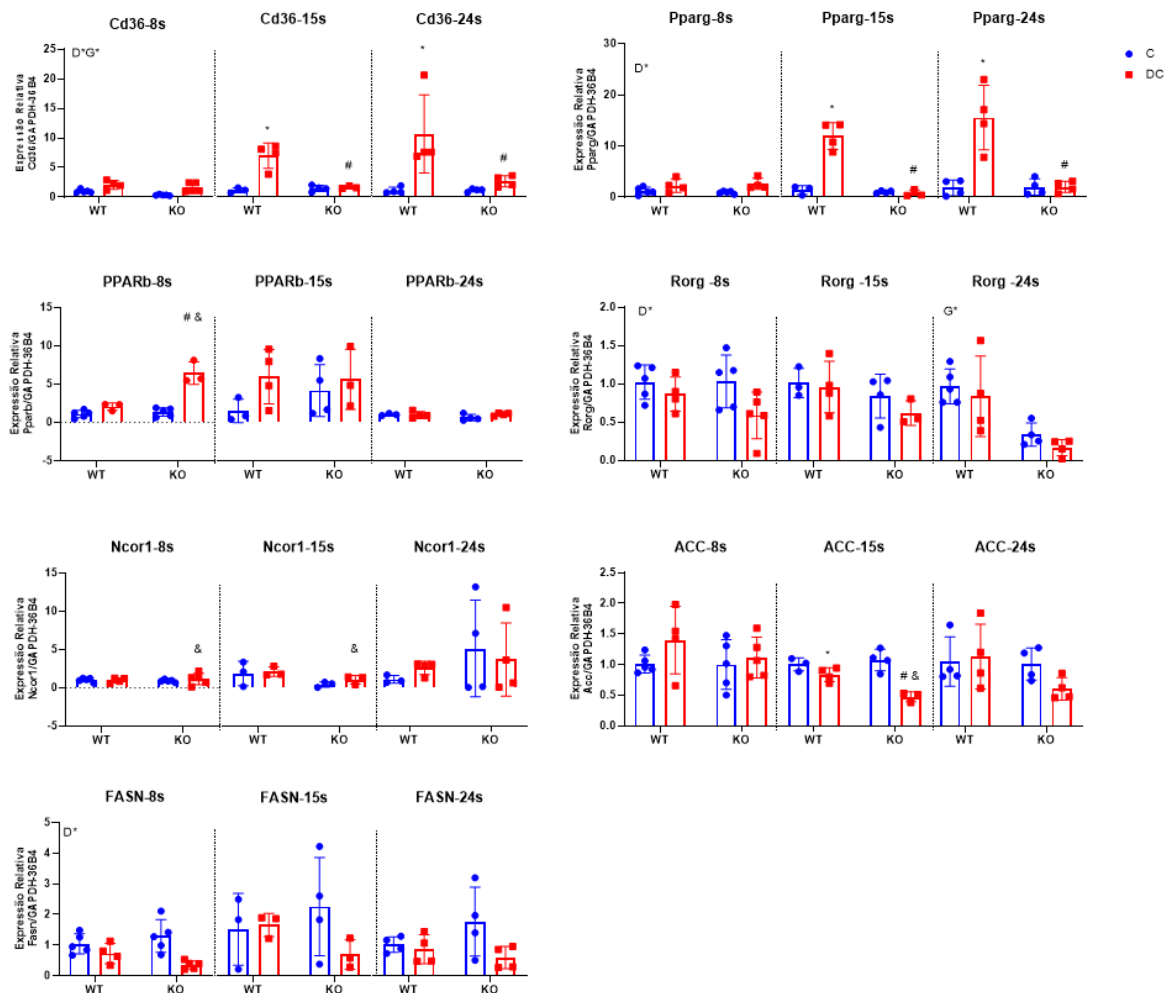
Após 8 semanas, a expressão de *Pparb* estava elevada no grupo KODC frente ao grupo WTDC, no entanto essa relação se perde nos outros tempos de protocolo. Após 8 semanas, *RORg* se mostrou menor nos animais alimentados com a DC, no entanto, ao final de 24 semanas, sua expressão foi menor nos animais THOP<sup>-/-</sup> de forma independente da dieta. A expressão de *Ncor1* foi maior nos grupos KODC frente ao grupo KOC ao final de 8 e 15 semanas, no entanto, ao final de 24 semanas não houve diferença de expressão. A expressão de *Acc* se apresentou maior no grupo WTDC comparada ao grupo KODC ao final de 15 semanas, no entanto o mesmo não se repetiu ao final de 24 semanas. Nas 8 primeiras semanas, a expressão de *Fasn* foi menor nos animais alimentados com a DC, contudo, ao final de 15 e 24 semanas, não houve alteração de sua expressão (**Figura 15**).

Esses dados indicam um menor aporte de ácidos graxos e menor lipogênese hepática nos animais nocaute, e, aparentemente, o aumento dos depósitos de gordura nos hepatócitos parece estar relacionado com a via da lipogênese de novo também.

*Atgl*, uma lipase responsável pela primeira reação da lipólise, não apresentou diferença de expressão entre os grupos (**Figura 16**). Após 8 semanas de protocolo a expressão de *Pgc1a* foi maior no grupo KODC frente ao grupo KOC, no entanto, ao final de 24 semanas, sua expressão gênica foi maior nos animais THOP<sup>-/-</sup> de forma

independente da dieta. A expressão de *Ppara* se apresentou menor nos animais THOP<sup>-/-</sup> ao final de 15 e 24 semanas. A expressão de *Sirt-1* foi similar entre os grupos em todos os tempos. Após 8 e 15 semanas, *Ucp2* teve sua expressão aumentada nos animais que foram alimentados com a DC; contudo, ao final de 24 semanas a expressão da *Ucp2* estava menor no grupo KODC frente ao grupo WTDC. Após 8 semanas, *Cpt1a* teve sua expressão aumentada pela DC em ambos os genótipos. A expressão gênica de *Fgf-21* foi maior nos animais alimentados com a DC em todos os tempos (**Figura 17**).

**Figura 15.** Efeito da deleção da THOP1 no metabolismo lipídico de camundongos alimentados com DC.



Legenda: Expressão de RNAm relacionados à lipogênese de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. Os genes *Gapd* e *Rpl* foram utilizados como normalizadores. Resultados são relativos ao controle WT de cada tempo. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste

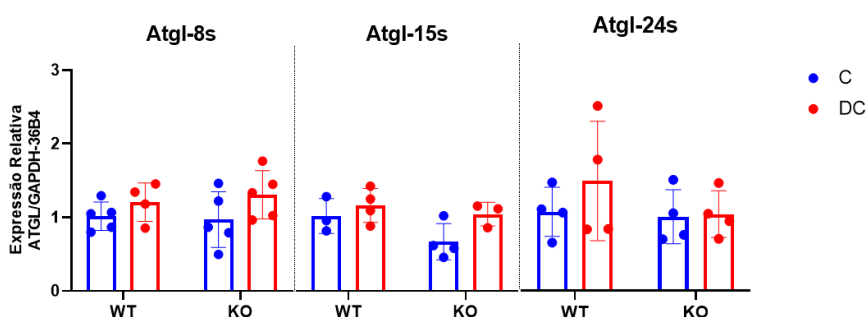
de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. (n  $\pm$  6 animais)

Em 2020 Gewehr et al. observaram que alguns dos peptídeos (*May3*, *May5* e *May6*) alterados no tecido adiposo inguinal em animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com dieta hiperlipídica podem ter papel antiobesidade e eram derivados da apolipoproteína A, portanto decidimos observar se sua expressão também estava alterada nos nossos protocolos. Observamos que a expressão de ApoA se mostrou menor nos animais THOP<sup>-/-</sup> frente aos animais WT ao fim de 8 e 24 semanas (**figura 18**).

A apolipoproteína B (*ApoB*), um precursor de VLDL, se mostrou maior nos animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com a DC comparada aos animais WT alimentados com a mesma dieta ao fim de 15 semanas. Indicando maior produção de ApoB no fígado destes animais, mas são necessários mais experimentos para indicar se há maior formação e secreção de VLDL (**figura 18**).

Diante dos resultados obtidos sugere-se que esteja ocorrendo nos animais THOP<sup>-/-</sup> um menor aporte de ácidos graxos para o fígado e uma melhora da oxidação de ácidos graxos mitocondrial, visto que *Pgc1a*, um marcador da biogênese mitocondrial aumenta e *Ucp2* diminui, possivelmente restaurando os níveis celulares de ATP (Simões et al, 2018).

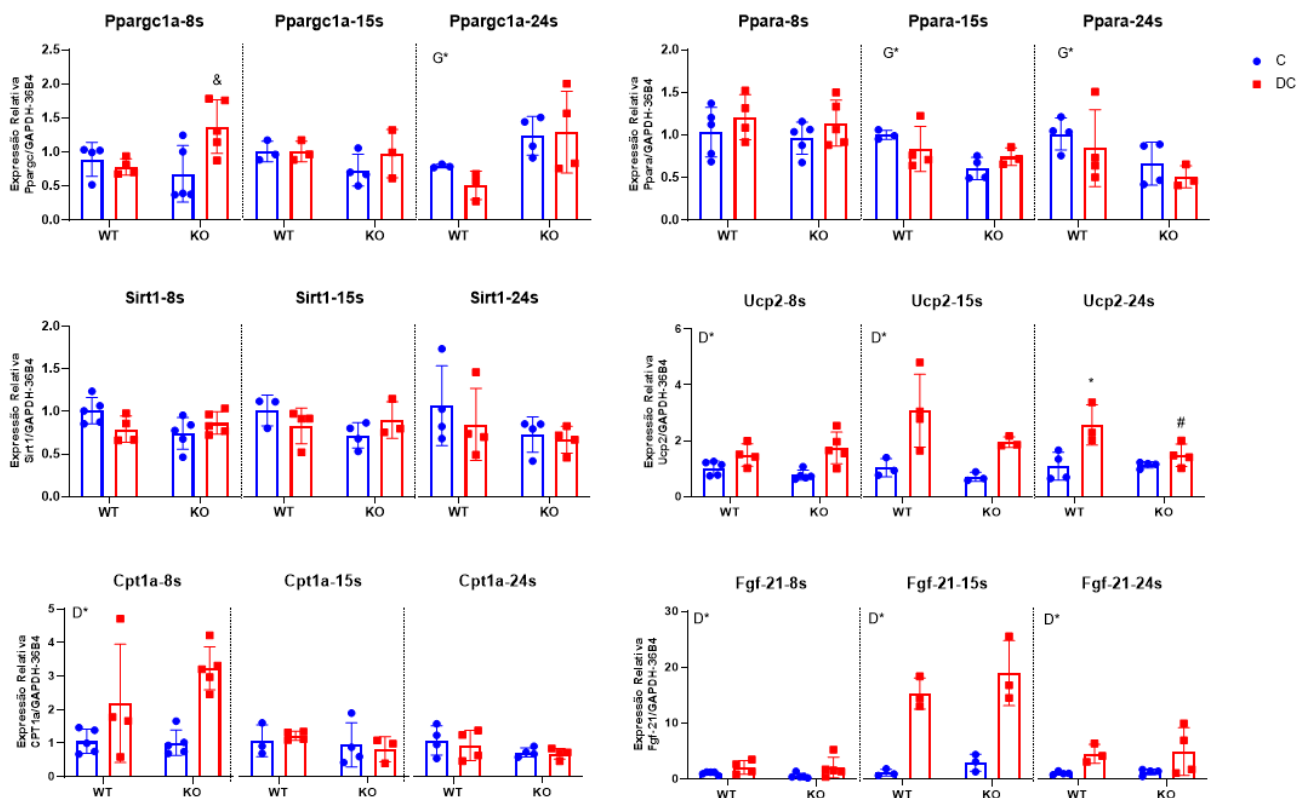
**Figura 16.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de *Atgl* hepática de camundongos alimentados com DC.



Legenda: Expressão relativa de RNAm relacionados à lipólise de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. Os genes *Gapd* e *Rpl* foram utilizados como normalizadores. Resultados relativos ao WT controle de cada tempo.. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste

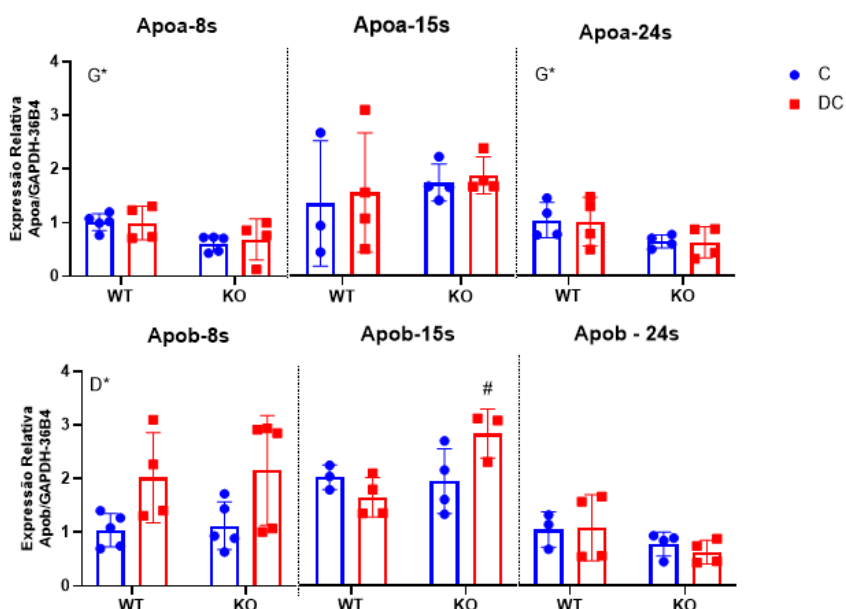
de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

**Figura 17.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos na beta-oxidação hepática de camundongos alimentados com DC.



Legenda: Expressão relativa de RNAm relacionados à beta oxidação de camundongos WT e THOP1<sup>-/-</sup> (KO) alimentados com dieta controle (C) ou deficiente em colina (DC) durante 8, 15 ou 24 semanas. Os genes *Gapd* e *Rpl* foram utilizados como normalizadores. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

**Figura 18.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão de genes envolvidos no fluxo de HDL e VLDL hepático de camundongos alimentados com DC.



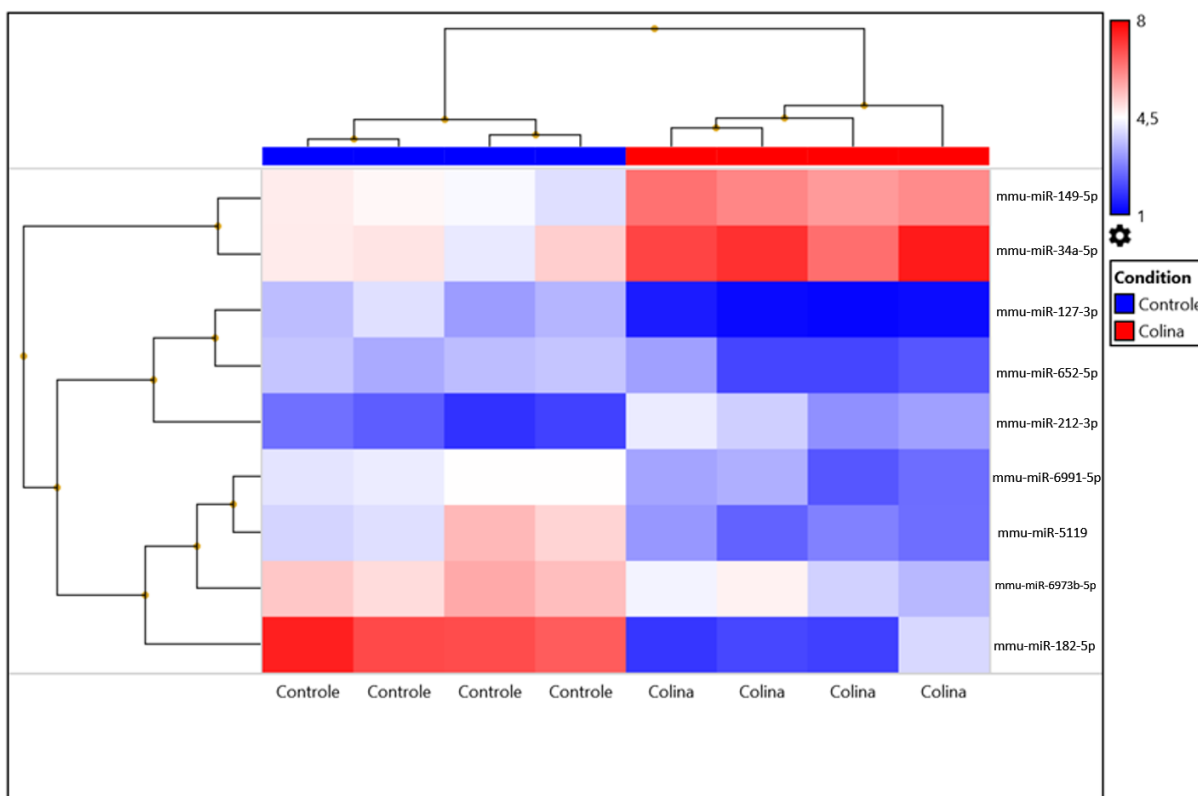
Legenda: Expressão relativa de RNAm relacionado ao fluxo hepático de HDL e VLDL de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. A expressão de *Gapd* e *Rpl* foi utilizada para normalizar os dados. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. (n  $\pm$  6 animais)

### 5.7. Efeito da deleção da THOP1 na expressão hepática de microRNAs em camundongos alimentados com DC

Em estudo anterior do grupo, realizamos uma análise de microarray de microRNAs no fígado de animais selvagens alimentados com dieta colina ou controle por 8 semanas (projeto FAPESP 2015/24789-8). Selecionamos os microRNAs diferencialmente expressos (**Figura 19**) no fígado de animais com EHNA em comparação a seu controle, conservados em humanos (*miR-149*, *miR-34*, *miR-212*, *miR-127* e *miR-182*), para avaliarmos em nossas amostras e entender se o efeito protetor temporal da deleção de THOP1 está associado à expressão desses microRNAs.



**Figura 19.** Heatmap dos microRNAs diferencialmente expressos no fígado de animais selvagens alimentados com dieta deficiente em colina ou controle por 8 semanas.

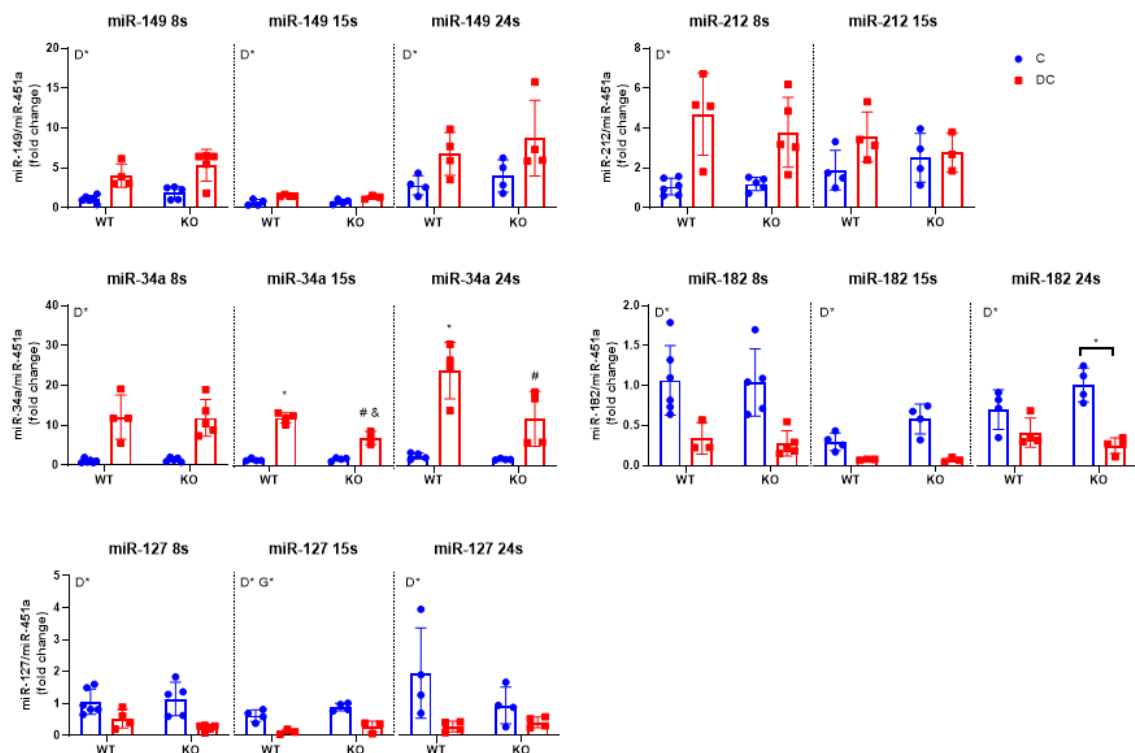


Conforme esperado, após 8 semanas, os microRNAs *miR-149*, *miR-34* e *miR-212* tiveram expressão aumentada e os microRNAs *miR-182* e *miR-127* expressão diminuída no fígado de animais WT alimentados com dieta deficiente em colina, validando os dados de expressão global (**Figura 20**).

Em relação a expressão dos microRNAs no fígado de animais THOP1 induzidos a EHNA observamos que o *miR-149* teve sua expressão elevada pela dieta deficiente em colina em todos os tempos. O *miR-212* teve sua expressão aumentada no fígado dos animais que receberam a dieta deficiente em colina após 8 semanas, no entanto após 15 semanas sua expressão retornou a valores semelhantes ao controle, independente do genótipo. De maneira muito interessante, a partir de 15 semanas, a expressão do *miR-34a* reduz nos animais KODC em relação aos animais WTDC, revelando que a melhora da progressão da EHNA em relação aos animais WT está associado a menor expressão do miR-34 ao longo do tempo. Os microRNAs *miR-182* e *miR-127* tiveram sua expressão diminuída nos

animais alimentados com a dieta deficiente em colina em todos os tempos de forma independente do genótipo. (Figura 20)

**Figura 20.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de microRNAs de camundongos alimentados com DC.



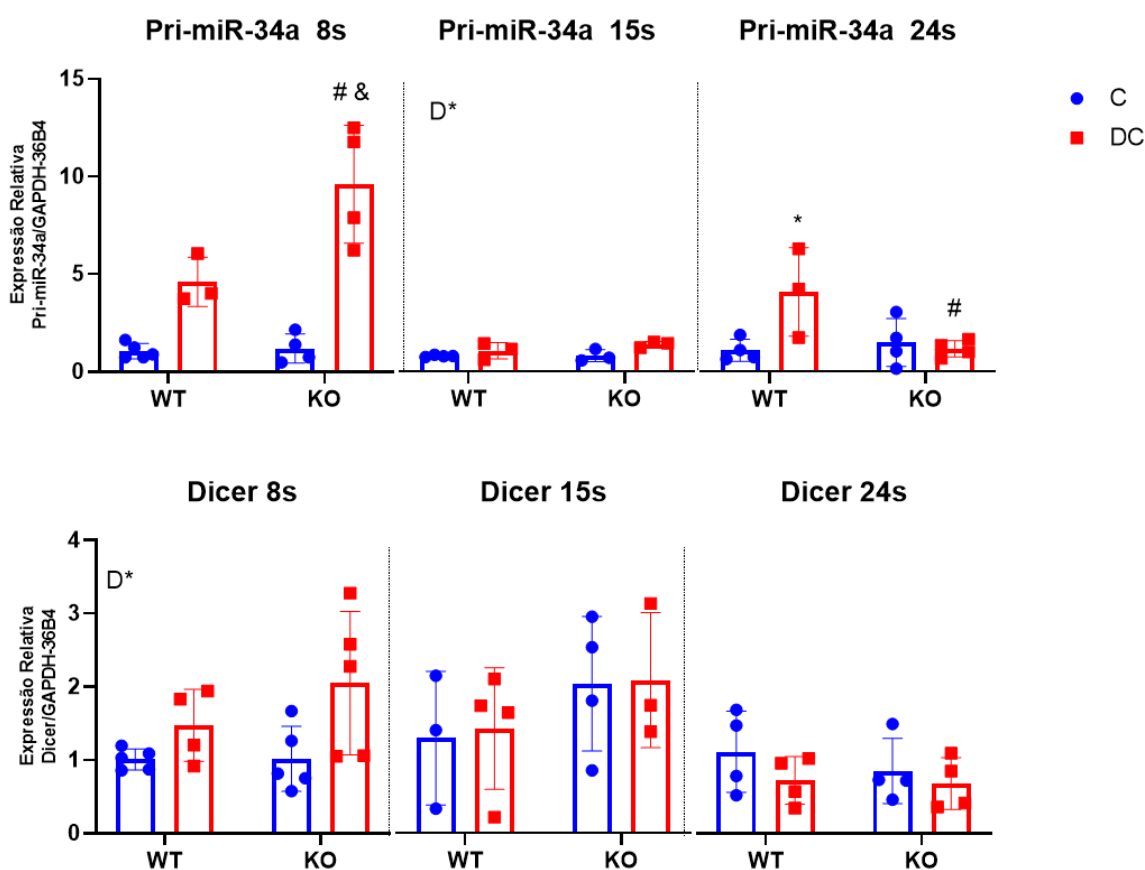
Legenda: Expressão relativa de microRNA no fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. A expressão do miR-451a foi utilizada para normalizar os dados. Resultados relativos ao WT controle 8S. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTC; # vs WTDC; & vs KOC. ( $n \pm 6$  animais)

Visto que a partir de 15 semanas a expressão do *miR-34a* reduz nos animais KODC em relação aos animais WTDC, sugerindo que a melhora da progressão da EHNA em relação aos animais WT está associado a menor expressão do *miR-34* ao longo do tempo. A seguir, avaliamos a expressão do *pri-miR-34* para entender se a regulação do miR é transcricional.

Observamos que com 8 semanas a expressão do *pri-miR-34a* é maior no grupo KODC comparado ao seu controle e ao grupo WTDC. No entanto, ao final de 24 semanas, a expressão do *pri-miR-34a* é menor no grupo KODC comparado ao grupo WTDC. Também avaliamos a expressão da *Dicer*. Em um primeiro momento a expressão da *dicer* aumenta com a dieta, no entanto, ao fim de 15 e 24 semanas não há diferença de expressão entre os grupos (**Figura 21**).

Esses dados mostram que há uma regulação transcricional do *pri-miR-34a* e mais importante, na falta da THOP1, possivelmente ocorra acúmulo de peptídeos processados por ela e que atuam regulando a expressão do *microRNA-34a*.

**Figura 21.** Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de *pri-miR-34a* e *dicer*.



Legenda: Expressão relativa de *pri-mir34* e *dicer* hepática de camundongos WT e KO alimentados com dieta controle ou deficiente em colina durante 8, 15 ou 24 semanas. Os genes *Gapdh* e *Rpl* foram utilizados como normalizadores. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de duas para efeito de genótipo (G), dieta (D) ou interação GxD. Quando houve interação foi realizado o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por \*#&  $p < 0,05$ : \*vs WTDC; # vs WTDC; & vs KOC. (n ± 6 animais)

### 5.8. Efeito da deleção da THOP1 sobre a expressão hepática de peptídeos intracelulares de camundongos alimentados com DC.

Com o intuito de descobrir quais peptídeos intracelulares possivelmente estavam alterados no fígado dos animais nocaute THOP1 em relação aos animais *wild type*, realizamos um peptidoma. Para a análise selecionamos apenas os peptídeos que foram detectados em todos os tempos de tratamento e pelo menos em 3 amostras (**Tabela 7**). A seguir, analisamos para cada tempo a razão dos peptídeos nos grupos WTDC e KODC em relação ao grupo WTC (**Figura 22**) e para ficar mais evidente o efeito da dieta no KO, analisamos a razão KODC/WTDC (**Figura 23**). Na **figura 22**, observamos que no WT o peptídeo tem 3 vezes mais quantidade no DC em relação ao C e não varia ao longo do tempo. Já nos animais KO a relação aumenta cerca de 13 vezes após 24 semanas de alimentação com DC (WT:  $3,6 \pm 2,7$  vs KO:  $12,7 \pm 5,7$ ;  $p < 0,05$ ). Ao analisar os peptídeos pela razão KODC/WTDC durante o tempo, observamos que o peptídeo VDPVNFK tem sua expressão aumentada no grupo de 24 semanas em relação aos grupos de 8 e 15 semanas (**Figuras 23 e 24**), indicando assim um acúmulo desse peptídeo ao longo do tempo.

**Tabela 7.** Peptídeos intracelulares e proteínas precursoras semiquantitativamente identificados no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC.

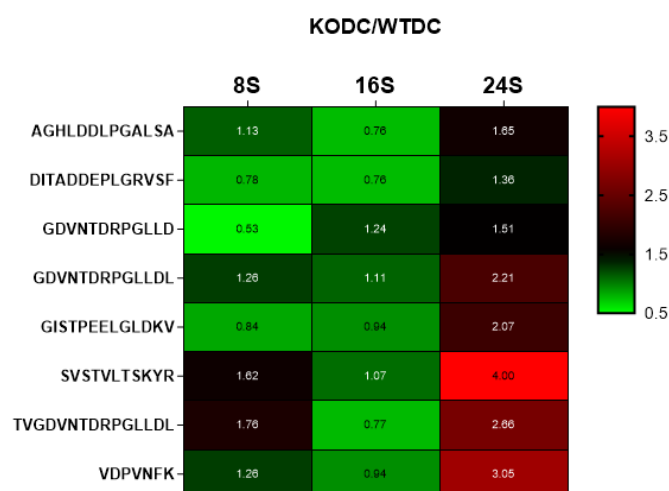
Proteína Precursora	Sequência do Peptídeo
Subunidade alfa da hemoglobina	AGHLDDLPGALSA
peptidil prolil cis / trans isomerase	DITADDEPLGRVSF
Proteína de ligação de Acil-CoA	GDVNTDRPGLLD
Proteína de ligação de Acil-CoA	GDVNTDRPGLLDL
subunidade 5a do citocromo c oxidase	GISTPEELGLDKV
Subunidade alfa da hemoglobina	SVSTVLTSKYR
Proteína de ligação de Acil-CoA	TVGDVNTDRPGLLDL
Subunidade alfa da hemoglobina	VDPVNFK

**Figura 22.** Heatmap da razão de variação dos peptídeos intracelulares no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC com relação ao WT alimentado com dieta controle.



Legenda: Heatmap da razão de variação de peptídeos intracelulares no fígado de animais WTDC e KODC com relação aos WT alimentados com dieta controle por 8, 15 e 24 semanas. Foi considerado significativamente diferente os peptídeos que aumentaram mais de 100% (duas vezes) ou diminuíram mais de 50% (0,5 vezes).

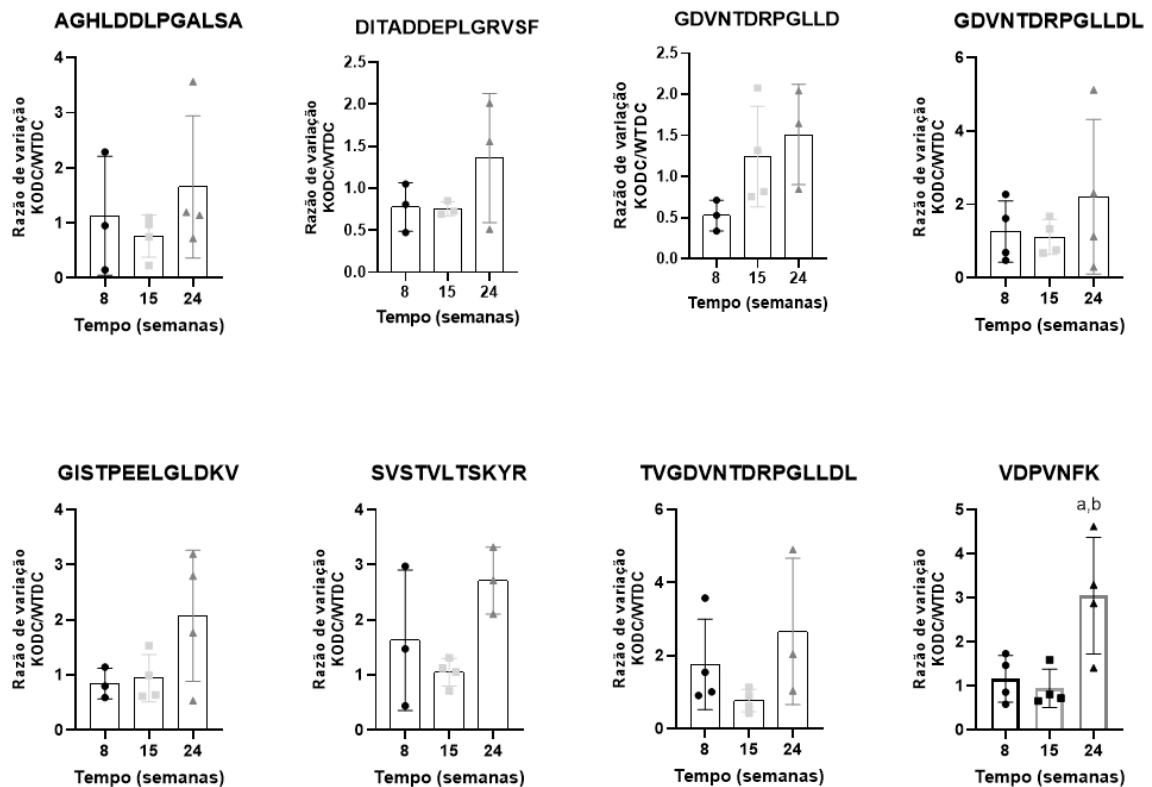
**Figura 23.** Heatmap da razão de variação de peptídeos intracelulares no fígado de animais THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC com relação aos WT.



Legenda: Heatmap da razão de variação de peptídeos intracelulares no fígado de animais THOP<sup>-/-</sup> com relação aos WT alimentados com DC por 8, 15 e 24 semanas. Foi considerado

significativamente diferente os peptídeos que aumentaram mais de 100% (duas vezes) ou diminuiram mais de 50% (0,5 vezes).

**Figura 24.** Variação da razão de peptídeos intracelulares semiquantitativamente identificados no fígado de animais WT e THOP<sup>-/-</sup> alimentados com DC.



Legenda: Razão de variação hepática de peptídeos intracelulares no knockout THOP pelo WT alimentado com dieta deficiente em colina (KODC/WTDC)) por 8, 15 ou 24 semanas. Resultados apresentados como média. \* $p < 0,05$  analisado por ANOVA de uma via para efeito de tempo. Quando foi  $p < 0,05$  realizou-se o pós-teste de Tukey e as diferenças significativas estão representadas por a,b  $p < 0,05$ : a vs 8s; b vs 15s.

## 6. Discussão

A DHGNA é uma enfermidade que acomete 25% da população mundial (Younossi et al.,2019). Estudos recentes demonstram o potencial da ablação da THOP1 na indução de esteatose associada à obesidade (Gewehr et al, 2020). No entanto, os mecanismos pelo qual a deleção de THOP1 confere proteção da esteatose e possivelmente da sua progressão à esteatohepatite ainda não foi elucidado e nem qual o papel dos microRNAs neste processo. Neste trabalho demonstramos que a ingestão da dieta deficiente em colina é capaz de induzir esteatohepatite em ambos os genótipos estudados a curto prazo e regular a expressão dos microRNAs miR-149, miR-212, miR-34a, miR-127 e miR-182. No entanto, a longo prazo, a deleção da THOP1 melhora o quadro esteatohepatite protegendo o animal de fibrose, por um mecanismo que parece envolver o peptídeo VDPVNFK, o miR-34a, a ativação de células estreladas hepáticas e melhora da função mitocondrial.

Um dos eventos cruciais envolvidos na progressão da DHGNA é a lipotoxicidade decorrente de um influxo imoderado de ácidos graxos livres para os hepatócitos. A lipotoxicidade hepática acontece quando a capacidade do hepatócito de gerenciar e exportar AGLs como triglicerídeos está sobrecarregada. O receptor Cd36, uma glicoproteína de superfície, tem dentre suas funções agir como uma translocase de ácidos graxos, e na DHGNA sua expressão elevada se correlaciona positivamente com o grau histológico de esteatose hepática (Maréchal, et al., 2018; Rada et al, 2020). Em 2016, Wilson et al demonstraram que animais nocaute de Cd36 específico em hepatócitos tiveram menor acúmulo lipídico em esteatose induzido por dieta hiperlipídica. A diminuição de Cd36 que observamos no animal THOP<sup>-/-</sup> parece estar relacionada ao menor aporte lipídico que o fígado recebe por ser um animal resistente à indução da obesidade e não desenvolve resistência à insulina. De acordo com Gewehr et al. (2020), o animal THOP<sup>-/-</sup>, ao ser desafiado com dieta hiperlipídica apresenta um metabolismo energético acelerado. No entanto, a diminuição de *Cd36* também pode estar relacionada à menor expressão de *Pparg*.

PPAR $\gamma$  age como um regulador do metabolismo lipídico, aumentando a expressão de genes envolvidos na lipogênese de novo, como *Fasn* e *Acc*; e na importação de ácidos graxos livres, como *Fabp4* e *Cd36*, possuindo assim um papel esteatogênico (Skat- rørdam et al., 2019; Rada et al, 2020). A deleção de *Pparg* no hepatócito de camundongos é protetora contra a indução da esteatose diminuindo a expressão gênica adipogênica e o armazenamento de lipídeos no fígado (Liss et al, 2016). Em 2011, Morán-Salvador et al. observaram que a deleção específica de *Pparg* nos hepatócitos e macrófagos, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, resultou em diminuição significativa de vacúolos lipídicos hepáticos, assim como a diminuição significativa de genes relacionados a lipogênese (*Scd1*, *Srebp-1* e *Acc*), transporte lipídico (*Cd36*, *L-fabp* e *Mtp*) e a beta-oxidação (*Ppara* e *Aco*). Corroborando com Gewehr et al. (2020) ao desafiar o animal THOP<sup>-/-</sup> com a dieta deficiente em colina, observamos então que a expressão de *Pparg* e *Acc* decaí, o que representa uma diminuição das vias lipogênicas nesse animal.

Curiosamente observamos que o animal THOP<sup>-/-</sup>, independente da dieta, apresenta menores níveis de *Ppara*, um dos principais ativadores da beta oxidação de ácidos graxos no fígado, músculo esquelético, coração, rim e tecido adiposo marrom (Maréchal, et al., 2018; Francque, et al., 2020). Estudos recentes apontam que *Ppara* é negativamente regulado pelo miR-34a (Baffy, 2015; Yu et al., 2019). O miR-34a também tem como alvo a *Sirt1* e diminui sua função metabólica, que é inibir o acúmulo de lipídeos no hepatócito através da ativação da via *Ampk* (Yu et al., 2019). No entanto, *Sirt1* não foi modulado nos nossos resultados.

A curto prazo, o acúmulo de lipídios no fígado induzido pela dieta deficiente em colina aumenta a oxidação fosforilativa, no entanto, após 16 semanas de dieta ocorre disfunção mitocondrial (Teodoro et al., 2008). Os autores relataram um aumento no consumo de oxigênio após inibição com oligomicina, sugerindo um aumento no vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna para a matriz não mediada pela ATP sintase. Ademais, quando AGLs e colesterol se acumulam na mitocôndria, são considerados lipídeos agressivos que levam ao dano hepático mediado pelo fator de necrose tumoral alfa (*Tnfa*) e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Marí et al, 2006; Feldstein et al, 2009). Esses lipídios podem atuar como acertos inflamatórios iniciais em um fígado não esteatótico, levando a todo o espectro de patologias da DHGNA (Tilg & Moschen, 2010).



De modo interessante, nós observamos que *TNFA* e *Ucp2* tem expressão aumentada após 24 semanas de dieta nos animais WT, o que corrobora com o aumento da permeabilidade de prótons na matriz sem produzir ATP, gerando um acoplamento ineficiente. Nos animais THOP<sup>-/-</sup> a expressão de *Ucp2* é menor em relação ao WTDC, assim é possível supor que ocorre uma melhora da disfunção mitocondrial, no entanto outros experimentos são necessários para comprovar essa hipótese.

A presença de inflamação com esteatose marca a progressão à esteatohepatite. Aqui observamos que além da expressão reduzida de *Tnfa*, as citocinas Il-17, Il-1b estão menos expressas no fígado dos animais THOP<sup>-/-</sup> desafiados com a dieta deficiente em colina. Essas citocinas pró-inflamatórias juntamente com Tgfb facilitam a produção de matriz extracelular pelo fibroblasto em resposta a TGFβ (Henderson et al., 2020; Van Herck et al., 2019).

A lipotoxicidade causada pela disfunção nos mecanismos acima descritos leva o hepatócito à exaustão e acarreta a apoptose. Esse mecanismo gera a ativação das células estreladas hepáticas, assim como de macrófagos e fibroblastos. A ativação dessas células em conjunto leva a reparação tecidual através da deposição de colágeno, gerando assim a fibrose (Bataller et al., 2005). Já foi observado que em células hepáticas estreladas, o silenciamento do miR-34a leva ao aumento da expressão de acyl-CoA sintase1 e diminuição de alpha-sma e Col1a1 (Yan et al., 2015). Interessantemente, notamos que de forma similar a diminuição do miR-34a também há diminuição da expressão hepática de Col1a1 nos animais THOP<sup>-/-</sup> a partir de 15 semanas, sugerindo assim que a atenuação da fibrose hepática é devido a uma menor deposição de colágeno pelas células estreladas hepáticas.

Timp-1 regula a remodelação da matriz extracelular no fígado pelas metaloproteinases de matriz (Thiele et al., 2017). Em resposta à lesão hepática, Timp-1 é expresso como uma consequência da interação entre miofibroblastos ativados e macrófagos hepáticos, importantes componentes do ambiente cirrótico. Ademais, Timp-1 hepático é regulado positivamente durante a fibrogênese e o CHC; e sua expressão correlaciona-se diretamente com o estágio da fibrose (Thiele et al., 2017; Ghoshal-Gupta et al., 2018). No entanto, estudos mostram que animais nocaute para Timp-1 não foram protegidos da fibrose hepática induzida por BDL

(ligadura do ducto biliar) ou CCl<sub>4</sub> (tetracloreto de carbono), mostrando assim que Timp-1, apesar de ter um papel importante, não é essencial para a fibrogênese e carcinogênese hepática em camundongos (Thiele et al., 2017).

Do cluster de microRNAs encontrados no microarray, o microRNA miR-34a aparenta ser o mais promissor para a nossa hipótese. Além do dito anteriormente, sabe-se que o miR-34a é um marcador da progressão da DHGNA (Baffy, 2015; Pogribny et al., 2010). Estudos mostram que Pparg é um alvo direto dos miR-34a e miR-34c em células estreladas hepáticas (Li et al., 2014; Jiang et al., 2017; Portius et al., 2017). Em hepatócitos o miR-34a também tem como alvo caspase 2, que por sua vez ativa a via de apoptose mitocondrial, resultando por fim em apoptose celular (Jiang et al., 2017). A p53, que é um dos ativadores transcricionais de miR-34a, está associada a ativação da apoptose via mitocondrial (Castro et al., 2013). A via de sinalização miR-34/Sirt1/p53 forma um feedback positivo em que p53 induz miR-34a e miR-34a ativa p53 através da inibição de Sirt1, desempenhando assim um importante papel na proliferação celular e apoptose em hepatócitos (Castro et al., 2013; Tian et al., 2016). Qin et al., (2020) ainda observaram que o miR-34a tem como alvo Cdk6, e que em um meio com alta oferta de ácidos graxos essa via promove a senescência do hepatócito.

Estudos recentes demonstram que peptídeos podem interagir com pré-micro-RNA suprimindo o seu processamento pela Dicer (Pai et al., 2016; Shortridge et al., 2017) ou ainda impedindo que a AGO2 se ligue ao microRNA (Danner et al., 2016). De acordo com Gewehr et al. (2020), os mecanismos moleculares pelos quais a deleção de THOP1 protege da indução da obesidade e da esteatose parecem estar relacionados com peptídeos intracelulares derivados de histonas, que podem interagir diretamente com os microRNAs favorecendo ou bloqueando a ligação dos microRNAs a região 3'UTR de seus RNAm alvos. Nossos dados indicam que a expressão do pri-miR-34a foi modulada da mesma forma que o miR-34a maduro, insinuando que o downregulation do miR-34a nos animais THOP<sup>-/-</sup> ocorre a nível transcricional. Hipotetizamos aqui que esse mecanismo ocorre pela interação do peptídeo VDPVNFK que deixa de ser processado pela THOP1 e interage então, de forma direta ou indireta, com o miR-34a.

Em 1999, Counterman & Clemmer, definiram VDPVNFK como um hepato peptídeo derivado da cadeia alfa da hemoglobina humana e que sua localização

estaria entre as restrições secundárias e terciárias da hemoglobina. No entanto, em 2010, Toennes et al, encontraram que a expressão de VDPVNFK estava diminuída em amostras de sangue humano de pacientes que não consumiam álcool comparado ao de pacientes que consumiam álcool frequentemente. Cerqueira (2018) também encontrou VDPVNFK no sangue de pacientes saudáveis. Deste modo, o peptídeo VDPVNFK, produzido no fígado parece ser secretado.

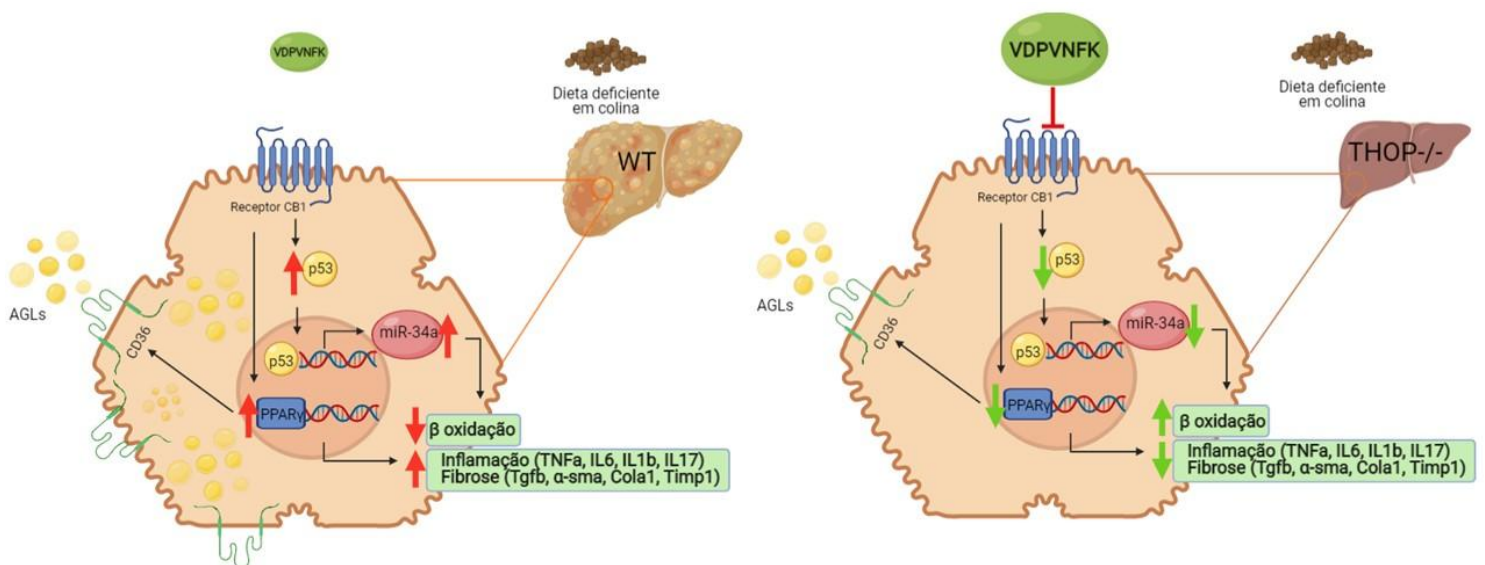
O peptídeo VDPVNFK têm sequência semelhante à hemopressina (PVNFKFLSH), um peptídeo também derivado da cadeia alfa da hemoglobina. A hemopressina age como um agonista inverso de CB1 e os cinco aminoácidos aminoterminais (PVNFK) são necessários para sua ação em CB1 (Heimann et al, 2007). Dados ainda não publicados do nosso grupo, sugerem que a região NFK do peptídeo VDPVNFK se liga à CB1 e CB2.

Em 2008 Osei-Hyiaman et al, observaram que a ativação endocanabinóide do CB1 hepático contribui para a esteatose induzida pela dieta hiperlipídica e alterações hormonais e metabólicas associadas, mas não para o aumento da adiposidade. De acordo com Azar et al. (2020), a estimulação de CB1 promove a expressão do miR-34a via ativação de p53 que por consequência agrava a lesão hepática via Ppara/Sirt1. Além disso, a inibição periférica de CB1 pode inibir a ativação das células estreladas hepáticas, além de induzir sua apoptose (Higashi et al., 2017). Giuliano et al (2009) e Hong et al (2013), observaram que o agonismo do canabinoide sintético Win (WIN 55,212-2), em células hepáticas HepG2 e BEL-7402, promove apoptose celular e é mediado por Pparg. Esses autores relatam que a administração de Win aumenta os níveis de Pparg e que a administração concomitante de Win junto à antagonistas de Pparg reduz significativamente os efeitos de Win. Ademais, Swefy e colaboradores (2016) observaram que a administração combinada de curcuma com hemopressina atenua a fibrose hepática de ratos induzida por colestase através do antagonismo de CB1.

## 7. Conclusão

Diante do exposto e dos dados obtidos nesse projeto, sugerimos que a atenuação do quadro geral da DHGNA nos animais THOP<sup>-/-</sup> ao longo do tempo seja pelo acúmulo do peptídeo VDPVNFK, que se liga ao CB1 inibindo a sua ação e consequentemente diminuindo a expressão do miR-34a, e de Pparg, que participam das vias de acúmulo de lipídeos e fibrose hepática, por ativação das células estreladas (**Figura 25**).

**Figura 25.** Mecanismo proposto para os efeitos da deleção da THOP1 na DHGNA.



Legenda: Mecanismo proposto para os efeitos da deleção da THOP1 na DHGNA. A ausência da THOP1 provoca o acúmulo do peptídeo VDPVNFK no fígado. VDPVNFK é secretado e age inibindo o receptor CB1, o que irá provocar uma diminuição de p53 e consequente diminuição da transcrição do miR-34a e da ação de Pparg. Esse mecanismo provoca aumento da β-oxidação de ácidos graxos e diminuição da expressão de Cd36, das vias inflamatórias e fibróticas.

## 8. Referências

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. [S.l.]: Elsevier, 2015. 552 p

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), pp.350–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02871>.

ANDRADE, Gabriel Costa de; FUJISE, Luciana Harumi; SANTANA FILHO, Jaime Euclides de; OLIVEIRA, Fabiane; SILVA, Rita de Cássia Martins Alves da. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in different populations: a clinical and epidemiological study : sample of são josé do rio preto. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 218-226, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.62.03.218>.

BAFFY, György. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal Of Clinical Medicine*, [s.l.], v. 4, n. 12, p.1977-1988, 4 dez. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm4121953>.

Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp.281–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>.

BATALLER, Ramón; BRENNE, David A.. Liver fibrosis. *The Journal Of Clinical Investigation*, S.l, v. 115, n. 2, p. 209-218, fev. 2005.

BECKER, Philip P. et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Plos One*, [s.l.], v. 10, n. 11, p.0-0, 13 nov. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142661>.

BRASIL. Ibge. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 10,3 milhões de pessoas moram em domicílios com insegurança alimentar grave. 2020. Disponível em: <https://censo2021.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/28903-10-3-milhoes-de-pessoas-moram-em-domicilios-com-inseguranca-alimentar-grave.html#:~:text=A%20inseguran%C3%A7a%20alimentar%20grave%20esteve,84%2C9%20milh%C3%B5es%20de%20pessoas..> Acesso em: 21 abr. 2021.

BROWN, C. K. et al. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 98, n. 6, p.3127-3132, 6 mar. 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051633198>.

BRUNT, Elizabeth M.; JANNEY, Christine G.; BISCEGLIE, Adrian M.; NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A.; BACON, Bruce R.. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal Of Gastroenterology*, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 2467-2474, set. 1999. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>.

BUZZETTI, Elena; PINZANI, Massimo; TSOCHATZIS, Emmanuel A.. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, [s.l.], v. 65, n. 8, p.1038-1048, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.

CASTRO, Rui E.; FERREIRA, Duarte M.s.; AFONSO, Marta B.; BORRALHO, Pedro M.; MACHADO, Mariana V.; CORTEZ-PINTO, Helena; RODRIGUES, Cecília M.P.. MiR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *Journal Of Hepatology*, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 119-125, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.008>.

CERQUEIRA, Leticia Bonancio. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA POR LC-QTOF-MS. 2018. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde,, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

CHANG, Yoosoo; JUNG, Hyun-Suk; CHO, Juhee; ZHANG, Yiyi; YUN, Kyung Eun; LAZO, Mariana; PASTOR-BARRIUSO, Roberto; AHN, Jiin; KIM, Chan-Won; RAMPAL, Sanjay. Metabolically Healthy Obesity and the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal Of Gastroenterology*, [S.L.], v. 111, n. 8, p. 1133-1140, ago. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2016.178>.

COELHO, Bhagavan de Castro. PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA ACOMPANHADOS NO SERVIÇO DE GASTROENTEROLOGIA DO HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA. 2019. 90 f. TCC (Graduação) - Curso de Residência Médica em Gastroenterologia, Gastroenterologia, Escola de Saúde Pública Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, 2019.

COTRIM, Hp; OLIVEIRA, Cp; COELHO, Hs; ALVARES-DA-SILVA, Mr; NABUCO, L; PARISE, Er; IVANTES, C; MARTINELLI, Al; GALIZZI-FILHO, J; CARRILHO, Fj. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: brazilian survey. Clinics, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 281-284, 25 maio 2016. Fundacao Faculdade de Medicina. [http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2016\(05\)07](http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2016(05)07).

COTRIM, Helma P.; PARISE, Edison R.; OLIVEIRA, Claudia P.M.s.; LEITE, Natalhie; MARTINELLI, Ana; GALIZZI, João; SILVA, Rita de Càssia; MATTOS, Ângelo; PEREIRA, Leila; AMORIM, Waldir. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals Of Hepatology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 33-37, jan. 2011. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31584-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31584-4).

COUNTERMAN, Anne E.; CLEMMER, David E.. Volumes of Individual Amino Acid Residues in Gas-Phase Peptide Ions. Journal Of The American Chemical Society, [S.L.], v. 121, n. 16, p. 4031-4039, abr. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja984344p>.

FAN, Weimin, et al. Identification of CD206 as a potential biomarker of cancer stem-like cells and therapeutic agent in liver cancer. Oncology Letters, [S.L.], v. 3, n. 18, p. 3218-3226, out. 2019.

FELDSTEIN, A e; CHARATCHAROENWITTHAYA, P; TREEPRASERTSUK, S; BENSON, J T; ENDERS, F B; ANGULO, P. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease in children: a follow-up study for up to 20 years. Gut, [S.L.], v. 58, n. 11, p. 1538-1544, 21 jul. 2009. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2008.171280>.

FERRO, Emer S.; GEWEHR, Mayara C. F.; NAVON, Ami. Thimet Oligopeptidase Biochemical and Biological Significances: past, present, and future directions. **Biomolecules**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1229, 24 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10091229>.

FITZSIMMONS, Rebecca L; LAU, Patrick; MUSCAT, George E.O. Retinoid-related orphan receptor alpha and the regulation of lipid homeostasis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, [s.l.], v. 130, p. 159-168, jun, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.06.009>

FRANCQUE, Sven; SZABO, Gyongyi; ABDELMALEK, Manal F.; BYRNE, Christopher D.; CUSI, Kenneth; DUFOUR, Jean-François; RODEN, Michael; SACKS, Frank; TACKE, Frank. Nonalcoholic steatohepatitis: the role of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 24-39, 22 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-00366-5>.

FRIEDMAN, Scott L.; NEUSCHWANDER-TETRI, Brent A.; RINELLA, Mary; SANYAL, Arun J.. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 908-922, jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.

FROHME, Josephine; TACKE, Frank. The socioeconomic aspects of nonalcoholic fatty liver disease: food insecurity as a novel risk factor for steatosis and liver fibrosis. *Hepatobiliary Surgery And Nutrition*, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 543-545, ago. 2020. AME Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.21037/hbsn.2020.03.03>.

GEWEHR, Mayara C. F.; TEIXEIRA, Alexandre A. S.; SANTOS, Bruna A. C.; BIONDO, Luana A.; GOZZO, Fábio C.; CORDIBELLO, Amanda M.; EICHLER, Rosangela A. S.; RECKZIEGEL, Patrícia; SILVA, Renée N. O. da; SANTOS, Nilton B. dos. The Relevance of Thimet Oligopeptidase in the Regulation of Energy Metabolism and Diet-Induced Obesity. *Biomolecules*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.321-361, 17 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10020321>.

GHETTI, Fabiana de Faria; OLIVEIRA, Daiane Gonçalves; OLIVEIRA, Juliano Machado de; FERREIRA, Lincoln Eduardo Villela Vieira de Castro; CESAR, Dionéia Evangelista; MOREIRA, Ana Paula Boroni. Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis. *European Journal Of Nutrition*, [S.L.], v. 57, n. 3, p. 861-876, 5 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-017-1524-x>.

GHOSHAL-GUPTA, Sampa; KUTIYANAWALLA, Ammar; LEE, Byung Rho; OJHA, Juhi; NURANI, Aliya; MONDAL, Ashis K.; KOLHE, Ravindra; ROJIANI, Aryn M.; ROJIANI, Mumtaz V.. TIMP-1 downregulation modulates miR-125a-5p expression



and triggers the apoptotic pathway. *Oncotarget*, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 8941-8956, 2 jan. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23832>.

GIOLI-PEREIRA, Luciana et al. Localization of EP24.15, a Major Liver Kininase. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, [s.l.], v. 51, n. 1, p.125-127, jan. 2003. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540305100115>.

GIULIANO, Michela; PELLERITO, Ornella; PORTANOVA, Patrizia; CALVARUSO, Giuseppe; SANTULLI, Andrea; BLASIO, Anna de; VENTO, Renza; TESORIERE, Giovanni. Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor ppar $\gamma$ . *Biochimie*, [S.L.], v. 91, n. 4, p. 457-465, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.003>.

GJORGJIEVA, Monika; SOBOLEWSKI, Cyril; DOLICKA, Dobrochna; SOUSA, Marta Correia de; FOTI, Michelangelo. MiRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut*, [S.L.], v. 68, n. 11, p. 2065-2079, 12 jul. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318146>.

GOLOVATY, Ilya; TIEN, Phyllis C; PRICE, Jennifer C; SHEIRA, Lila; SELIGMAN, Hilary; WEISER, Sheri D. Food Insecurity May Be an Independent Risk Factor Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease among Low-Income Adults in the United States. *The Journal Of Nutrition*, [S.L.], v. 150, n. 1, p. 91-98, 10 set. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/nxz212>.

HEIMANN, A. S.; FAVARATO, M. H.; GOZZO, F. C.; RIOLI, V.; CARREÑO, F. R.; EBERLIN, M. N.; FERRO, E. S.; KREGE, J. H.; KRIEGER, J. E.. ACE gene titration in mice uncovers a new mechanism for ACE on the control of body weight. *Physiological Genomics*, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 173-182, 20 jan. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00145.2004>.

HEIMANN, A. S.; GOMES, I.; DALE, C. S.; PAGANO, R. L.; GUPTA, A.; SOUZA, L. L. de; LUCHESSI, A. D.; CASTRO, L. M.; GIORGI, R.; RIOLI, V.. Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 51, p. 20588-20593, 12 dez. 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0706980105>.

HENDERSON, Neil C.; RIEDER, Florian; WYNN, Thomas A.. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature*, [S.L.], v. 587, n. 7835, p. 555-566, 25 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2938-9>.

HIGASHI, Takaaki; FRIEDMAN, Scott L.; HOSHIDA, Yujin. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 121, p. 27-42, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>.

HONG, Yuehui; ZHOU, Yuting; WANG, Ying; XIAO, Shunhua; LIAO, D. Joshua; ZHAO, Qing. PPAR $\gamma$  mediates the effects of WIN55,212-2, an synthetic cannabinoid, on the proliferation and apoptosis of the BEL-7402 hepatocarcinoma cells. *Molecular Biology Reports*, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 6287-6293, 24 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-013-2741-x>.

ICIMOTO, Marcelo Y. et al. Redox modulation of thimet oligopeptidase activity by hydrogen peroxide. *Febs Open Bio*, [s.l.], v. 7, n. 7, p.1037-1050, 19 jun. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12245>.

JIANG, Xue-Ping; AI, Wen-Bing; WAN, Lin-Yan; ZHANG, Yan-Qiong; WU, Jiang-Feng. The roles of microRNA families in hepatic fibrosis. *Cell & Bioscience*, [S.L.], v. 7, n. 1, 4 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-017-0161-7>.

KAWAGUCHI, Takahisa; SUMIDA, Yoshio; UMEMURA, Atsushi; MATSUO, Keitaro; TAKAHASHI, Meiko; TAKAMURA, Toshinari; YASUI, Kohichiroh; SAIBARA, Toshiji; HASHIMOTO, Etsuko; KAWANAKA, Miwa. Genetic Polymorphisms of the Human PNPLA3 Gene Are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese. *Plos One*, [S.L.], v. 7, n. 6, 14 jun. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038322>.

KIM, Donghee; LI, Andrew A.; GADIPARTHI, Chiranjeevi; KHAN, Muhammad Ali; CHOLANKERIL, George; GLENN, Jeffrey S.; AHMED, Aijaz. Changing Trends in Etiology-Based Annual Mortality From Chronic Liver Disease, From 2007 Through 2016. *Gastroenterology*, [S.L.], v. 155, n. 4, p. 1154-1163, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.008>.

KIM, Sung Min; CHOI, Jung Eun; HUR, Wonhee; KIM, Jung-hee; HONG, Sung Woo; LEE, Eun Byul; LEE, Joon Ho; LI, Tian Zhu; SUNG, Pil Soo; YOON, Seung Kew.

RAR-Related Orphan Receptor Gamma (ROR- $\gamma$ ) Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition Of Hepatocytes During Hepatic Fibrosis. *Journal Of Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 118, n. 8, p. 2026-2036, 27 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25776>.

KIRPICH, Irina A.; MARSANO, Luis S.; MCCLAIN, Craig J.. Gut–liver axis, nutrition, and non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Biochemistry*, [S.L.], v. 48, n. 13-14, p. 923-930, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>.

LEE, Yoon Kwang; PARK, Jung Eun; LEE, Mikang; HARDWICK, James P. Hepatic lipid homeostasis by peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. *Liver Research*, [S.I.], v. 2, p. 209-215, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.12.001>

LI, Xiaofei; CHEN, Yongxin; WU, Shuang; HE, Jinke; LOU, Lianqing; YE, Weiwei; WANG, Jinhe. MicroRNA-34a and microRNA-34c promote the activation of human hepatic stellate cells by targeting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Molecular Medicine Reports*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1017-1024, 3 nov. 2014. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.2846>.

LIANG, Qionghe; CHEN, Huan; XU, Xiaoqun; JIANG, Weiwei. MiR-182-5p Attenuates High-Fat -Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Annals Of Hepatology*, [s.l.], v. 18, n. 1, p.116-125, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.5604/01.3001.0012.7902>.

LIANG, Wen et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. *Plos One*, [s.l.], v. 9, n. 12, p.115922, 23 dez. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115922>.

LIN, Hung-yu; WANG, Feng-sheng; YANG, Ya-ling; HUANG, Ying-hsien. MicroRNA-29a Suppresses CD36 to Ameliorate High Fat Diet-Induced Steatohepatitis and Liver Fibrosis in Mice. *Cells*, [s.l.], v. 8, n. 10, p.1298, 22 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8101298>.

LISS, Kim H.h.; FINCK, Brian N.. PPARs and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimie*, [s.l.], v. 136, p.65-74, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.009>.

LIU, Jie et al. A circulating microRNA signature as noninvasive diagnostic and prognostic biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *Bmc Genomics*, [s.l.], v. 19, n. 1, p.0-0, 9 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4575-3>.

LIU, Xiao-lin; PAN, Qin; CAO, Hai-xia; XIN, Feng-zhi; ZHAO, Ze-hua; YANG, Rui-xu; ZENG, Jing; ZHOU, Huiping; FAN, Jian-gao. Lipotoxic Hepatocyte-Derived Exosomal miR-192-5p Activates Macrophages via Rictor/Akt/FoxO1 Signaling in NAFLD. *Hepatology*, [s.l.], 28 nov. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.31050>.

LYONS, Peter J.; FRICKER, Lloyd D.. Peptidomic Approaches to Study Proteolytic Activity. *Current Protocols In Protein Science*, [s.l.], p.18131-181312, ago. 2011. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471140864.ps1813s65>.

MARÉCHAL, Loïze; LAVIOLETTE, Maximilien; RODRIGUE-WAY, Amélie; SOW, Baly; BROCHU, Michèle; CARON, Véronique; TREMBLAY, André. The CD36-PPAR $\gamma$  Pathway in Metabolic Disorders. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 1529, 21 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19051529>.

MARÍ, Montserrat; CABALLERO, Francisco; COLELL, Anna; MORALES, Albert; CABALLERIA, Juan; FERNANDEZ, Anna; ENRICH, Carlos; FERNANDEZ-CHECA, José C.; GARCÍA-RUIZ, Carmen. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 185-198, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>.

MATSUMOTO, Masahiko et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal Of Experimental Pathology*, [s.l.], v. 94, n. 2, p.93-103, 11 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/iep.12008>.

MIURA, Kouichi. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal Of Gastroenterology*, [S.L.], v. 20, n. 23, p. 7381, 2014. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7381>.

MORÁN-SALVADOR, Eva; LÓPEZ-PARRA, Marta; GARCÍA-ALONSO, Verónica; TITOS, Esther; MARTÍNEZ-CLEMENTE, Marcos; GONZÁLEZ-PÉRIZ, Ana; LÓPEZ-VICARIO, Cristina; BARAK, Yaacov; ARROYO, Vicente; CLÀRIA, Joan. Role for PPAR $\gamma$  in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte-

and macrophage-specific conditional knockouts. *The FASEB Journal*, [s.l.], v. 25, n. 8, p. 2538-2550, 19 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-173716>.

NOMOTO, Shuji et al. Expression Analysis of THOP1 in Background Liver, a Prognostic Predictive Factor in Hepatocellular Carcinoma, Extracted by Multiarray Analysis. *Annals Of Surgical Oncology*, [s.l.], v. 21, n. 3, p.443-450, 7 mar. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-014-3581-1>.

OSEI-HYIAMAN, Douglas; LIU, Jie; ZHOU, Liang; GODLEWSKI, Grzegorz; HARVEY-WHITE, Judith; JEONG, Won-Il; BÁTKAI, Sándor; MARSICANO, Giovanni; LUTZ, Beat; BUETTNER, Christoph. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 118, n. 9, p. 3160-3169, 2 set. 2008. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci34827>.

PAI, Jaeyoung et al. Screening of Pre-miRNA-155 Binding Peptides for Apoptosis Inducing Activity Using Peptide Microarrays. *Journal Of The American Chemical Society*, [s.l.], v. 138, n. 3, p.857-867, 15 jan. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.5b09216>.

PIROLA, Carlos J et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*, [s.l.], v. 64, n. 5, p.800-812, 27 jun. 2014. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306996>.

POGRIBNY, Igor P; STARLARD-DAVENPORT, Athena; TRYNDYAK, Volodymyr P; HAN, Tao; A ROSS, Sharon; RUSYN, Ivan; A BELAND, Frederick. Difference in expression of hepatic microRNAs miR-29c, miR-34a, miR-155, and miR-200b is associated with strain-specific susceptibility to dietary nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Laboratory Investigation*, [S.L.], v. 90, n. 10, p. 1437-1446, 14 jun. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.113>.

POLYZOS, Stergios A.; KOUNTOURAS, Jannis; MANTZOROS, Christos S.. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: from pathophysiology to therapeutics. **Metabolism**, [S.L.], v. 92, p. 82-97, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>.

PORTIUS, Dorothea; SOBOLEWSKI, Cyril; FOTI, Michelangelo. MicroRNAs-Dependent Regulation of PPARs in Metabolic Diseases and Cancers. *Ppar Research*, [s.l.], v. 2017, p.1-19, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7058424>.

PUPPALA, Sobha; LI, Cun; GLENN, Jeremy P.; SAXENA, Romil; GAWRIEH, Samer; QUINN, Amy; PALARCZYK, Jennifer; DICK, Edward J.; NATHANIELSZ, Peter W.; COX, Laura A.. Primate fetal hepatic responses to maternal obesity: epigenetic signalling pathways and lipid accumulation. *The Journal Of Physiology*, [S.L.], v. 596, n. 3, p. 5823-5837, 6 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jp275422>.

QIN, Yu-E; DUAN, Li; HE, Yumin; YUAN, Chengfu; WANG, Ting; YUAN, Ding; ZHANG, Changcheng; LIU, Chaoqi. Saturated Fatty Acids Promote Hepatocytic Senescence through Regulation of miR-34a/Cyclin-Dependent Kinase 6. *Molecular Nutrition & Food Research*, [S.L.], v. 64, n. 23, p. 2000383-2000383, 9 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.202000383>.

RADA, Patricia; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Águeda; GARCÍA-MONZÓN, Carmelo; VALVERDE, Ángela M.. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is cd36 a key driver?. *Cell Death & Disease*, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1-15, set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>.

RAUBENHEIMER, P. J.; NYIRENDA, M. J.; WALKER, B. R.. A Choline-Deficient Diet Exacerbates Fatty Liver but Attenuates Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes*, [s.l.], v. 55, n. 7, p.2015-2020, 27 jun. 2006. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/db06-0097>.

RAY, Kallol et al. Crystal Structure of Human Thimet Oligopeptidase Provides Insight into Substrate Recognition, Regulation, and Localization. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 279, n. 19, p.20480-20489, 3 mar. 2004. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m400795200>.

RIOLI, Vanessa; GOZZO, Fabio C.; HEIMANN, Andrea S.; LINARDI, Alessandra; KRIEGER, José E.; SHIDA, Cláudio S.; ALMEIDA, Paulo C.; HYSLOP, Stephen; EBERLIN, Marcos N.; FERRO, Emer S.. Novel Natural Peptide Substrates for Endopeptidase 24.15, Neurolysin, and Angiotensin-converting Enzyme. *Journal Of*

Biological Chemistry, [S.L.], v. 278, n. 10, p. 8547-8555, mar. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m212030200>.

ROTMAN, Yaron; KOH, Christopher; ZMUDA, Joseph M.; KLEINER, David E.; LIANG, T. Jake. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 894-903, 14 maio 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23759>.

ROTTIERS, Veerle; NÄÄR, Anders M.. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 239-250, 22 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3313>.

RUSSO, Lilian C. et al. Inhibition of thimet oligopeptidase by siRNA alters specific intracellular peptides and potentiates isoproterenol signal transduction. *Febs Letters*, [s.l.], v. 586, n. 19, p.3287-3292, 10 jul. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.002>.

SANTIAGO-ROLÓN, Amarilys et al. A Comparison of Brunt Criteria, the Non Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score (NAS) & a Proposed NAS-including fibrosis as Valid Diagnostic Scores for NASH. *P R Health*, San Juan, v. 4, n. 34, p. 189-194, dez. 2015.

SANTOS, Nilton dos; FRANCO, Roseane; CAMARINI, Rosana; MUNHOZ, Carolina; EICHLER, Rosangela; GEWEHR, Mayara; RECKZIEGEL, Patricia; LLANOS, Ricardo; DALE, Camila; SILVA, Victoria da. Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15) Key Functions Suggested by Knockout Mice Phenotype Characterization. *Biomolecules*, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 382-382, 19 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9080382>.

SANYAL, Arun J.. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 377-386, 25 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0144-8>.

SARIC, Tomo; GRAEF, Claudia I.; GOLDBERG, Alfred L.. Pathway for Degradation of Peptides Generated by Proteasomes. *Journal Of Biological Chemistry*, [s.l.], v.

279, n. 45, p.46723-46732, 24 ago. 2004. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m406537200>.

Shahar Azar, Shiran Udi, Adi Drori, Rivka Hadar, Alina Nemirovski, Kiran V. Vemuri, Maya Miller, Dana Sherill-Rofe, Yhara Arad, Devorah Gur-Wahnon, Xiaoling Li, Alexandros Makriyannis, Danny Ben-Zvi, Yuval Tabach, Iddo Z. Ben-Dov, Joseph Tam. Reversal of diet-induced hepatic steatosis by peripheral CB1 receptor blockade in mice is p53/miRNA-22/SIRT1/PPAR $\alpha$  dependent, *Molecular Metabolism*, Volume 42, 2020, 101087, ISSN 2212-8778, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101087>.

SHIMIZU, Dai et al. Search for useful biomarkers in hepatocellular carcinoma, tumor factors and background liver factors. *Oncology Reports*, [s.l.], v. 37, n. 5, p.2527-2542, 31 mar. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2017.5541>.

SHORTRIDGE, Matthew D. et al. A Macrocyclic Peptide Ligand Binds the Oncogenic MicroRNA-21 Precursor and Suppresses Dicer Processing. *Acs Chemical Biology*, [s.l.], v. 12, n. 6, p.1611-1620, 2 maio 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.7b00180>.

SILVA, Celio L.; PORTARO, Fernanda C.V.; BONATO, Vânia L.D.; CAMARGO, Antonio C.M. de; FERRO, Emer S.. Thimet Oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a Novel Protein on the Route of MHC Class I Antigen Presentation. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 255, n. 3, p. 591-595, fev. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1999.0250>.

SIMÕES, Inês C.M.; FONTES, Adriana; PINTON, Paolo; ZISCHKA, Hans; WIECKOWSKI, Mariusz R.. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, [S.L.], v. 95, p. 93-99, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.019>.

SIVELL, Christopher. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. ***Gastroenterology Nursing***, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 428-434, 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/sga.0000000000000443>.

SKAT-RØRDAM, Josephine; IPSEN, David Højland; LYKKESFELDT, Jens; TVEDEN-NYBORG, Pernille. A role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in non-alcoholic fatty liver disease. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, [s.l.], v. 124, n. 5, p. 528-537, 22 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.13190>.



SUNDSTROM, Jeffrey M.; HERNÁNDEZ, Cristina; WEBER, Sarah R.; ZHAO, Yuanjun; DUNKLEBARGER, Mitchell; TIBERTI, Natalia; LAREMORE, Tatiana; SIMÓ-SERVAT, Olga; GARCIA-RAMIREZ, Marta; BARBER, Alistair J.. Proteomic Analysis of Early Diabetic Retinopathy Reveals Mediators of Neurodegenerative Brain Diseases. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 2264, 4 maio 2018. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.17-23678>.

SWEFY, Sahar El; HASAN, Rehab A.; IBRAHIM, Amal; MAHMOUD, Mona F.. Curcumin and hemopressin treatment attenuates cholestasis-induced liver fibrosis in rats: role of cb1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg'S Archives Of Pharmacology*, [S.L.], v. 389, n. 1, p. 103-116, 16 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-015-1181-7>.

SZABO, Gyongyi; BALA, Shashi. MicroRNAs in liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [s.l.], v. 10, n. 9, p.542-552, 21 maio 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2013.87>.

TARASOV, Valery; JUNG, Peter; VERDOODT, Berlinda; LODYGIN, Dmitri; EPANCHINTSEV, Alexey; MENSSEN, Antje; MEISTER, Gunter; HERMEKING, Heiko. Differential Regulation of microRNAs by p53 Revealed by Massively Parallel Sequencing: mir-34a is a p53 target that induces apoptosis and g1-arrest. *Cell Cycle*, [S.L.], v. 6, n. 13, p. 1586-1593, jul. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.13.4436>.

TEODORO, João S.; ROLO, Anabela P.; DUARTE, Filipe V.; SIMÕES, Anabela M.; PALMEIRA, Carlos M.. Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*, [S.L.], v. 8, n. 5-6, p. 367-376, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2008.07.008>.

TESSITORE, Alessandra; CICCARELLI, Germana; VECCHIO, Filippo del; GAGGIANO, Agata; VERZELLA, Daniela; FISCHIETTI, Mariafausta; MASTROIACO, Valentina; VETUSCHI, Antonella; SFERRA, Roberta; BARNABEI, Remo. MicroRNA expression analysis in high fat diet-induced NAFLD-NASH-HCC progression: study on C57BL/6J mice. *Bmc Cancer*, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-1, 5 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-2007-1>.

TIAN, Xiao-Feng; JI, Fu-Jian; ZANG, Hong-Liang; CAO, Hong. Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 Signaling Pathway Contributes to the Progress of Liver Fibrosis via Inducing Apoptosis in Hepatocytes but Not in HSCs. *Plos One*, [S.L.], v. 11, n. 7, 7 jul. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0158657>.

TIBURCIO, Taynã Cristina et al. Connexin32 deficiency is associated with liver injury, inflammation and oxidative stress in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*, [s.l.], v. 44, n. 2, p.197-206, 24 jan. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12701>.

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R.. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, [s.l.], v. 52, n. 5, p.1836-1846, 29 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24001>.

TILG, Herbert; ADOLPH, Timon E.; MOSCHEN, Alexander R.. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: revisited after a decade. *Hepatology*, [S.L.], v. 73, n. 2, p. 833-842, fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.31518>.

THAN, Nwe Ni; NEWSOME, Philip N.. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, [s.l.], v. 239, n. 1, p.192-202, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001>.

THIELE, Nina D.; WIRTH, Jan W.; STEINS, David; KOOP, Anja C.; ITTRICH, Harald; LOHSE, Ansgar W.; KLUWE, Johannes. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, 6 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-00671-1>.

TOENNES, Stefan W.; WAGNER, Moritz G.; KAUERT, Gerold F.. Application of LC–TOF MS to analysis of hemoglobin acetaldehyde adducts in alcohol detoxification patients. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, [S.L.], v. 398, n. 2, p. 769-777, 4 jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3931-1>.

VAN HERCK, Mikhaïl A.; WEYLER, Jonas; KWANTEN, Wilhelmus J.; DIRINCK, Eveline L.; WINTER, Benedicte Y. de; FRANcqUE, Sven M.; VONGHIA, Luisa. The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity.

**Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, 6 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00082>.

WANG, Yuhui; VISCARRA, Jose; KIM, Sun-joong; SUL, Hei Sook. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 16, n. 11, p. 678-689, 22 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4074>.

WILSON, Camella G.; TRAN, Jennifer L.; ERION, Derek M.; VERA, Nicholas B.; FEBBRAIO, Maria; WEISS, Ethan J.. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*, [s.l.], v. 157, n. 2, p. 570-585, fev. 2016. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2015-1866>.

XIAO, Junjie et al. MiR-212 downregulation contributes to the protective effect of exercise against non-alcoholic fatty liver via targeting FGF-21. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 20, n. 2, p.204-216, 9 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12733>.

XIAO, Junjie et al. MiR-149 controls non-alcoholic fatty liver by targeting FGF-21. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1603-1608, 6 abr. 2016b. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12848>.

XU, Yang; ZALZALA, Munaf; XU, Jiesi; LI, Yuanyuan; YIN, Liya; ZHANG, Yanqiao. A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4 $\alpha$  pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. *Nature Communications*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-11, 23 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms8466>.

XU, Fen; GUO, Wanrong. The progress of epigenetics in the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research*, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 118-123, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livres.2020.08.003>.

YILMAZ, Y.. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, [S.L.], v. 36, n. 9, p. 815-823, 11 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/apt.12046>.

YAN, Gangli; LI, Binbin; XIN, Xuan; XU, Midie; JI, Guoqing; YU, Hongyu. MicroRNA-34a Promotes Hepatic Stellate Cell Activation via Targeting ACSL1.

Medical Science Monitor, [S.L.], v. 21, p. 3008-3015, 2015. International Scientific Information, Inc.. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.894000>.

YOUNOSSI, Zobair et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [s.l.], v. 15, n. 1, p.11-20, 20 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.

YOUNOSSI, Zobair et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, [s.l.], v. 69, n. 6, p.2672-2682, 29 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.30251>.

YU, Jingwei; PENG, Jun; LUAN, Zhilin; ZHENG, Feng; SU, Wen. MicroRNAs as a Novel Tool in the Diagnosis of Liver Lipid Dysregulation and Fatty Liver Disease. *Molecules*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.230, 9 jan. 2019. MDPI AG.

ZAHRAN, Walid E.; EL-DIEN, Kholoud A. Salah; KAMEL, Philip G.; EL-SAWABY, Ahmed Shawky. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian Journal Of Clinical Biochemistry*, [s.l.], v. 28, n. 2, p.141-146, 14 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12291-012-0236-5>.

ZEISEL, Steven H; KLATT, Kevin C; A CAUDILL, Marie. Choline. *Advances In Nutrition*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 58-60, 1 jan. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/advances/nmx004>.

ZHANG, Qiqi et al. MicroRNA-149\* suppresses hepatic inflammatory response through antagonizing STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n. 39, 17 jun. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.18541>.

ZHANG, Yuxiang; PAPAZYAN, Romeo; DAMLE, Manashree; FANG, Bin; JAGER, Jennifer; FENG, Dan; PEED, Lindsey C.; GUAN, Dongyin; SUN, Zheng; LAZAR, Mitchell A.. The hepatic circadian clock fine-tunes the lipogenic response to feeding through ROR $\alpha$ / $\gamma$ . *Genes & Development*, [s.l.], v. 31, n. 12, p. 1202-1211, 15 jun. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.302323.117>.

