UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

FELIPE SCHÜTZ

LIPOFAGIA E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NA DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL

Porto Alegre
2026

FELIPE SCHÜTZ

LIPOFAGIA E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NA DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Gastroenterologia e Hepatologia.

Orientador: Prof. Mário Reis Álvares-da-Silva

Porto Alegre

2026

CIP - Catalogação na Publicação

Schütz, Felipe
LIPOFAGIA E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NA DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL / Felipe Schütz. -- 2026.
72 f.
Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica. 2. Esteato-hepatite. 3. Lipofagia. 4. Autofagia. 5. microRNAs. I. Reis Álvares-da-Silva, Mário, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FELIPE SCHÜTZ

LIPOFAGIA E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NA DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Gastroenterologia e Hepatologia.

Aprovado em: 29/06/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Neubarth Trindade
UFRGS

Prof. Dr. Bruno de Souza Basso
UFRGS

Profa. Dra. Carla Hilário da Cunha Daltro
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva (orientador)
UFRGS

"A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez."

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e - na pessoa do Professor Dr Mário Reis Álvares-da-Silva, meu Orientador e incentivador nessa empreitada - a todos os profissionais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que contribuíram para a minha formação.

RESUMO

A doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD, *Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease*) é atualmente a hepatopatia crônica de maior prevalência mundial, com espectro evolutivo que se estende da esteatose isolada à esteato-hepatite associada à disfunção metabólica (MASH), fibrose avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular. Apesar dos avanços no entendimento de sua fisiopatologia, os mecanismos epigenéticos e os processos de degradação lipídica intracelular, em particular a lipofagia, permanecem incompletamente elucidados, e ainda são limitadas as opções terapêuticas farmacológicas plenamente aprovadas. O presente estudo teve como objetivo avaliar, de modo integrado, a expressão de microRNAs (miRNAs) circulantes e de marcadores hepáticos relacionados à lipofagia em um modelo experimental de MASH. Vinte ratos Sprague Dawley adultos machos foram randomizados em dois grupos: controle (n = 10), alimentado com dieta padrão, e intervenção (n = 10), submetido a dieta hiperlipídica e deficiente em colina (HFCD) por 16 semanas. No grupo controle nenhum animal desenvolveu MASLD e no grupo intervenção os 10 animais desenvolverem MASLD, tendo 07 deles desenvolvido MASH. Avaliaram-se, no tecido hepático, a expressão dos genes Sirt1, Lamp2, p62/Sqstm1, Tfeb, Rubicon, Cd36, Plin2, Plin3 e Plin5, e, no soro, a expressão dos miRNAs miR-34a, miR-21, miR-375, miR-26b e miR-155, por qRT-PCR. Os animais do grupo intervenção desenvolveram MASH, com inflamação, balonização hepatocelular e intensa deposição de fibras colágenas. Observou-se redução significativa da expressão hepática de Sirt1 ($P = 0,020$) e p62/Sqstm1 ($P < 0,001$) e aumento de Tfeb ($P = 0,020$), Plin2 ($P = 0,003$), Plin3 ($P = 0,031$) e Plin5 ($P = 0,005$) no grupo intervenção em relação ao controle, sem diferenças significativas para Lamp2, Rubicon e Cd36. A expressão sérica de miR-34a ($P = 0,005$) e miR-21 ($P = 0,043$) mostrou-se aumentada no grupo intervenção, ao passo que miR-375, miR-26b e miR-155 não diferiram entre os grupos. Maiores níveis de miR-34a, miR-375, Tfeb e Plin2 foram observados em animais com inflamação hepática, e níveis mais elevados de Tfeb, em animais com fibrose. Identificaram-se correlações fortes entre Sirt1 e p62/Sqstm1 ($\rho = 0.81$; $P = 0.000$), entre Sirt1 e Rubicon ($\rho = 0.91$; $P = 0.000$), e entre miR-26b e miR-21 ($\rho = 0.96$; $P = 0.000$), sugerindo redes regulatórias entre autofagia, lipofagia e função lisossomal. Animais com MASH apresentaram alterações na expressão de marcadores relacionados ao estresse lisossômico e à autofagia, bem como de miRNAs relacionados à inflamação e à fibrogênese — processos que promovem a progressão da MASLD. Esses resultados reforçam o potencial de marcadores epigenéticos e da maquinaria lipofágica como biomarcadores não invasivos e como alvos terapêuticos promissores para a MASLD, contribuindo para o avanço da pesquisa em hepatologia.

Palavras-chave: doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica; esteato-hepatite; lipofagia; autofagia; microRNAs; modelo experimental.

ABSTRACT

Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease (MASLD) is currently the most prevalent chronic liver disease worldwide, with a clinical spectrum ranging from isolated steatosis to Metabolic Dysfunction-associated Steatohepatitis (MASH), advanced fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Despite advances in the understanding of its pathophysiology, the epigenetic mechanisms and the intracellular lipid degradation processes, particularly lipophagy, remain incompletely elucidated, and fully approved pharmacological therapeutic options are still limited. The present study aimed to evaluate, in an integrated manner, the expression of circulating microRNAs (miRNAs) and hepatic markers related to lipophagy in an experimental model of MASH. Twenty adult male Sprague Dawley rats were randomized into two groups: control (n = 10), fed a standard diet, and intervention (n = 10), submitted to a high-fat and choline-deficient (HFCD) diet for 16 weeks. In the control group, no animals developed MASLD, whereas in the intervention group, all 10 animals developed MASLD, with 7 of them developing MASH. The hepatic gene expression of Sirt1, Lamp2, p62/Sqstm1, Tfeb, Rubicon, Cd36, Plin2, Plin3, and Plin5, as well as the serum expression of miR-34a, miR-21, miR-375, miR-26b, and miR-155, was assessed by qRT-PCR. Animals in the intervention group developed MASH, with inflammation, hepatocellular ballooning, and intense collagen fiber deposition. A significant decrease in the hepatic expression of Sirt1 ($P = 0.020$) and p62/Sqstm1 ($P < 0.001$) and an increase in Tfeb ($P = 0.020$), Plin2 ($P = 0.003$), Plin3 ($P = 0.031$), and Plin5 ($P = 0.005$) were observed in the intervention group compared to the control group, with no significant differences for Lamp2, Rubicon, and Cd36. The serum expression of miR-34a ($P = 0.005$) and miR-21 ($P = 0.043$) was increased in the intervention group, whereas miR-375, miR-26b, and miR-155 did not differ between groups. Higher levels of miR-34a, miR-375, Tfeb, and Plin2 were observed in animals with hepatic inflammation, and higher levels of Tfeb were found in animals with fibrosis. Strong correlations were identified between Sirt1 and p62/Sqstm1 ($\rho = 0.81$; $P = 0.000$), between Sirt1 and Rubicon ($\rho = 0.91$; $P = 0.000$), and between miR-26b and miR-21 ($\rho = 0.96$; $P = 0.000$), suggesting regulatory networks among autophagy, lipophagy, and lysosomal function. Animals with MASH presented expression changes in markers related to lysosomal stress and autophagy as well as in miRNAs related to inflammation and fibrogenesis, processes that promote MASLD progression. These results reinforce the potential of epigenetic markers and of the lipophagic machinery as non-invasive biomarkers and as promising therapeutic targets for MASLD, contributing to the advancement of research in hepatology.

Keywords: metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; steatohepatitis; lipophagy; autophagy; microRNAs; experimental model.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AASLD	*American Association for the Study of Liver Diseases*
ALEH	*Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado*
ATG	Gene relacionado à autofagia (*Autophagy-Related Gene*)
ATGL	*Adipose Triglyceride Lipase*
AMPK	*AMP-activated Protein Kinase*
CD36	Cluster de Diferenciação 36
CMA	Autofagia mediada por chaperonas (*Chaperone-Mediated Autophagy*)
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FDA	*Foods and Drugs Administration*
HAT	Histona Acetiltransferase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDAC	Histona Desacetilases
HFD	Dieta Hiperlipídica (*high fat diet)*
HFCD	Dieta Hiperlipídica e Deficiente em Colina (*high-fat and choline-deficient diet*)
HSL	Hormônio Sensível à lipase (*Hormone-Sensitive Lipase*)
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6

IRGM	*Immunity-related GTPase M*
LAMP2	*Lysosome-associated membrane protein 2*
MAFLD	*Metabolic-associated Fatty Liver Disease*
MASH	*Metabolic Dysfunction-associated Steatohepatitis*
MASLD	*Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease*
MCD	Dieta Deficiente em Metionina e Colina (*methionine-choline-deficient diet*)
MetALD	*Metabolic and Alcohol-Related Liver Disease*
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PDFG	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PLIN	Perilipina
PPARα	*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*
p62/SQSTM1	Sequestossoma 1
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RUBICON	*Run domain Beclin-1-Interacting and Cysteine-Rich-Containing Protein*

SREBP-1c	*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*
SIRT1	Sirtuína 1
TAG	Triacilglicerol
TFEB	Fator de Transcrição EB (*Transcription Factor EB*)
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TyG-WC	Índice Triglicerídeo-glicose-circunferência abdominal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 JUSTIFICATIVA 14
1.2 OBJETIVOS 15
1.2.1 Objetivo Geral 15
1.2.2 Objetivos específicos 16
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA 17
2.1.1 Definição e evolução da nomenclatura 17
2.1.2 Epidemiologia 18
2.1.3 Espectro da doença 19
2.2 FISIOPATOLOGIA DA MASLD 20
2.2.1 Hipótese dos múltiplos golpes 20
2.2.2 Metabolismo lipídico hepático 21
2.2.3 Inflamação e fibrogênese 22
2.3 EPIGENÉTICA E MASLD 23
2.3.1 Mecanismos epigenéticos 23
2.3.2 MicroRNAs na MASLD 24
2.4 AUTOFAGIA E LIPOFAGIA 27
2.4.1 Mecanismos moleculares da autofagia 27
2.4.2 Lipofagia: definição e regulação 29
2.4.3 Marcadores moleculares da lipofagia 29
2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE MASLD 33
2.6 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS 35
3 ARTIGO 36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD, do inglês *Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease*), é atualmente reconhecida como a hepatopatia crônica de maior prevalência no mundo, com estimativa global em torno de 25% da população adulta, sendo as taxas mais elevadas observadas nas regiões do Oriente Médio e da América do Sul (1,2,3). Trata-se de uma condição multifatorial, intimamente relacionada à síndrome metabólica, à obesidade e ao diabetes mellitus tipo 2, cujo espectro evolutivo abrange desde a esteatose hepática isolada até formas mais graves, como a esteato-hepatite associada à disfunção metabólica (MASH, do inglês *Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis*), a fibrose hepática avançada, a cirrose e o carcinoma hepatocelular (4,3).

A reformulação da nomenclatura, que substituiu os termos Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA, ou, em inglês, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) e Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA, ou, em inglês, *Non-Alcoholic Steatohepatitis*, NASH) pelas denominações MASLD e MASH, refletiu o avanço do conhecimento sobre a etiologia da doença e a necessidade de uma definição que valorizasse os fatores metabólicos subjacentes, em detrimento de uma classificação por exclusão (5). Essa nova abordagem acompanha a crescente compreensão de que a MASLD não é apenas uma manifestação hepática da síndrome metabólica, mas um fenômeno complexo, com mecanismos próprios e implicações sistêmicas relevantes.

Estima-se que, nos próximos anos, a prevalência da MASH aumentará em até 56%, o que resultará em elevação do número de casos de cirrose, doença hepática terminal e necessidade de transplante hepático, com impacto econômico significativo sobre os sistemas de saúde (3,2). Apesar dos avanços recentes na compreensão da fisiopatologia da doença, seus mecanismos não foram totalmente elucidados, embora múltiplos protocolos clínicos venham sendo conduzidos com foco em alvos hepáticos específicos, como a desregulação dos hepatócitos e as vias inflamatórias associadas à fibrose, bem como em alvos extra-hepáticos, incluindo a obesidade e o eixo intestino-fígado (4,6,7).

Nos últimos anos, a epigenética, campo que estuda alterações fenotípicas que não decorrem de variações na sequência do DNA, tornou-se foco crescente de investigação na MASLD (8). Os microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA não codificante envolvidas na regulação pós-transcricional da expressão gênica, têm sido amplamente estudados como potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos, bem como como alvos terapêuticos (9,10,11). Diversos miRNAs, como o miR-34a, o miR-21, o miR-375, o

miR-26b e o miR-155, participam da modulação da autofagia e influenciam a expressão ou supressão de genes relacionados à lipogênese *de novo*, aos processos inflamatórios e aos mecanismos pró-apoptóticos, contribuindo para a evolução da lesão hepática (12,13,14). No entanto, a relação precisa entre os miRNAs e a autofagia na MASLD permanece pouco esclarecida.

Paralelamente, a desregulação da autofagia tem sido apontada como um mecanismo central na progressão da MASLD (15). A lipofagia, forma específica de autofagia na qual gotículas lipídicas são englobadas por autofagossomos e degradadas em lisossomos, atua na eliminação do excesso de lipídios hepáticos e na manutenção da homeostase lipídica celular (15,16). É reconhecido que o bloqueio da lipofagia promove o acúmulo de lipídios hepatocelulares, ao passo que sua ativação favorece a depuração das gotículas lipídicas (15). Tais mecanismos, contudo, não foram completamente elucidados, e a estimulação da lipofagia pode constituir-se como estratégia eficaz na prevenção ou no retardamento da progressão da MASLD (7,15,17).

Diante desse cenário, os modelos experimentais desempenham papel fundamental na avaliação dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à evolução da MASLD e na investigação de possíveis alvos terapêuticos (18,19). O presente estudo se insere nesse contexto e propõe-se a avaliar, de modo integrado, alterações epigenéticas e mecanismos da autofagia envolvidos no processo de lipofagia em um modelo experimental de MASH que mimetiza as anormalidades metabólicas observadas em humanos.

Esta tese encontra-se estruturada em nove capítulos. O primeiro corresponde à presente Introdução. O segundo apresenta a Revisão da Literatura, abrangendo definição, epidemiologia e fisiopatologia da MASLD, os mecanismos epigenéticos e os microRNAs envolvidos, a autofagia e a lipofagia, os modelos experimentais e as perspectivas terapêuticas atuais. O terceiro traz o artigo completo publicado. O quarto apresenta as considerações finais. E o último relaciona as referências bibliográficas utilizadas.

1.1 JUSTIFICATIVA

A MASLD representa, na atualidade, um dos maiores desafios da hepatologia clínica e da saúde pública mundial, em razão de sua elevada prevalência, do potencial evolutivo para formas graves de doença hepática e da limitada disponibilidade de opções terapêuticas farmacológicas plenamente validadas. A compreensão integrada de seus mecanismos

fisiopatológicos é, portanto, condição essencial para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas, prognósticas e terapêuticas mais eficazes.

Embora os mecanismos centrais da MASLD, incluindo a resistência insulínica, a lipotoxicidade, o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a inflamação e a fibrogênese, estejam relativamente bem caracterizados, aspectos relevantes da regulação epigenética da doença e dos processos de degradação lipídica intracelular, em particular a lipofagia, permanecem não completamente elucidados. Estudos pré-clínicos, capazes de avaliar simultaneamente a expressão de miRNAs circulantes e de marcadores moleculares envolvidos na lipofagia hepática, são ainda escassos e de grande relevância para o avanço do conhecimento nessa área.

A relação entre miRNAs e autofagia/lipofagia constitui-se como ponto de intersecção particularmente promissor, dado o potencial regulatório dos miRNAs sobre múltiplos componentes da maquinaria autofágica e lipofágica. A elucidação dessas interações pode contribuir para a identificação de biomarcadores não invasivos para diagnóstico e estratificação de risco, bem como para a definição de novos alvos terapêuticos.

O modelo experimental nutricional baseado em Dieta Hiperlipídica e Deficiente em Colina (HFCD, *high-fat and choline-deficient diet*, na sigla em inglês), previamente padronizado e validado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou capacidade de reproduzir as principais alterações histopatológicas, metabólicas e moleculares observadas na MASLD humana. Esse modelo oferece uma plataforma robusta para a investigação simultânea de mecanismos epigenéticos e da lipofagia, representando uma oportunidade única para a geração de evidências relevantes para o avanço do campo.

Por fim, o desenvolvimento desta tese contribui para a consolidação da pesquisa em hepatologia no Brasil, fortalecendo a inserção da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) como centros de referência na investigação científica sobre as doenças hepáticas crônicas. Os achados deste trabalho possuem potencial de colaborar para a construção de conhecimento aplicável tanto à prática clínica quanto ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com benefício direto para a saúde da população.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de miRNAs circulantes e de marcadores hepáticos relacionados ao processo de lipofagia em modelo experimental de MASH induzida por HFCD.

1.2.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar a expressão sérica dos miRNAs miR-34a, miR-21, miR-375, miR-26b e miR-155 em ratos *Sprague Dawley* submetidos a HFCD por 16 semanas, em comparação com animais alimentados com dieta padrão;
b) Avaliar a expressão hepática dos genes Sirt1, Lamp2, p62/Sqstm1, Tfeb, Rubicon, Cd36, Plin2, Plin3 e Plin5 nos animais dos grupos controle e intervenção;
c) Investigar a relação entre os achados histopatológicos (presença de esteatose, inflamação e fibrose) e a expressão dos miRNAs e dos marcadores hepáticos avaliados;
d) Explorar potenciais correlações entre os miRNAs circulantes e os marcadores moleculares hepáticos da lipofagia, com vistas à identificação de redes regulatórias relevantes para a progressão da MASLD;

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo apresenta a fundamentação teórica que sustenta o desenvolvimento da presente tese. Inicialmente, são abordados a definição, a evolução da nomenclatura, a epidemiologia e o espectro clínico da MASLD. Em seguida, discute-se a fisiopatologia da MASLD, incluindo a hipótese dos múltiplos golpes, o metabolismo lipídico hepático e os processos de inflamação e fibrogênese. Posteriormente, são revisados os mecanismos epigenéticos envolvidos na progressão da doença, com ênfase nos miRNAs. Na sequência, são tratados os processos de autofagia e lipofagia, com seus respectivos marcadores moleculares. Por fim, são discutidos os principais modelos experimentais utilizados no estudo da MASLD e as perspectivas terapêuticas atuais.

2.1 DOENÇA HEPÁTICA ESTEATÓTICA ASSOCIADA À DISFUNÇÃO METABÓLICA

2.1.1 Definição e evolução da nomenclatura

A nomenclatura da doença hepática esteatótica passou por significativas reformulações nas últimas décadas, refletindo o progresso do conhecimento sobre sua fisiopatologia. Inicialmente descrita por Ludwig e colaboradores em 1980 como Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA), essa condição foi por muito tempo definida pela exclusão do consumo significativo de álcool e pela ausência de outras causas conhecidas de doença hepática (20). Essa abordagem por exclusão originou a denominação Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA), termo que dominou a literatura científica e a prática clínica até recentemente.

Em 2020, um grupo internacional de especialistas propôs a substituição do termo DHGNA por doença hepática associada à disfunção metabólica (MAFLD, do inglês *Metabolic-Associated Fatty Liver Disease*), introduzindo critérios diagnósticos positivos baseados na presença de esteatose hepática associada a evidências de disfunção metabólica (21). Posteriormente, em 2023, um amplo consenso multidisciplinar - envolvendo a *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD), a *European Association for the Study of the Liver* (EASL) e a *Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado* (ALEH) - culminou na adoção da nova terminologia *Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease* (MASLD) (5). A correspondente forma inflamatória passou a ser denominada MASH (5).

A nova classificação tem como mérito o reconhecimento explícito do papel central das alterações metabólicas na patogênese da doença e a substituição de uma definição por exclusão por critérios diagnósticos positivos. Os critérios atuais para diagnóstico de MASLD exigem a presença de esteatose hepática associada a, pelo menos, um dos seguintes fatores de risco cardiometabólico: sobrepeso ou obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia (hipertrigliceridemia ou redução do HDL-colesterol) ou alterações da glicemia de jejum (5). A nomenclatura também contempla a sobreposição com o consumo moderado de álcool, denominada *Metabolic and Alcohol-Related Liver Disease* (MetALD), reconhecendo a frequente coexistência desses fatores na prática clínica.

Embora a transição terminológica seja relativamente recente, estudos demonstram que a maioria dos pacientes previamente classificados como portadores de DHGNA preenche os critérios diagnósticos para MASLD, o que assegura a continuidade do conhecimento previamente acumulado e a aplicabilidade dos achados de pesquisas anteriores ao novo paradigma diagnóstico (2,5). Ao longo desta tese, optou-se por utilizar a nomenclatura atualizada (MASLD/MASH), respeitando-se a terminologia original adotada nos estudos citados quando estritamente necessário.

2.1.2 Epidemiologia

A MASLD constitui-se atualmente como a hepatopatia crônica de maior prevalência mundial. Estimativas globais indicam uma prevalência de aproximadamente 25% na população adulta, com variações regionais expressivas (1). As taxas mais elevadas têm sido observadas nas regiões do Oriente Médio e da América do Sul, onde a prevalência ultrapassa 30%, ao passo que valores ligeiramente inferiores têm sido descritos em populações europeias e africanas (1,3). Esses dados refletem, em grande medida, as diferenças regionais nos fatores de risco metabólicos, especialmente nas taxas de obesidade e diabetes mellitus tipo 2.

No Brasil, embora dados epidemiológicos populacionais robustos sejam ainda limitados, estudos de coorte hospitalar e investigações em centros de referência sugerem prevalências comparáveis ou mesmo superiores às médias mundiais, o que se relaciona à transição nutricional, à urbanização acelerada e à crescente prevalência da obesidade e do diabetes na população brasileira (22). Estudo recentemente publicado também mostra a alta prevalência de MASLD na atenção primária em nosso país (23). Essa realidade reforça a

importância de estudos nacionais que abordem os mecanismos da doença em populações com características metabólicas e ambientais específicas.

As projeções para as próximas décadas são preocupantes. Estima-se que a prevalência da MASH aumente em até 56% nos próximos anos, com consequente elevação do número de casos de cirrose, doença hepática terminal e necessidade de transplante hepático (3). Adicionalmente, o impacto econômico decorrente do manejo clínico da doença e de suas complicações tende a ser substancial, especialmente em sistemas de saúde já onerados pelo crescimento das doenças crônicas não transmissíveis (2).

A MASLD é também a causa de doença hepática crônica que mais cresce como indicação de transplante hepático em adultos, tendo ultrapassado, em diversos países, a hepatite C crônica e a doença hepática alcoólica como principal etiologia listada (3). Adicionalmente, observa-se aumento expressivo na incidência do carcinoma hepatocelular relacionado à MASLD, frequentemente diagnosticado em estágios avançados em razão da menor adesão a programas de rastreamento, o que contribui para piores desfechos clínicos (1).

2.1.3 Espectro da doença

A MASLD caracteriza-se por um espectro evolutivo amplo, que abrange desde formas relativamente benignas até manifestações graves com elevada morbimortalidade (4). Em sua extremidade mais branda, encontra-se a esteatose hepática isolada, definida pela presença de acúmulo lipídico em mais de 5% dos hepatócitos, sem evidências histológicas significativas de inflamação ou lesão hepatocelular (5). Essa forma é, em geral, considerada de progressão lenta e relativamente baixo risco de evolução para fibrose avançada.

A progressão para MASH representa um ponto crítico no espectro da doença. Do ponto de vista histológico, a MASH caracteriza-se pela presença concomitante de esteatose, inflamação lobular e balonização hepatocitária, com ou sem fibrose (4,7). Trata-se da forma com maior potencial de progressão para fibrose hepática avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que cerca de 20% dos pacientes com MASH desenvolverão fibrose avançada ao longo de uma a duas décadas, dos quais uma fração substancial evoluirá para cirrose e suas complicações.

A fibrose hepática constitui-se como o principal preditor de desfechos clínicos adversos na MASLD, sendo correlacionada de forma independente com mortalidade global e mortalidade de causa hepática (4). Por sua vez, o carcinoma hepatocelular constitui-se como

complicação relevante da MASLD, podendo ocorrer mesmo na ausência de cirrose estabelecida, fenômeno este que é descrito com maior frequência nessa etiologia em comparação com outras doenças hepáticas crônicas (3). Esse aspecto traz desafios adicionais para a estratégia de rastreamento, dado que as recomendações tradicionais de vigilância por ultrassonografia abdominal e dosagem de alfafetoproteína são habitualmente direcionadas a pacientes cirróticos.

Cabe ressaltar, ainda, que a MASLD não se restringe a um problema hepático isolado, manifestando-se como entidade sistêmica com implicações cardiovasculares, oncológicas e metabólicas relevantes. A doença cardiovascular constitui, inclusive, a principal causa de óbito em pacientes com MASLD, superando a mortalidade decorrente das complicações hepáticas em diversas coortes (24). Tal observação reforça a necessidade de uma abordagem multidisciplinar e integrada no manejo clínico desses indivíduos.

2.2 FISIOPATOLOGIA DA MASLD

2.2.1 Hipótese dos múltiplos golpes

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da MASLD evoluiu substancialmente nas últimas décadas. Inicialmente, propôs-se a hipótese dos dois golpes, segundo a qual o acúmulo lipídico hepático (primeiro golpe) tornaria o fígado vulnerável a uma segunda agressão, geralmente o estresse oxidativo, levando à inflamação e à progressão para MASH (25). Essa hipótese, embora pioneira, mostrou-se simplificadora frente à complexidade da doença, e foi posteriormente substituída pela hipótese dos múltiplos golpes, proposta por Tilg e Moschen em 2010 (26).

A hipótese dos múltiplos golpes propõe que a MASLD resulta da ação concomitante e sinérgica de diversos fatores agressores, atuando paralelamente sobre o tecido hepático em indivíduos geneticamente suscetíveis. Entre esses fatores destacam-se a resistência insulínica, a obesidade visceral, as alterações na microbiota intestinal e na permeabilidade da barreira intestinal, os fatores genéticos e epigenéticos, o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, o estresse do retículo endoplasmático, a lipotoxicidade e a desregulação do tecido adiposo, entre outros (4,7,24).

A interação complexa entre esses fatores explica, em parte, a heterogeneidade clínica e histológica observada na MASLD, bem como a variabilidade na resposta a intervenções

terapêuticas. Essa visão integrada também justifica a busca por terapias multimodais, capazes de atuar simultaneamente em distintos pontos da cascata fisiopatológica (6).

Estudos recentes têm enfatizado o papel central do eixo intestino-fígado na progressão da MASLD. A disbiose intestinal, caracterizada por alterações na composição e na função da microbiota, está associada a aumento da permeabilidade intestinal, translocação de produtos bacterianos e ativação de receptores hepáticos da imunidade inata, com consequente amplificação da resposta inflamatória (18). Achados de nosso grupo de pesquisa têm corroborado esse modelo, demonstrando, em modelo experimental nutricional, alterações na composição da microbiota intestinal acompanhadas de aumento da expressão de marcadores de permeabilidade intestinal e de citocinas inflamatórias hepáticas (18).

2.2.2 Metabolismo lipídico hepático

O fígado desempenha papel central no metabolismo lipídico, sendo responsável pela síntese, armazenamento, oxidação e exportação de lipídios. Na MASLD, observa-se desequilíbrio entre os processos de captação, síntese e exportação de lipídios pelos hepatócitos, com consequente acúmulo de triacilgliceróis (TAG) na forma de gotículas lipídicas (27,16).

As principais fontes de ácidos graxos para o fígado incluem: a captação de ácidos graxos livres provenientes da lipólise do tecido adiposo (responsável por aproximadamente 60% dos TAG hepáticos em pacientes com MASLD), a lipogênese *de novo* a partir de carboidratos (cerca de 25%) e a captação de ácidos graxos provenientes da dieta (aproximadamente 15%) (28). A resistência insulínica, característica central da síndrome metabólica, contribui para o aumento de todas essas fontes, em particular pela falência da supressão da lipólise no tecido adiposo e pela ativação dos fatores de transcrição lipogênicos hepáticos, como o *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c* (SREBP-1c) (29).

As gotículas lipídicas, organelas dinâmicas envolvidas no armazenamento de TAG e ésteres de colesterol, são revestidas por proteínas da família das perilipinas (PLIN), que regulam o acesso de lipases e o tráfego intracelular dessas estruturas (27,30). A degradação dos TAG armazenados ocorre por dois mecanismos principais: a lipólise citosólica, mediada pela *Adipose Triglyceride Lipase* (ATGL) e pela *Hormone-Sensitive Lipase* (HSL), e a lipofagia, processo seletivo de autofagia (31,16) que será detalhadamente discutido na seção 2.4.

A oxidação dos ácidos graxos ocorre predominantemente nas mitocôndrias por meio da β-oxidação, com participação acessória dos peroxissomos e do retículo endoplasmático. A regulação desse processo envolve fatores de transcrição como o *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* (PPARα) e a Sirtuína 1 (SIRT1), os quais coordenam a expressão de genes envolvidos na captação, no transporte e na oxidação mitocondrial dos ácidos graxos (32). A disfunção desses reguladores tem sido implicada na patogênese da MASLD, contribuindo para o desbalanço entre síntese e oxidação lipídica.

A exportação de lipídios pelo fígado ocorre por meio da síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, na sigla em inglês). Em pacientes com MASLD, embora a produção de VLDL frequentemente esteja aumentada, ela é insuficiente para compensar o influxo elevado de ácidos graxos, resultando em acúmulo lipídico líquido. Adicionalmente, a sobrecarga de ácidos graxos pode levar à formação de espécies lipídicas tóxicas, como diacilgliceróis, ceramidas e ácidos graxos saturados livres, fenômeno conhecido como lipotoxicidade (4,7).

2.2.3 Inflamação e fibrogênese

A inflamação hepática constitui-se como elemento central na transição da esteatose simples para a MASH. Múltiplos mecanismos contribuem para o processo inflamatório, incluindo a lipotoxicidade direta sobre os hepatócitos, o estresse do retículo endoplasmático, a disfunção mitocondrial, a ativação de receptores da imunidade inata por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), bem como a translocação de produtos bacterianos provenientes do intestino (4,18).

A ativação das células de Kupffer, macrófagos residentes no fígado, desempenha papel fundamental na amplificação da resposta inflamatória, com produção de citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), a Interleucina-1 beta (IL-1β) e a Interleucina-6 (IL-6), além do recrutamento de células inflamatórias adicionais para o parênquima hepático (4). Adicionalmente, a ativação do inflamassoma NLRP3 nos hepatócitos e nas células de Kupffer tem sido implicada na progressão da MASH, contribuindo para a piroptose hepatocelular e para a amplificação da inflamação (18).

A balonização hepatocelular, achado histológico característico da MASH, reflete a ocorrência de lesão hepatocitária com acúmulo de queratinas e proteínas ubiquitinadas, frequentemente associadas a corpúsculos de Mallory-Denk. Esse fenômeno está relacionado à

disfunção do citoesqueleto, ao estresse oxidativo e à perda do equilíbrio proteostático celular (4).

A fibrogênese hepática, processo de deposição excessiva de matriz extracelular em resposta à lesão crônica, é mediada principalmente pelas Células Estreladas Hepáticas. Esse processo é desencadeado por sinais provenientes de hepatócitos lesados, células de Kupffer e células do sistema imune, incluindo o Fator de Crescimento Transformador beta (TGF-β) e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) (4,7).

A deposição progressiva de colágeno e outros componentes da matriz extracelular leva à distorção da arquitetura hepática, com formação de septos fibrosos, nódulos regenerativos e, eventualmente, cirrose. A fibrose hepática é um processo dinâmico e potencialmente reversível em estágios iniciais, o que justifica o intenso interesse em terapias antifibróticas como estratégia para modificar o curso natural da MASLD (6).

Os miRNAs e os mecanismos de autofagia, foco central desta tese, têm emergido como elementos cruciais na regulação dos processos inflamatórios e fibrogênicos da MASLD. Esses tópicos serão detalhadamente abordados nas seções subsequentes desta revisão.

2.3 EPIGENÉTICA E MASLD

2.3.1 Mecanismos epigenéticos

A epigenética é definida como o estudo das alterações fenotípicas hereditárias que não decorrem de modificações na sequência primária do DNA (8). Os principais mecanismos epigenéticos compreendem a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas, o remodelamento da cromatina e a regulação por RNAs não codificantes, incluindo os miRNAs. Esses mecanismos são responsáveis pela modulação dinâmica da expressão gênica em resposta a estímulos ambientais, configurando uma interface relevante entre fatores genéticos e ambientais na determinação dos fenótipos celulares (33,34).

Na MASLD, evidências crescentes indicam que fatores ambientais, como dieta hipercalórica, sedentarismo e exposição a poluentes, interagem com a suscetibilidade genética individual por meio de mecanismos epigenéticos, contribuindo para a heterogeneidade fenotípica observada na doença (8). A metilação do DNA, mecanismo mais extensamente estudado, envolve a adição de grupos metila a resíduos de citosina no contexto

de dinucleotídeos CpG, sendo classicamente associada ao silenciamento gênico quando ocorre em regiões promotoras (33).

Estudos sobre o metiloma hepático em pacientes com MASLD têm identificado padrões diferenciais de metilação em genes envolvidos na lipogênese, na oxidação de ácidos graxos e na resposta inflamatória (34). Notavelmente, alterações na metilação do gene PNPLA3, cuja variante I148M é o principal fator genético de risco para MASLD conhecido, têm sido associadas à progressão da doença, sugerindo a interação entre suscetibilidade genética e modulação epigenética (33).

As modificações pós-traducionais das histonas, incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, também desempenham papéis relevantes na regulação da expressão gênica hepática. A acetilação de histonas, regulada pelo equilíbrio entre Histona Acetiltransferases (HATs) e Histona Desacetilases (HDACs), está particularmente implicada na MASLD. As sirtuínas, classe III de HDACs dependentes de NAD+, têm papel central na regulação do metabolismo lipídico hepático (35) e serão discutidas com mais detalhe na seção 2.4.

Entre os RNAs não codificantes, os miRNAs destacam-se pela sua estabilidade e pela ampla disponibilidade em fluidos biológicos como o soro, o plasma e a saliva, conferindo-lhes potencial como biomarcadores não invasivos para o diagnóstico e o monitoramento da MASLD (9,36). Sua função regulatória pós-transcricional, exercida principalmente por meio do silenciamento ou da degradação de RNAs mensageiros, posiciona-os como peças-chave na compreensão dos mecanismos epigenéticos da doença (33).

2.3.2 MicroRNAs na MASLD

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante, com aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos, que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente (9). Cada miRNA pode regular múltiplos mRNAs, e cada mRNA pode ser regulado por múltiplos miRNAs, conferindo uma rede complexa de regulação que abrange virtualmente todos os processos biológicos celulares (37).

Na MASLD, diversos miRNAs têm sido implicados em múltiplos aspectos da fisiopatologia da doença, incluindo a lipogênese, a oxidação de ácidos graxos, a resposta inflamatória, a apoptose, a fibrogênese e a hepatocarcinogênese (9,10,38). Adicionalmente, sua estabilidade em circulação, assegurada pela associação a vesículas extracelulares,

complexos lipoproteicos e proteínas ligantes, torna-os potenciais biomarcadores para uso na prática clínica (39). Os principais miRNAs estudados no contexto da MASLD, incluindo aqueles avaliados na presente tese, são descritos a seguir.

2.3.2.1 miR-34a

O miR-34a é um dos miRNAs mais consistentemente associados à MASLD em estudos clínicos e experimentais (39,38,36). Localizado no cromossomo 1p36 em humanos, o miR-34a é classicamente reconhecido como alvo direto do supressor tumoral p53, sendo induzido em resposta a diversos estresses celulares, incluindo dano ao DNA, estresse oxidativo e lipotoxicidade (40).

Na MASLD, a expressão do miR-34a encontra-se elevada tanto no tecido hepático quanto no soro de pacientes com MASH, com correlação positiva com o grau de esteatose, inflamação e fibrose hepática (39,36). Entre seus alvos diretos destacam-se a SIRT1 e o PPARα, ambos reguladores centrais do metabolismo lipídico hepático e da oxidação de ácidos graxos. A inibição desses alvos pelo miR-34a contribui para a redução da β-oxidação mitocondrial e para o agravamento da esteatose, configurando um circuito patogênico relevante (41).

Estudos têm proposto o miR-34a como biomarcador diagnóstico promissor para a MASH, com desempenho comparável ou superior a marcadores séricos tradicionais como aminotransferases e citoqueratina-18 (36). Adicionalmente, estratégias terapêuticas baseadas em antagonistas do miR-34a têm sido investigadas em modelos pré-clínicos, com resultados encorajadores em termos de redução da esteatose e da inflamação hepática (32).

2.3.2.2 miR-21

O miR-21 é um dos miRNAs mais estudados em diversas patologias humanas, incluindo câncer, fibrose tecidual e doenças metabólicas (42). Sua expressão hepática é induzida por ácidos graxos insaturados, lipopolissacarídeos e citocinas inflamatórias, configurando-o como um miRNA responsivo a diversos estímulos relacionados à MASLD (42,43).

Na MASLD, o miR-21 contribui para o acúmulo lipídico, a inflamação hepática e a fibrose, atuando sobre múltiplos alvos, incluindo o p53 e o SREBP-1c (29). A ablação do miR-21 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica resulta em redução da lipogênese *de novo* e da esteatose, com melhora dos parâmetros bioquímicos e histológicos da doença (43,29,44). Adicionalmente, o miR-21 desempenha papel importante na

hepatocarcinogênese associada à MASH, promovendo a sobrevivência celular e a invasão tumoral (29,12).

Apesar do crescente corpo de evidências, a utilização do miR-21 como biomarcador diagnóstico precoce da MASLD ainda apresenta resultados conflitantes, com variabilidade entre estudos atribuída a diferenças metodológicas, estágios da doença avaliados e características populacionais (42). Esses aspectos requerem investigações adicionais antes da translação para a prática clínica.

2.3.2.3 miR-375

O miR-375, originalmente descrito em ilhotas pancreáticas, está envolvido na regulação da secreção de insulina e na homeostase glicêmica (13). No fígado, sua expressão tem sido associada à modulação da resposta inflamatória e à carcinogênese hepatocelular, embora seu papel específico na MASLD permaneça menos esclarecido em comparação com miR-34a e miR-21.

Estudos demonstraram que o miR-375 atua como supressor tumoral em diversos contextos oncológicos, incluindo o carcinoma hepatocelular, onde sua expressão encontra-se reduzida em comparação com tecido hepático não tumoral (13). Sua relação com o processo inflamatório e o recrutamento celular sugere participação na progressão da MASLD, embora os dados disponíveis sejam ainda preliminares.

2.3.2.4 miR-26b

O miR-26b participa da regulação da sensibilidade à insulina e do metabolismo de glicose e lipídios, atuando sobre múltiplos genes-alvo envolvidos nessas vias (45). Adicionalmente, o miR-26 (incluindo as variantes a e b) tem sido implicado na modulação da quimiossensibilidade e da apoptose em células de carcinoma hepatocelular, por meio da inibição da autofagia (14).

Na MASLD, a expressão do miR-26b parece variar conforme o estágio da doença, com resultados não plenamente consistentes entre estudos. A regulação cruzada entre o miR-26b e o miR-21, observada em outros contextos biológicos, inclusive em resposta ao estresse psicológico (46), sugere a possibilidade de mecanismos regulatórios compartilhados que merecem investigação adicional.

2.3.2.5 miR-155

O miR-155 é classicamente reconhecido por seu papel central na regulação da resposta imune, atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Na MASLD, sua expressão hepática tem sido associada à ativação de células de Kupffer e ao estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório, com possível contribuição para a progressão da esteatose para MASH (47).

Achados em modelos murinos sugerem que a depleção do miR-155 pode atenuar a esteatose induzida por dieta hiperlipídica, embora outros estudos tenham reportado efeitos opostos, configurando um cenário de complexidade biológica que reflete a dependência contextual da função regulatória dos miRNAs. Sua expressão também tem sido investigada como biomarcador prognóstico em pacientes com cirrose e insuficiência hepática crônica agudizada (48).

2.3.2.6 Outros miRNAs relevantes

Além dos miRNAs avaliados na presente tese, outros miRNAs têm sido implicados na MASLD, configurando um campo de investigação dinâmico e em rápida expansão. Entre eles, destacam-se o miR-122, que é o miRNA mais abundante no fígado, com papel central na regulação do metabolismo de colesterol e ácidos graxos, o miR-192 e o miR-29, ambos envolvidos na resposta inflamatória e na fibrogênese (9). A complexidade das redes regulatórias mediadas por miRNAs e sua interação com outros mecanismos epigenéticos e moleculares justificam o crescente interesse científico nesse campo.

A regulação cruzada entre miRNAs e a autofagia constitui-se como tema de particular relevância para a presente tese, pois diversos miRNAs atuam como reguladores de genes envolvidos na maquinaria autofágica e na homeostase lipídica celular (14,49,50). Essa interface será detalhada na próxima seção, dedicada à autofagia e à lipofagia.

2.4 AUTOFAGIA E LIPOFAGIA

2.4.1 Mecanismos moleculares da autofagia

A autofagia é um processo evolutivamente conservado de degradação intracelular, no qual componentes citoplasmáticos, incluindo proteínas malformadas, organelas danificadas e agregados proteicos, são englobados em vesículas de dupla membrana (autofagossomos) e direcionados aos lisossomos para degradação e reciclagem (51,52). Esse mecanismo é fundamental para a manutenção da homeostase celular, particularmente em condições de estresse, e tem implicações relevantes em diversos processos fisiológicos e patológicos,

incluindo o envelhecimento, a defesa contra patógenos, o controle de qualidade proteica e a regulação metabólica.

Três formas principais de autofagia foram descritas em células de mamíferos: a macroautofagia (frequentemente denominada simplesmente autofagia), a microautofagia e a Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA, na sigla em inglês) (52). A macroautofagia é o tipo mais estudado e envolve a formação de autofagossomos a partir de uma estrutura precursora denominada fagóforo, que se expande e engloba o material citoplasmático destinado à degradação. A microautofagia caracteriza-se pela invaginação direta da membrana lisossomal, sem formação de autofagossomos intermediários. A CMA, por sua vez, é altamente seletiva e depende do reconhecimento de proteínas-alvo contendo o motivo KFERQ pela chaperona HSC70, com translocação subsequente através do receptor *Lysosome-associated membrane protein 2* (LAMP2A) na membrana lisossomal (53).

A maquinaria molecular da macroautofagia é coordenada por um conjunto de genes relacionados à autofagia (ATGs, na sigla em inglês), inicialmente identificados em leveduras e amplamente conservados em organismos superiores (54). Mais de 40 genes ATG já foram caracterizados, sendo que cerca de 18 deles compõem a maquinaria central, organizada em complexos funcionais distintos: o complexo ULK1, responsável pela iniciação do processo; o complexo PI3K classe III, envolvido na nucleação do fagóforo; e os sistemas de conjugação ATG12-ATG5-ATG16L1 e LC3-PE, essenciais para a expansão e o fechamento do autofagossomo (52).

A regulação da autofagia ocorre em múltiplos níveis, sendo a via mTOR (Alvo da Rapamicina em Mamíferos, na sigla em inglês) um dos principais reguladores negativos. Em condições de abundância nutricional, o complexo mTORC1 fosforila o ULK1 e impede a iniciação da autofagia. Em situações de privação nutricional ou estresse, a inibição do mTORC1, frequentemente via ativação da *AMP-activated Protein Kinase* (AMPK), desencadeia a ativação da maquinaria autofágica (54). Adicionalmente, fatores de transcrição como o Fator de Transcrição EB (TFEB, na sigla em inglês) coordenam a indução transcricional dos genes ATG e dos genes lisossomais, integrando a autofagia com a biogênese e a função lisossomal (55).

Polimorfismos em genes ATG têm sido associados a aumento da suscetibilidade a doenças hepáticas. Variantes raras no gene ATG7, identificadas em estudos populacionais robustos, conferem risco aumentado para doença hepática gordurosa avançada, reforçando o papel da autofagia na patogênese da MASLD (56). De modo análogo, variantes no gene

Immunity-related GTPase M (IRGM) modulam a lipofagia e influenciam a suscetibilidade individual à DHGNA (57).

2.4.2 Lipofagia: definição e regulação

A lipofagia, descrita pioneiramente por Singh e colaboradores em 2009, é uma forma seletiva de autofagia em que gotículas lipídicas são reconhecidas, englobadas por autofagossomos e direcionadas aos lisossomos, onde os TAG armazenados são hidrolisados pela lipase ácida lisossomal, com liberação de ácidos graxos livres (58). Esse processo desempenha papel central na manutenção da homeostase lipídica hepática, complementando a lipólise citosólica como mecanismo de mobilização de lipídios armazenados (16).

A relevância da lipofagia para a MASLD decorre da observação de que o bloqueio desse processo promove o acúmulo intracelular de lipídios nos hepatócitos, ao passo que sua estimulação favorece a depuração das gotículas lipídicas e atenua a esteatose hepática (15,17,59). Estudos em modelos murinos têm demonstrado que a indução da lipofagia, seja por intervenções farmacológicas ou nutricionais, está associada à redução da esteatose, da inflamação e da fibrose hepática, configurando-a como alvo terapêutico promissor (17,11).

Os mecanismos de reconhecimento das gotículas lipídicas pela maquinaria autofágica envolvem proteínas adaptadoras específicas, incluindo o p62/SQSTM1, que reconhece substratos ubiquitinados, e proteínas da família das perilipinas, que regulam o acesso de lipases e a interação com autofagossomos (60,55). A regulação da lipofagia integra-se aos circuitos hormonais e metabólicos do organismo, sendo modulada por sinais nutricionais, status energético celular e mediadores hormonais, em particular pela via SIRT1-PGC1α-PPARα (61,35).

Apesar dos avanços recentes, o quadro completo dos mecanismos pelos quais a lipofagia anormal contribui para a MASLD permanece incompletamente elucidado, configurando uma fronteira ativa de investigação científica (62,11). A caracterização dos marcadores moleculares da lipofagia em modelos experimentais e em amostras humanas tem se mostrado essencial para o avanço desse campo, e constitui-se como objeto central da presente tese.

2.4.3 Marcadores moleculares da lipofagia

A avaliação da lipofagia em estudos experimentais é tipicamente conduzida por meio da análise da expressão e da função de diversos marcadores moleculares, cada um deles

representando um aspecto específico do processo. A seguir, são descritos os principais marcadores avaliados na presente tese, organizados por categoria funcional.

2.4.3.1 Sirtuína 1 (SIRT1)

As sirtuínas constituem-se como uma família de desacetilases dependentes de NAD+, com sete membros descritos em mamíferos (SIRT1 a SIRT7), apresentando localizações subcelulares e funções distintas. A SIRT1, predominantemente nuclear, regula múltiplos aspectos do metabolismo lipídico hepático, da resposta ao estresse oxidativo e da inflamação, tendo sido proposta como exercendo papel protetor contra a MASLD (35,61).

A SIRT1 desacetila e ativa fatores de transcrição como o PPARα e o PGC-1α, promovendo a expressão de genes envolvidos na β-oxidação mitocondrial e na biogênese mitocondrial (61). Adicionalmente, a SIRT1 desacetila e estabiliza o p62/SQSTM1, contribuindo para a regulação da autofagia e da lipofagia (63). A ATGL promove a lipofagia via SIRT1, configurando um circuito funcional integrado entre lipólise e autofagia (31).

A redução da expressão e da atividade de SIRT1 tem sido consistentemente descrita em modelos experimentais e em amostras de pacientes com MASLD, com correlação inversa com a gravidade histológica da doença (35). A indução do miR-34a, frequente na MASLD, pode contribuir para a supressão da SIRT1, configurando um circuito patogênico relevante (41).

2.4.3.2 p62/Sequestossoma-1 (p62/SQSTM1)

A proteína p62/SQSTM1 (*sequestosome-1*) é um receptor seletivo para macroautofagia, atuando como adaptador entre substratos ubiquitinados e a maquinaria autofágica por meio da ligação a LC3 (51). A p62/SQSTM1 é substrato da própria autofagia, sendo continuamente degradada quando o fluxo autofágico está ativo, e seu acúmulo é classicamente interpretado como indicador de bloqueio do fluxo autofágico (60).

Na MASLD, observações experimentais têm sido divergentes quanto à expressão de p62/SQSTM1. A deleção de p62/SQSTM1 promove obesidade induzida por hiperfagia, resistência insulínica, intolerância à glicose e esteatose hepática (64), evidenciando seu papel protetor contra alterações metabólicas. Por outro lado, a redução de p62/SQSTM1 também tem sido descrita em modelos de MASH, sugerindo *impairment* do fluxo autofágico em estágios avançados (59). Sahani e colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de p62/SQSTM1 nem sempre se correlaciona inversamente com a atividade autofágica, sendo o

processo influenciado por alterações transcricionais e pela disponibilidade de aminoácidos (65).

A regulação de p62/SQSTM1 envolve múltiplos níveis, incluindo a transcrição mediada pelo fator NRF2 e a regulação pós-transcricional por miRNAs, particularmente miR-372 e miR-100 (63,50). A interação entre p62/SQSTM1 e SIRT1, com desacetilação e estabilização recíprocas, configura ainda outro nível de complexidade regulatória relevante para a hepatocarcinogênese (63).

No contexto específico da lipofagia, p62/SQSTM1 tem sido descrita como essencial para a degradação autofágica de gotículas lipídicas, ao menos em modelos in vitro de exposição ao etanol (60). A redução da expressão de p62/SQSTM1, observada em modelos de MASH, pode contribuir para o acúmulo de lipofagossomos não maturados, comprometendo a depuração lipídica hepática.

2.4.3.3 Fator de Transcrição EB (TFEB)

O TFEB é o regulador mestre da biogênese lisossomal e da função autofágica, coordenando a expressão de genes que codificam proteínas lisossomais e componentes da maquinaria autofágica (55). Em condições basais, o TFEB localiza-se predominantemente no citoplasma, sendo retido nesse compartimento por fosforilação dependente do mTORC1. Em situações de privação nutricional, estresse lisossomal ou inibição do mTORC1, o TFEB é desfosforilado e translocado para o núcleo, onde induz a transcrição de seus genes-alvo (55).

Na regulação do metabolismo lipídico, o TFEB exerce papel crítico ao promover a lipofagia e a oxidação de ácidos graxos, integrando a função lisossomal com a homeostase metabólica celular (15,16). A indução do TFEB tem sido associada à atenuação da esteatose hepática em modelos murinos, e agonistas farmacológicos do TFEB, incluindo a digoxina e a ikarugamicina, emergem como candidatos terapêuticos para distúrbios metabólicos como a obesidade e a MASLD (55).

Estudos recentes têm demonstrado aumento da expressão de TFEB em modelos de MASH, fenômeno interpretado como resposta adaptativa ao estresse lisossomal e à sobrecarga lipídica (66). Esse aumento pode ser interpretado como tentativa compensatória de restaurar a homeostase lipídica, embora insuficiente diante da progressão da doença, e justifica o interesse em estratégias terapêuticas que potencializem essa resposta.

2.4.3.4 Perilipinas (PLIN2, PLIN3, PLIN5)

As perilipinas constituem-se como uma família de cinco proteínas (PLIN1 a PLIN5) que revestem a superfície das gotículas lipídicas e regulam o acesso de lipases, o tráfego intracelular dessas estruturas e sua interação com a maquinaria autofágica (27). Cada membro da família apresenta padrão de expressão tecidual específico e funções parcialmente distintas, com particular relevância para o fígado das isoformas PLIN2, PLIN3 e PLIN5 (67,68).

A PLIN2 é o membro mais abundante da família nas células hepáticas em condições de esteatose, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes (27,30,67). Sua expressão correlaciona-se com a gravidade da lesão hepática, e modelos experimentais com deficiência de PLIN2 têm demonstrado redução do conteúdo de TAG hepático, atenuação da inflamação e redução da fibrose, configurando essa proteína como alvo terapêutico promissor para a MASH (67,69). A degradação de PLIN2 e PLIN3 pela CMA é etapa pré-requisito para a ocorrência da lipólise (53).

A PLIN3 tem sido descrita como necessária para o recrutamento de proteínas envolvidas na lipofagia, com a estimulação desse mecanismo possivelmente contribuindo para a proteção hepática e configurando-se como estratégia terapêutica para a MASLD. A via mTORC1-PLIN3 desempenha papel essencial na ativação da lipofagia e na proteção contra a hepatosteatose (70).

A PLIN5 é expressa em tecidos altamente oxidativos e representa resposta precoce à captação excessiva de lipídios pelos hepatócitos (66,68). Apresenta papel central na regulação da lipofagia e da oxidação de ácidos graxos por meio da SIRT1. A PLIN5 transloca-se ao núcleo e promove a regulação transcricional da SIRT1, contribuindo para o aumento da expressão de genes-alvo que controlam a biogênese mitocondrial, o metabolismo oxidativo e a lipofagia (27). A deleção de PLIN5 confere proteção contra a lesão hepática na MASLD por meio da redução da ativação do inflamassoma (68).

2.4.3.5 Lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2)

A proteína LAMP2 é um componente integral da membrana lisossomal, com funções essenciais na manutenção da integridade lisossomal e na fusão entre autofagossomos e lisossomos. A isoforma LAMP2A é especificamente requerida para a CMA, atuando como receptor para o reconhecimento e a translocação de proteínas-alvo (53).

Os achados na literatura sobre a expressão de LAMP2A em modelos de MASLD são heterogêneos. Em estudos com modelos experimentais de doença mais avançada, observa-se redução da expressão de LAMP2A, com consequente comprometimento da CMA. Em

estágios iniciais da doença, no entanto, alterações significativas podem não ser detectadas, refletindo a dependência temporal e contextual desses processos (71,72).

2.4.3.6 RUBICON

A proteína RUBICON (*Run domain Beclin-1-Interacting and Cysteine-Rich-Containing Protein*) atua como regulador negativo da fusão entre autofagossomos e lisossomos, modulando o fluxo autofágico (73,74). Estudos têm demonstrado elevação da expressão de RUBICON em amostras hepáticas de pacientes com MASLD, sugerindo que essa proteína contribui para a redução da autofagia observado na doença (74). A inibição da RUBICON tem sido proposta como estratégia para restaurar o fluxo autofágico e atenuar a progressão da MASLD.

2.4.3.7 CD36

O CD36 (Cluster de Diferenciação 36) é um receptor multifuncional envolvido na captação de ácidos graxos de cadeia longa pelos hepatócitos, com expressão induzida por estímulos lipídicos e inflamatórios. Sua superexpressão hepática contribui para o acúmulo lipídico e tem sido associada à progressão da MASLD, embora seu papel direto na regulação da lipofagia seja ainda pouco caracterizado (7).

Estudos experimentais têm demonstrado que a inibição do CD36 atenua a esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica, reforçando seu potencial como alvo terapêutico (75). A correlação entre CD36 e marcadores de autofagia/lipofagia, embora não plenamente estabelecida, sugere a integração entre os processos de captação lipídica e mobilização autofágica.

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE MASLD

Os modelos experimentais desempenham papel fundamental na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da MASLD e na avaliação de potenciais alvos terapêuticos, permitindo a investigação de aspectos da doença que seriam de difícil ou impossível abordagem em estudos clínicos (19,18). Esses modelos podem ser classificados, de modo geral, em três grandes categorias: modelos nutricionais (induzidos por dieta), modelos genéticos e modelos farmacológicos, frequentemente combinados em estratégias mistas para reproduzir mais fielmente a complexidade da doença em humanos.

Os modelos nutricionais constituem-se como os mais amplamente utilizados, em razão de sua relevância translacional e da reprodutibilidade dos achados histopatológicos e moleculares. Entre as dietas comumente empregadas, destacam-se a Dieta Hiperlipídica (HFD, na sigla em inglês), a Dieta Deficiente em Metionina e Colina (MCD, na sigla em inglês), a Dieta Hiperlipídica e Deficiente em Colina (HFCD, na sigla em inglês), empregada na presente tese, e a dieta ocidental (*Western-style diet*), rica em frutose, sacarose e gorduras saturadas (19,18).

A HFCD, especificamente, tem demonstrado capacidade de induzir alterações metabólicas e histopatológicas que mimetizam de modo robusto a MASLD humana, incluindo deposição de gordura corporal e hepática, ativação de receptores e mediadores inflamatórios, além de inflamação histológica, balonização hepatocelular e deposição de fibras colágenas (18,76). Esses achados têm sido replicados em diferentes laboratórios e validados por múltiplas técnicas moleculares e histopatológicas, conferindo confiabilidade aos dados obtidos com este modelo.

Modelos genéticos, por sua vez, exploram alterações específicas em genes envolvidos no metabolismo lipídico, na sinalização da insulina ou na resposta inflamatória. Camundongos ob/ob, deficientes em leptina, e camundongos db/db, deficientes no receptor de leptina, são exemplos clássicos que desenvolvem obesidade, diabetes e esteatose hepática espontaneamente. Modelos mais recentes incluem animais *knockout* para genes da maquinaria autofágica (como o ATG7) ou da família das perilipinas (PLIN2, PLIN5), que permitem investigar de forma específica o papel desses elementos na patogênese da MASLD (67,68).

As limitações dos modelos experimentais incluem diferenças metabólicas entre roedores e humanos, variabilidade temporal na progressão da doença e, em alguns casos, perda de peso corporal incompatível com a apresentação clínica humana, como ocorre tipicamente com a dieta MCD (19). A escolha do modelo deve, portanto, ser orientada pelas questões científicas específicas de cada estudo, e a integração de múltiplos modelos pode ser necessária para uma compreensão abrangente da doença.

No presente estudo, optou-se pelo modelo nutricional baseado em HFCD por 16 semanas, conforme protocolo previamente padronizado e validado em nosso grupo de pesquisa (18,76,77). Esse modelo demonstrou-se adequado para a indução de alterações histopatológicas compatíveis com a MASH humana, incluindo inflamação, balonização e deposição intensa de fibras colágenas, além de alterações metabólicas e cardiovasculares

relevantes, permitindo a investigação integrada dos mecanismos epigenéticos e da lipofagia, conforme proposto nesta tese (76,18,77).

2.6 PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

O manejo atual da MASLD permanece centrado em intervenções no estilo de vida, incluindo perda ponderal, atividade física regular e adequações dietéticas, e no tratamento das comorbidades metabólicas associadas, como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial. Apesar dos avanços recentes, até o presente momento poucas terapias farmacológicas específicas para a MASH foram aprovadas por agências regulatórias internacionais (4,6,7). Entre os medicamentos aprovados, destacam-se o Resmetirom e a Semaglutida. Ambos receberam aprovação condicional da agência reguladora americana (FDA, do inglês *Foods and Drugs Administration*) para o tratamento de MASH F2/F3 e aguardam ainda os desfechos hepáticos e cardiovasculares de longo prazo para a aprovação definitiva (78,79). Salienta-se, entretanto, que ambos os medicamentos têm efeito limitado, custo alto e dificuldade de acesso, o que justifica o seguimento de estudos com novas moléculas.

Os alvos terapêuticos atualmente investigados podem ser classificados de acordo com os mecanismos fisiopatológicos abordados. Entre os principais, destacam-se: (i) modulação do metabolismo glicêmico e da resistência insulínica, com destaque para os análogos do receptor GLP-1 (Semaglutida), os agonistas duplos GLP-1/GIP (Tirzepatida), agonistas duplos GLP-1/Glucagon (Survodutida), e os agonistas triplos GLP-1/GIP/Glucagon (Retatrutida); (ii) modulação do metabolismo lipídico hepático, com agonistas dos receptores PPAR (alfa, gama, delta) como o Lanifibranor e inibidores da síntese *de novo* de ácidos graxos (como inibidores da acetil-CoA carboxilase e da sintase de ácidos graxos); (iii) terapias antifibróticas, incluindo inibidores de quimiocinas, antagonistas dos receptores de TGF-β, modificadores da matriz extracelular, e os análogos FGF-21 (Pegozafermina, Efruxifermina e Efimosfermina); (iv) um oligonucleotídeos antissenso contra PNPLA3 (AZD2693); (v) modulação da sinalização de ácidos biliares, especialmente por agonistas do receptor FXR (como o ácido obeticólico); e (vi) modulação do eixo intestino-fígado, com prebióticos, probióticos, simbióticos, transplante de microbiota fecal e antibióticos não absorvíveis (4,6,77,80).

No campo das intervenções epigenéticas, terapias baseadas em miRNAs, incluindo antagonistas (antagomirs) e mímicos (miRNA mimics), têm sido extensamente investigadas

em modelos pré-clínicos. A inibição do miR-21, em particular, tem mostrado efeitos protetores significativos em modelos murinos de MASLD, embora a translação para a prática clínica ainda apresente desafios relacionados à entrega seletiva, à estabilidade in vivo e a potenciais efeitos *off-target* (43,29,44).

Estratégias direcionadas à modulação da autofagia e da lipofagia constituem uma fronteira terapêutica em rápida expansão. A indução farmacológica do TFEB, mediante o uso de agonistas como a digoxina e a ikarugamicina, tem demonstrado capacidade de atenuar alterações metabólicas em modelos murinos e estender a longevidade em organismos modelo, como o *Caenorhabditis elegans* (55). Adicionalmente, abordagens nutricionais, como o jejum intermitente, a restrição calórica e dietas específicas, exercem efeitos benéficos sobre a autofagia hepática e podem complementar as intervenções farmacológicas (17,11).

A modulação direta de proteínas envolvidas na lipofagia, como as perilipinas, também vem ganhando destaque. A redução da expressão de PLIN2 mediante terapias específicas tem sido investigada como estratégia para atenuação da esteatose, e modelos experimentais com deleção tecido-específica dessa proteína têm reforçado seu potencial como alvo terapêutico (67,27).

No cenário brasileiro, achados recentes do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o potencial de intervenções como a rifaximina, antibiótico não absorvível com ação sobre a microbiota intestinal, na modulação de mecanismos epigenéticos e autofágicos em modelo experimental de carcinoma hepatocelular secundário à MASLD (77), bem como do aspartato de ornitina em MASLD experimental (81,82,83). Esses resultados reforçam a relevância da abordagem multidirecional, considerando o eixo intestino-fígado como elemento integrante das estratégias terapêuticas para a MASLD.

Apesar do considerável progresso observado nos últimos anos, a tradução dos achados experimentais para a prática clínica permanece desafiadora. A heterogeneidade fenotípica e genotípica da MASLD, a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e as limitações inerentes aos modelos experimentais constituem-se como obstáculos relevantes que demandam abordagens integrativas e personalizadas. Estudos pré-clínicos rigorosos, como o presente trabalho, são fundamentais para a identificação e validação de novos alvos e biomarcadores que possam, futuramente, contribuir para o avanço terapêutico nessa área.

3 ARTIGO

Title: Lipophagy and epigenetic alterations are related to metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease progression in an experimental model

Publication: World Journal of Hepatology

Date: 2024 December 27

DOI: 10.4254/wjh.v16.i12.1468

Abstract

Background: Genetic and epigenetic alterations are related to metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) pathogenesis. Aim: To evaluate micro (mi)RNAs and lipophagy markers in an experimental model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). **Methods**: Adult male Sprague Dawley rats were randomized into two groups: Control group (n = 10) fed a standard diet; and intervention group (n = 10) fed a high-fat-choline-deficient diet for 16 weeks. Molecular evaluation of lipophagy markers in liver tissue [sirtuin-1, p62/sequestosome-1, transcription factor-EB, perilipin-2 (Plin2), Plin3, Plin5, lysosome-associated membrane proteins-2, rubicon, and Cd36], and serum miRNAs were performed. **Results**: Animals in the intervention group developed MASH and showed a significant decrease in sirtuin-1 ($P = 0.020$) and p62/sequestosome-1 ($P < 0.001$); the opposite was reported for transcription factor-EB ($P = 0.020$), Plin2 ($P = 0.003$), Plin3 ($P = 0.031$), and Plin5 ($P = 0.005$) compared to the control group. There was no significant difference between groups for lysosome-associated membrane proteins-2 ($P = 0.715$), rubicon ($P = 0.166$), and Cd36 ($P = 0.312$). The intervention group showed a significant increase in miR-34a ($P = 0.005$) and miR-21 ($P = 0.043$) compared to the control. There was no significant difference between groups for miR-375 ($P = 0.905$), miR-26b ($P = 0.698$), and miR-155 ($P = 0.688$). **Conclusion**: Animals with MASH presented expression changes in markers related to lysosomal stress and autophagy as well as in miRNAs related to inflammation and fibrogenesis, processes that promote MASLD progression.

Key words: Animal model; Epigenetic; Lipophagy; MicroRNAs; Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis

INTRODUCTION

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) is a multifactorial pathology involving genetic, metabolic, and environmental factors and is closely related with metabolic syndrome, obesity, and type 2 diabetes[1]. MASLD encompasses a spectrum of diseases from isolated steatosis to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH), which can progress to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma[1]. The incidence and prevalence of MASLD are rapidly rising worldwide[2]. Its global prevalence is approximately 25%, with the highest rates being present in the Middle East and South America[3,4]. Additionally, some studies predict that the prevalence of MASH will increase by up to 56% in the coming years, which will lead to an augmentation in cirrhosis case numbers, end-stage liver disease, and liver transplant in addition to a significant economic impact[2,4].

Although there has been progress in understanding the underlying factors related to the pathogenesis of the disease, its mechanisms are not fully elucidated[5,6]. In recent years, epigenetics, which explores the mechanisms by which phenotypes are altered through non-DNA sequence variation, has become the target of studies[7]. Also, micro (mi)RNAs[7] and dysregulated autophagy[8] can influence progression. Several miRNAs, such as miR-34a, miR-375, miR-26b, miR-21, and miR-155, are involved in the modulation of autophagy and can influence the expression or suppression of genes responsible for worsening liver damage through *de novo* lipogenesis, inflammatory processes, proapoptotic mechanisms, and cell death, leading to the progression of liver injury to hepatocellular carcinoma[9-12]. However, the relationship between miRNAs and autophagy in MASLD remains unclear[12].

Lipophagy, a specific form of autophagy in which lipid droplets are first engulfed by autophagosomes and next degraded in lysosomes, specifically aims to eliminate excess lipids in the liver and maintain lipid homeostasis in cells[5,8]. It is known that the blockage of lipophagy promotes the accumulation of hepatocellular lipids, and its activation causes the clearance of hepatocellular lipid droplets[8]. However, these mechanisms are not fully understood, and promoting lipophagy may be an effective strategy in preventing or delaying MASLD progression[5,8,13].

There is currently no fully approved therapy for MASH by any regulatory agency. However, several clinical protocols are being implemented directing the treatment to specific liver targets, such as hepatocyte dysregulation and inflammation pathways associated with

fibrosis in addition to extrahepatic targets, which include the gut-liver signaling axis[1,14]. Therefore, experimental models play a fundamental role in the evaluation of the pathophysiological mechanisms related with the evolution of MASLD and in the evaluation of possible therapeutic targets[15,16]. Therefore, this study aimed to evaluate epigenetic alterations and the mechanisms of autophagy involved in the lipophagy process in an experimental model of MASH mimicking metabolic abnormalities found in humans.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ethical procedures

Twenty adult (60-day-old) male Sprague Dawley rats weighing 280-350 g were included in this MASLD experimental study. Rats were maintained on a standard 12-h light-dark cycle in a temperature-controlled environment (22 ± 2 °C). The animals were housed in polypropylene cages with sawdust-lined flooring. The Institutional Ethics Committee approved all experiments and procedures for the use of animals (protocol number: 2022-0117). The procedures for the use of scientific animals were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th ed, 2011) and law No. 11.794 (Brazil, 2008).

Study design and experimental diet

After becoming accustomed to the laboratory, the animals were randomized by weight into two groups, as described in a previous publication[15]: A control group (n = 10) received standard diet (Nuvilab CR-1; Quimtia SA, Colombo, Brazil); and an intervention group (n = 10) received a high-fat and choline-deficient (HFCD) diet, consisting of 31.5% total fat and enriched with 54.0% trans fatty acids (Rhoster Ltda, Sao Paulo, Brazil) for MASH induction. Both groups received water and food *ad libitum* during the experiment (Figure 1). The rats were subjected to anesthesia with isoflurane and euthanized by cardiac exsanguination after 16 weeks. Blood samples were collected, centrifuged, and the resulting serum was stored at -80 °C until the analyses were performed. Subsequently, liver fragments were aseptically collected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until the experimental procedures were carried out.

Analysis of mRNAs

The serum circulating miRNAs were extracted through miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the procedures were described elsewhere[17]. The sequences and

codes of the assessed miRNAs are described in Supplementary Table 1. Values were calculated by the formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Assessment of the gene expression of hepatic lipophagy

The total RNA was extracted from fragments of liver tissue using the RNeasy mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The cDNA conversion from 2 μg of RNA was performed using the High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States). qRT-PCR with *Taq*Man assay (Applied Biosystems) was used to assess the gene expression of sirtuin-1 (*Sirt1*), lysosome-associated membrane proteins-2 (*Lamp2), p62/*sequestosome-1 (*p62/Sqstm1),* transcription factor-EB (*Tfeb),* rubicon*, Cd36*, *perilipin*-2 *(Plin2), Plin3, and Plin5* in liver tissue. The evaluation of *Actb* gene expression was performed to normalize the expression of the other markers assessed. The probes used are described in Supplementary Table 1. Values were calculated with the formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

Statistical analysis

Sample size estimation was performed using the WINPEPI 11.20 program (Brixton Health, Israel) based on a published study by our research group that demonstrated the development of liver damage in an experimental model of MASH[15]. Normality was verified for all variables using Shapiro-Wilk test and histograms. Student *t* and Mann-Whitney *U* tests were performed. Quantitative variables were expressed as mean ± standard deviation or median and interquartile ranges (25th-75th). Pearson correlation coefficient was performed with a moderate ($0.3 < r < 0.6$), strong ($0.6 < r < 0.9$), or very strong ($0.9 < r < 1.0$) correlation were adopted. We also performed a correlation analysis between all variables to integrate all gene expression data. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 28.0; IBM Corp., Armonk, NY, United States).

RESULTS

General characteristics of the experimental model

In previous studies, we demonstrated that animals in the intervention group developed MASH after ingestion of HFCD for 16 weeks[15,18]. In this experimental model, there was a substantial deposition of body fat, changes in miRNAs levels, receptors, mediators, and inflammatory cytokines that contributed to the development and progression of liver damage,

in addition to increasing the risk of developing cardiovascular disease. Regarding the histopathological evaluation, we demonstrated that these animals developed MASH with inflammation, ballooning, and intense deposition of collagen fibers in the hepatic tissue[15,18]. The same animal tissues were used in the present study.

Gene expression of the circulating miRNAs

The results obtained from the gene expression of circulating miRNAs are reported in Figure 2. We reported a significant increase in miR-34a ($P = 0.005$) and miR-21 ($P = 0.043$) gene expression in the intervention group compared to the control group. We did not observe a significant difference between the experimental groups for the gene expression of miR-375 ($P = 0.905$), miR-26b ($P = 0.698$), and miR-155 ($P = 0.688$).

Expression of genes involved in hepatic lipophagy

The results obtained for the expression of genes involved in hepatic lipophagy are demonstrated in Figure 3. There was a significant decrease in gene expression of *Sirt1* ($P = 0.020$) and *p62/Sqstm1* ($P < 0.001$) in the intervention group compared to the control group. The intervention group showed a significant increase in the gene expression of *Tfeb* ($P = 0.020$), *Plin2* ($P = 0.003$), *Plin3* ($P = 0.031$), and *Plin5* ($P = 0.005$) compared to the control group. We did not observe a significant difference between the experimental groups for the expression of *Lamp2* ($P = 0.715$), rubicon ($P = 0.166$), and *Cd36* ($P = 0.312$).

Relationship between histopathological and molecular markers

We then evaluated the relationship between histopathological and molecular markers. We divided the intervention group according to each histopathological variable into 'present' or 'absent' (*e.g.,* with hepatic inflammation *vs* no hepatic inflammation; with hepatic fibrosis *vs* no hepatic fibrosis). After that, we compared the averages of genes and miRNA expression between groups. The results are demonstrated in Figure 4. We observed higher levels of miR-34a ($P = 0.033$), miR-375 ($P = 0.029$), *Tfeb* ($P = 0.018$), and *Plin2* ($P = 0.033$) in animals with inflammation in tissue. We also found higher levels of *Tfeb* ($P = 0.020$) in the group of animals with fibrosis and higher levels of miR-34a ($P = 0.011$) in animals with MASLD compared to the group without MASLD. Finally, looking for potential cross-regulation between genes and miRNAs, we did a correlation analysis between circulating miRNAs and gene expression. The results are shown in Figure 5. We found a statistically significant correlation between *Sirt1* and *p62/Sqstm1* ($\rho = 0.81$; $P = 0.000$),

between *Sirt1* and rubicon (ρ = 0.91; *P* = 0.000), and between miR-26b and miR-21 (ρ = 0.96; *P* = 0.000). All other correlations are shown in the Table 1. Altogether, these integrative analyses suggest potential relations between histopathological and molecular markers in MASLD. Furthermore, correlation analysis suggests potential crosstalk and interplay between genes controlling autophagy, lipophagy, and lysosomal function.

DISCUSSION

In this study, conducted in a nutritional experimental model, we reported a significant decrease in the gene expression of *Sirt1* and *p62/Sqstm1* in animals with MASH compared to controls. It is known that p62/SQSTM1 serves as a necessary receptor for selective macroautophagy, and its reduction indicates an impairment of the autophagic flux[19,20]. Furthermore, there are studies suggesting that sirtuins may play a protective role against the development of MASLD[21]. Additionally, in our study, we observed an increase in the gene expression of *Tfeb*, *Plin2*, *Plin3*, and *Plin5* as well as an elevation in circulating levels of miR-34a and miR-21 in the intervention group when compared to the healthy group. These findings will be further explored here. It is known that genetic and epigenetic factors, occurring in response to environmental factors such as diet and physical activity, interact and modulate individual risk for the development and progression of MASLD. The mechanisms underlying the pathophysiology of MASLD caused by epigenetic processes have not yet been elucidated, making preclinical studies essential[22,23].

It is important to contextualize the animal model used to develop this study, as demonstrated in previous manuscripts[15,18]. In the studies using the same model, we showed that after 16 weeks of unrestricted access to an HFCD diet, the model resulted in significant fat accumulation in both the body and liver and activation of miRNAs, receptors, mediators, and inflammatory cytokines[15]. Additionally, we observed alterations in gut microbiota composition accompanied by an increase in the gene expression of markers related to intestinal permeability[15,18]. This model induced histopathological changes akin to those seen in human MASH, including significant collagen fiber deposition in liver tissue[15]. Furthermore, it highlighted associations between MASLD and elevated cardiovascular risk factors, such as atherogenic dyslipidemia, systemic inflammation, and endothelial dysfunction[18]. The previously described results were replicated using different molecular and histopathological techniques, which emphasizes the reliability of the data[15,18]. Although a limitation of the study is that the analyses were conducted solely through the gene expression of certain autophagy and epigenetic markers using TaqMan

probes, the findings strengthen the conclusions of this manuscript, demonstrating the interaction between epigenetic and autophagy markers in the progression of liver disease.

MiRNAs are extremely stable and act in inflammatory mechanisms and hepatic fibrogenesis culminating in the progression of MASLD[24]. In our experiment, we demonstrated a significant increase in miR-34a gene expression in animals with MASH compared with healthy controls. Also, we observed higher levels of miR-34a in animals from the intervention group showing hepatic inflammation. Consistent with this result, increased miR-34a gene expression is associated with more advanced stages of MASLD, and therefore its mechanism of action is an attractive target for future intervention in addition to its function as a biomarker for diagnosing and monitoring the progression of MASLD[25-27].

Furthermore, in our study, we revealed a decrease in *Sirt1* gene expression in animals with MASH compared with the no intervention group. It was already demonstrated that adipose triglyceride lipase promotes lipophagy *via* SIRT1[28]. Also consistent with our finding, a previous study reported that the increase in miR-34 family expression contributed to the suppression of SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor-α expression, both regulators of the storage pathways of lipid metabolism that contribute to the exacerbation of hepatic steatosis[29].

The intervention group also showed an increase in miR-21 expression, which was induced by unsaturated fatty acids and acts on lipid accumulation, inflammation, and liver fibrosis[30,31]. In a previous study conducted in the same experimental model, we reported hepatic and systemic inflammation and an increased risk of developing cardiovascular disease in animals with MASH. These findings were consistent with what was observed in this study regarding the mechanism of action of miR-21[15,18]. Moreover, experimental studies report that knockdown or deletion of miR-21 in mice fed a high-fat diet can reduce lipogenesis and hepatic steatosis by modulating the expression of transcription factors involved in fatty acid uptake, *de novo* lipogenesis, gluconeogenesis, and glucose production[32,33]. However, expression of miR-21 as an early diagnostic biomarker for MASLD provides mixed results, and further studies are needed before we can translate bedside observations to the clinical setting[30].

In this study, when comparing the experimental groups, no significant difference was found in the gene expression of miR-375, miR-26b, and miR-155. Nevertheless, it is worth noting that we observed higher levels of miR-375 in rats from the intervention group, which also showed hepatic inflammation. Interestingly, we found a strong correlation between

miR-26b and miR-21. This correlation was already reported before in a very different model that analyzed the miRNAs in human saliva in response to stress[34].

It is worth remembering that the gene expression of miR-375, miR-26b, and miR-155 has been associated with inflammatory cell recruitment, modulation of autophagy, and tumorigenesis by acting on regulators of cell differentiation in hepatocellular carcinoma[12,35,36]. In this study, gene expression of these miRNAs was examined in animals with initial liver injury, *i.e.* without cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma, which may explain the lack of significant differences between experimental groups. Finally, it is known that the variability and heterogeneity in the expression of these miRNAs is dependent on the liver disease and its developmental stage, which requires further studies to elucidate these mechanisms.

Impairments in hepatic autophagy play a critical role in the evolution of MASLD by promoting the storage of triglycerides in lipid droplets[37]. Autophagy refers to the degradation of nonspecific cytoplasmic proteins as an adaptive response to extracellular and intracellular stress, *i.e.* a mechanism regulating cell death[37,38]. The autophagy process is regulated by several markers, including p62/SQSTM1 and Beclin-1, which are differentially expressed depending on the organ and the developmental stage of the lesion[39]. Our experiment showed a significant decrease in *p62/Sqstm1* gene expression in animals with MASH compared with healthy controls. The lack of autophagy leads to the accumulation of p62, a process detrimental to liver cells that can contribute to the progression of MASLD and liver fibrosis[19,38]. In addition, deletion of p62/SQSTM1 has been shown to promote hyperphagia-induced obesity due to abnormal leptin signaling as well as insulin resistance, impaired glucose tolerance, and hepatic steatosis[40].

However, Sahani *et al*[41] reported that the expression level of *p62/Sqstm1* does not always inversely correlate with autophagic activity, as this process is influenced by transcriptional alterations, amino acid availability from lysosomes, and autophagic degradation[41]. In addition, we speculate that posttranscriptional regulation could explain what is really happening. Accordingly, the promoter may be more active and transcribe more, but there may be miRNAs regulating the levels of miRNA of p62/SQSTM1.

Some studies show the regulation of p62/SQSTM1 levels by miR-372 and miR-100[42,43]. The decrease in *p62/Sqstm1* gene expression in animals with MASH could be responsible for the accumulation of lipophagosomes since SQSTM1 is described as important for lipophagy, at least in an *in vitro* model with ethanol[44]. We also observed a strong correlation between the expression of *p62/Sqstm1* and *Sirt1*. It was already

demonstrated that *Sirt1* is upregulated to deacetylate and stabilize *p62/Sqstm1* in hepatocellular carcinoma[45]. It is also worth highlighting that even though we did not find a significant difference between the experimental groups for the expression of rubicon, we found a strong correlation between the expression of rubicon and *Sirt1*. It is known that rubicon is a negative regulator of autophagosome-lysosome fusion, and an elevation of RUBICON protein in samples taken from patients with nonalcoholic fatty liver disease (MASLD former name) was reported[46,47].

At the molecular level, autophagy is essentially controlled by autophagy-related genes (ATGs) and adaptors, especially *p62/SQSTM1*. These genes are responsible for mediating autophagosome formation and component uptake into the organelle[48,49]. It is worth mentioning that there are studies demonstrating that polymorphisms in ATG genes, specifically *ATG7* and *IRGM*, are risk factors for severe fatty liver disease[50,51].

In the autophagy process, TFEB has been identified as a promoter of ATGs and consequently as a key regulator of lipid metabolism and lysosomal function[8,52,53]. Here we show an increase in *Tfeb* gene expression in animals with MASH. Also, we observed a significant increase in *Tfeb* gene expression when comparing the presence or absence of inflammation and the presence or absence of fibrosis in the intervention group. Nutritional status (starvation and/or caloric restriction) and lysosomal stress can promote transcriptional regulation of TFEB, which plays a key role in hepatic lipid metabolism[8,52,54]. Thus, it is possible to speculate that after ingestion of HFCD for 16 weeks, MASH animals showed an increase in *Tfeb* expression through lysosomal stress. In this sense, TFEB agonists, such as some clinically approved drugs (*e.g.*, digoxin or the marine-derived natural product (*e.g.*, ikarugamycin), or other drugs that mirror the cellular effects of hunger and/or caloric restriction are promising therapeutic options for common metabolic disorders such as obesity and fatty liver as it is a key regulator of lipid metabolism and lysosomal biogenesis and function[54].

Hepatocytes store triacylglycerides (TAG) in lipid droplets due to an overload of free fatty acids[55,56]. Access to the surface of lipid droplets is controlled by PLINs that regulate TAG storage and hydrolysis through lipolysis and lipophagy[55,56]. In our study, animals with MASH showed a significant increase in gene expression of *Plin2*, *Plin3*, and *Plin5* compared with healthy animals. In the PLIN protein family, PLIN2 is the most abundant member in steatosis of mice and humans, and its expression is strongly correlated with lesion severity, which are results that the data obtained in our study corroborate[55-57].

Experimental models with PLIN2 deficiency have invariably shown a decrease in hepatic TAG, leading to reduced liver inflammation and fibrosis, which supports its role as a target for MASH therapy[56-58]. Degradation of PLIN2 and PLIN3 by chaperone-mediated autophagy (CMA) is a prerequisite for lipolysis to occur[59,60]. Increased expression of *Plin2* and *Plin3* and/or inactivity of CMA promotes decreased lipophagy and intracellular lipid accumulation, as corroborated by our study[59,60]. In this study high levels of *Plin2* gene expression were observed in animals from the intervention group showing hepatic inflammation.

Another perilipin, PLIN3 has been shown to be required for the recruitment of proteins involved with lipophagy, and stimulation of this mechanism may contribute to liver protection and thus provide a therapeutic strategy for MASLD[59]. PLIN5 is expressed in highly oxidative tissues and is an early response to excessive lipid uptake in hepatocytes[53,61]. It is key in the regulation of hepatic lipophagy and fatty acid oxidation by SIRT1. PLIN5 translocates to the nucleus and promotes transcriptional regulation of SIRT1, which contributes to the increase in expression of downstream target genes that control mitochondrial biogenesis, oxidative metabolism, and lipophagy[55,62]. Data that corroborate the results obtained in this study reported not only a decrease in the expression of *p62/Sqstm1* in animals with MASH but also an increase in lipophagy flux[62].

In this study, no significant difference was observed between groups for *Lamp2a* gene expression; however, the results reported in the literature on the activity of this marker in CMA are controversial[63,64]. LAMP2A supports the CMA process, which occurs at a late stage of the autophagy process, and therefore we can justify the results obtained in this study because the animals showed liver damage at an early stage[63].

Autophagic degradation of lipids or lipophagy was first reported in 2009[65]. The mechanisms associated with this process are complex, but the general picture of how abnormal lipophagy causes MASLD has not been elucidated[66,67]. Moreover, several epigenetic and lipophagy markers show potential therapeutic effects in nutritional models of MASH[6,67]. In this study, we evaluated the markers based on gene expression only, which should be considered a limitation. However, we found that animals fed a MASH-inducing diet exhibited an increased expression of miR-34a and miR-21, which contribute to the inflammatory process and fibrogenesis of the disease[25,26,30].

The process of lipophagy was also reduced in the face of increased *PLIN* gene expression and decreased *Sirt1*. Lysosomal stress and autophagic activity increased, as evidenced by an increase in *Tfeb* and a decrease in *p62/Sqstm1* expression, respectively.

Further evaluation by single-cell sequencing, proteomics, and next-generation sequencing will allow characterization of the mechanistic details of lipophagy and epigenetic perturbations in metabolic dysfunction-associated fatty liver disease progression to fully exploit its potential as a target for chemoprevention of lesions[67].

CONCLUSION

We demonstrated in this animal model that *p62/SQSTM1* and *Sirt1* decreased and *Plin2*, *Plin3*, and *Plin5* increased in MASLD in comparison to controls, suggesting that both autophagy and lipophagy play a role in the disease development. In addition, our study highlighted the differential expression of miRNAs, such as the increased expression of miR-34a and miR-21, which are associated with hepatic inflammation and lipid metabolism. This observation further supports their potential role as biomarkers and therapeutic targets in MASLD progression. The mechanisms underlying the pathophysiology of MASLD caused by epigenetic processes have not yet been elucidated. Therefore, further preclinical studies are essential to better explain the MASLD metabolic pathway.

REFERENCES

1 **Friedman SL**, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018; **24**: 908-922 [PMID: 29967350 DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9]

2 **Huang DQ**, El-Serag HB, Loomba R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; **18**: 223-238 [PMID: 33349658 DOI: 10.1038/s41575-020-00381-6]

3 **Younossi ZM**, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; **64**: 73-84 [PMID: 26707365 DOI: 10.1002/hep.28431]

4 **Xian YX**, Weng JP, Xu F. MAFLD vs. NAFLD: shared features and potential changes in epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and pharmacotherapy. *Chin Med J (Engl)* 2020; **134**: 8-19 [PMID: 33323806 DOI: 10.1097/CM9.0000000000001263]

5 **Nassir F**. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules* 2022; **12** [PMID: 35740949 DOI: 10.3390/biom12060824]

6 **Xu X**, Poulsen KL, Wu L, Liu S, Miyata T, Song Q, Wei Q, Zhao C, Lin C, Yang J. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty

liver/steatohepatitis (NAFL/NASH). *Signal Transduct Target Ther* 2022; **7**: 287 [PMID: 35963848 DOI: 10.1038/s41392-022-01119-3]

7 **Juanola O**, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18** [PMID: 34069012 DOI: 10.3390/ijerph18105227]

8 **Martinez-Lopez N**, Singh R. Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. *Annu Rev Nutr* 2015; **35**: 215-237 [PMID: 26076903 DOI: 10.1146/annurev-nutr-071813-105336]

9 **Huang PS**, Liao CJ, Huang YH, Yeh CT, Chen CY, Tang HC, Chang CC, Lin KH. Functional and Clinical Significance of Dysregulated microRNAs in Liver Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; **13** [PMID: 34771525 DOI: 10.3390/cancers13215361]

10 **Rodrigues PM**, Afonso MB, Simão AL, Islam T, Gaspar MM, O'Rourke CJ, Lewinska M, Andersen JB, Arretxe E, Alonso C, Santos-Laso Á, Izquierdo-Sanchez L, Jimenez-Agüero R, Eizaguirre E, Bujanda L, Pareja MJ, Prip-Buus C, Banales JM, Rodrigues CMP, Castro RE. miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis. *Liver Int* 2023; **43**: 2256-2274 [PMID: 37534739 DOI: 10.1111/liv.15682]

11 **Xie D**, Yuan P, Wang D, Jin H, Chen H. Expression and prognostic significance of miR-375 and miR-221 in liver cancer. *Oncol Lett* 2017; **14**: 2305-2309 [PMID: 28781668 DOI: 10.3892/ol.2017.6423]

12 **Jin F**, Wang Y, Li M, Zhu Y, Liang H, Wang C, Wang F, Zhang CY, Zen K, Li L. MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death Dis* 2017; **8**: e2540 [PMID: 28079894 DOI: 10.1038/cddis.2016.461]

13 **Gao Y**, Zhang W, Zeng LQ, Bai H, Li J, Zhou J, Zhou GY, Fang CW, Wang F, Qin XJ. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. *Redox Biol* 2020; **36**: 101635 [PMID: 32863214 DOI: 10.1016/j.redox.2020.101635]

14 **Trauner M**, Fuchs CD. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease. *Gut* 2022; **71**: 194-209 [PMID: 34615727 DOI: 10.1136/gutjnl-2021-324305]

15 **Longo L**, Tonin Ferrari J, Rampelotto PH, Hirata Dellavia G, Pasqualotto A, P Oliveira C, Thadeu Schmidt Cerski C, Reverbel da Silveira T, Uribe-Cruz C, Álvares-da-Silva MR. Gut Dysbiosis and Increased Intestinal Permeability Drive microRNAs, NLRP-3 Inflammasome and Liver Fibrosis in a Nutritional Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Adult Male Sprague Dawley Rats. *Clin Exp Gastroenterol* 2020; **13**: 351-368 [PMID: 32982365 DOI: 10.2147/CEG.S262879]

16 **Santhekadur PK**, Kumar DP, Sanyal AJ. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018; **68**: 230-237 [PMID: 29128391 DOI: 10.1016/j.jhep.2017.10.031]
17 **Michalczuk MT**, Longo L, Keingeski MB, Basso BS, Guerreiro GTS, Ferrari JT, Vargas JE, Oliveira CP, Uribe-Cruz C, Cerski CTS, Filippi-Chiela E, Álvares-da-Silva MR. Rifaximin on epigenetics and autophagy in animal model of hepatocellular carcinoma secondary to metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease. *World J Hepatol* 2024; **16**: 75-90 [PMID: 38313241 DOI: 10.4254/wjh.v16.i1.75]
18 **Longo L**, Rampelotto PH, Filippi-Chiela E, de Souza VEG, Salvati F, Cerski CT, da Silveira TR, Oliveira CP, Uribe-Cruz C, Álvares-da-Silva MR. Gut dysbiosis and systemic inflammation promote cardiomyocyte abnormalities in an experimental model of steatohepatitis. *World J Hepatol* 2021; **13**: 2052-2070 [PMID: 35070008 DOI: 10.4254/wjh.v13.i12.2052]
19 **Carotti S**, Aquilano K, Zalfa F, Ruggiero S, Valentini F, Zingariello M, Francesconi M, Perrone G, Alletto F, Antonelli-Incalzi R, Picardi A, Morini S, Lettieri-Barbato D, Vespasiani-Gentilucci U. Lipophagy Impairment Is Associated With Disease Progression in NAFLD. *Front Physiol* 2020; **11**: 850 [PMID: 32765301 DOI: 10.3389/fphys.2020.00850]
20 **Shroff A**, Nazarko TY. SQSTM1, lipid droplets and current state of their lipophagy affairs. *Autophagy* 2023; **19**: 720-723 [PMID: 35799322 DOI: 10.1080/15548627.2022.2094606]
21 **Zhu Y**, Hu S, Pan X, Gopoju R, Cassim Bawa FN, Yin L, Xu Y, Zhang Y. Hepatocyte Sirtuin 6 Protects against Atherosclerosis and Steatohepatitis by Regulating Lipid Homeostasis. *Cells* 2023; **12** [PMID: 37566087 DOI: 10.3390/cells12152009]
22 **Choudhary NS**, Duseja A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol* 2021; **6**: 2 [PMID: 33409397 DOI: 10.21037/tgh.2019.09.06]
23 **Jonas W**, Schürmann A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Mol Metab* 2021; **50**: 101111 [PMID: 33160101 DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101111]
24 **Di Mauro S**, Scamporrino A, Filippello A, Di Pino A, Scicali R, Malaguarnera R, Purrello F, Piro S. Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. *Int J Mol Sci* 2021; **22** [PMID: 34769333 DOI: 10.3390/ijms222111905]
25 **Ezaz G**, Trivedi HD, Connelly MA, Filozof C, Howard K, L Parrish M, Kim M, Herman MA, Nasser I, Afdhal NH, Jiang ZG, Lai M. Differential Associations of Circulating MicroRNAs With Pathogenic Factors in NAFLD. *Hepatol Commun* 2020; **4**: 670-680 [PMID: 32363318 DOI: 10.1002/hep4.1501]

26 **Zhang Z**, Moon R, Thorne JL, Moore JB. NAFLD and vitamin D: Evidence for intersection of microRNA-regulated pathways. *Nutr Res Rev* 2023; **36**: 120-139 [PMID: 35109946 DOI: 10.1017/S095442242100038X]

27 **Xin S**, Zhan Q, Chen X, Xu J, Yu Y. Efficacy of serum miRNA test as a non-invasive method to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2020; **20**: 186 [PMID: 32532204 DOI: 10.1186/s12876-020-01334-8]

28 **Sathyanarayan A**, Mashek MT, Mashek DG. ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism. *Cell Rep* 2017; **19**: 1-9 [PMID: 28380348 DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.026]

29 **Wang JM**, Qiu Y, Yang Z, Kim H, Qian Q, Sun Q, Zhang C, Yin L, Fang D, Back SH, Kaufman RJ, Yang L, Zhang K. IRE1α prevents hepatic steatosis by processing and promoting the degradation of select microRNAs. *Sci Signal* 2018; **11** [PMID: 29764990 DOI: 10.1126/scisignal.aao4617]

30 **Zhang T**, Yang Z, Kusumanchi P, Han S, Liangpunsakul S. Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Front Med (Lausanne)* 2020; **7**: 7 [PMID: 32083086 DOI: 10.3389/fmed.2020.00007]

31 **Rodrigues PM**, Afonso MB, Simão AL, Carvalho CC, Trindade A, Duarte A, Borralho PM, Machado MV, Cortez-Pinto H, Rodrigues CM, Castro RE. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death Dis* 2017; **8**: e2748 [PMID: 28406477 DOI: 10.1038/cddis.2017.172]

32 **Wu H**, Ng R, Chen X, Steer CJ, Song G. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut* 2016; **65**: 1850-1860 [PMID: 26282675 DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308430]

33 **Calo N**, Ramadori P, Sobolewski C, Romero Y, Maeder C, Fournier M, Rantakari P, Zhang FP, Poutanen M, Dufour JF, Humar B, Nef S, Foti M. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut* 2016; **65**: 1871-1881 [PMID: 27222533 DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310822]

34 **Wiegand C**, Heusser P, Klinger C, Cysarz D, Büssing A, Ostermann T, Savelsbergh A. Stress-associated changes in salivary microRNAs can be detected in response to the Trier Social Stress Test: An exploratory study. *Sci Rep* 2018; **8**: 7112 [PMID: 29740073 DOI: 10.1038/s41598-018-25554-x]

35 **Fu X**, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, Pattou F, Han W, Wang X, Lou F, Jove R, Staels B, Moore DD, Huang W. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *J Clin Invest* 2015; **125**: 2497-2509 [PMID: 25961460 DOI: 10.1172/JCI75438]

36 **Blaya D**, Pose E, Coll M, Lozano JJ, Graupera I, Schierwagen R, Jansen C, Castro P, Fernandez S, Sidorova J, Vasa-Nicotera M, Solà E, Caballería J, Trebicka J, Ginès P, Sancho-Bru P. Profiling circulating microRNAs in patients with cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep* 2021; **3**: 100233 [PMID: 33665588 DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100233]

37 **Zhang L**, Zhang Z, Li C, Zhu T, Gao J, Zhou H, Zheng Y, Chang Q, Wang M, Wu J, Ran L, Wu Y, Miao H, Zou X, Liang B. S100A11 Promotes Liver Steatosis via FOXO1-Mediated Autophagy and Lipogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021; **11**: 697-724 [PMID: 33075563 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.10.006]

38 **Rusten TE**, Stenmark H. p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 207-209 [PMID: 20190829 DOI: 10.1038/ncb0310-207]

39 **Jiang Y**, Chen D, Gong Q, Xu Q, Pan D, Lu F, Tang Q. Elucidation of SIRT-1/PGC-1α-associated mitochondrial dysfunction and autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2021; **20**: 40 [PMID: 33902605 DOI: 10.1186/s12944-021-01461-5]

40 **Miura I**, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J. Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice. *Physiol Rep* 2021; **9**: e14859 [PMID: 33991461 DOI: 10.14814/phy2.14859]

41 **Sahani MH**, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; **10**: 431-441 [PMID: 24394643 DOI: 10.4161/auto.27344]

42 **Feng L**, Ma Y, Sun J, Shen Q, Liu L, Lu H, Wang F, Yue Y, Li J, Zhang S, Lin X, Chu J, Han W, Wang X, Jin H. YY1-MIR372-SQSTM1 regulatory axis in autophagy. *Autophagy* 2014; **10**: 1442-1453 [PMID: 24991827 DOI: 10.4161/auto.29486]

43 **Ge YY**, Shi Q, Zheng ZY, Gong J, Zeng C, Yang J, Zhuang SM. MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R. *Oncotarget* 2014; **5**: 6218-6228 [PMID: 25026290 DOI: 10.18632/oncotarget.2189]

44 **Wang L**, Zhou J, Yan S, Lei G, Lee CH, Yin XM. Ethanol-triggered Lipophagy Requires SQSTM1 in AML12 Hepatic Cells. *Sci Rep* 2017; **7**: 12307 [PMID: 28951592 DOI: 10.1038/s41598-017-12485-2]

45 **Feng L**, Chen M, Li Y, Li M, Hu S, Zhou B, Zhu L, Yu L, Zhou Q, Tan L, An H, Wang X, Jin H. Sirt1 deacetylates and stabilizes p62 to promote hepato-carcinogenesis. *Cell Death Dis* 2021; **12**: 405 [PMID: 33854041 DOI: 10.1038/s41419-021-03666-z]

46 **Qian H**, Chao X, Williams J, Fulte S, Li T, Yang L, Ding WX. Autophagy in liver diseases: A review. *Mol Aspects Med* 2021; **82**: 100973 [PMID: 34120768 DOI: 10.1016/j.mam.2021.100973]

47 **Tanaka S**, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 2016; **64**: 1994-2014 [PMID: 27637015 DOI: 10.1002/hep.28820]

48 **Nishimura T**, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov* 2020; **6**: 32 [PMID: 32509328 DOI: 10.1038/s41421-020-0161-3]

49 **Levine B**, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 2019; **176**: 11-42 [PMID: 30633901 DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048]

50 **Baselli GA**, Jamialahmadi O, Pelusi S, Ciociola E, Malvestiti F, Saracino M, Santoro L, Cherubini A, Dongiovanni P, Maggioni M, Bianco C, Tavaglione F, Cespiati A, Mancina RM, D'Ambrosio R, Vaira V, Petta S, Miele L, Vespasiani-Gentilucci U, Federico A, Pihlajamaki J, Bugianesi E, Fracanzani AL, Reeves HL, Soardo G, Prati D, Romeo S, Valenti LV; EPIDEMIC Study Investigators. Rare ATG7 genetic variants predispose patients to severe fatty liver disease. *J Hepatol* 2022; **77**: 596-606 [PMID: 35405176 DOI: 10.1016/j.jhep.2022.03.031]

51 **Lin YC**, Chang PF, Lin HF, Liu K, Chang MH, Ni YH. Variants in the autophagy-related gene IRGM confer susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease by modulating lipophagy. *J Hepatol* 2016; **65**: 1209-1216 [PMID: 27417217 DOI: 10.1016/j.jhep.2016.06.029]

52 **Schulze RJ**, Sathyanarayan A, Mashek DG. Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017; **1862**: 1178-1187 [PMID: 28642194 DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.06.008]

53 **Klionsky DJ**, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). Autophagy. 2021;17(1):1-382.

54 **Wang C**, Niederstrasser H, Douglas PM, Lin R, Jaramillo J, Li Y, Oswald NW, Zhou A, McMillan EA, Mendiratta S, Wang Z, Zhao T, Lin Z, Luo M, Huang G, Brekken RA, Posner BA, MacMillan JB, Gao J, White MA. Small-molecule TFEB pathway agonists that ameliorate metabolic syndrome in mice and extend C. elegans lifespan. *Nat Commun* 2017; **8**: 2270 [PMID: 29273768 DOI: 10.1038/s41467-017-02332-3]

55 **Griffin JD**, Bejarano E, Wang XD, Greenberg AS. Integrated Action of Autophagy and Adipose Tissue Triglyceride Lipase Ameliorates Diet-Induced Hepatic Steatosis in Liver-Specific PLIN2 Knockout Mice. *Cells* 2021; **10** [PMID: 33923083 DOI: 10.3390/cells10051016]

56 **Graffmann N**, Ring S, Kawala MA, Wruck W, Ncube A, Trompeter HI, Adjaye J. Modeling Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Immature Hepatocyte-Like Cells Reveals Activation of PLIN2 and Confirms Regulatory Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Stem Cells Dev* 2016; **25**: 1119-1133 [PMID: 27308945 DOI: 10.1089/scd.2015.0383]

57 **Najt CP**, Senthivinayagam S, Aljazi MB, Fader KA, Olenic SD, Brock JR, Lydic TA, Jones AD, Atshaves BP. Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; **310**: G726-G738 [PMID: 26968211 DOI: 10.1152/ajpgi.00436.2015]

58 **McManaman JL**, Bales ES, Orlicky DJ, Jackman M, MacLean PS, Cain S, Crunk AE, Mansur A, Graham CE, Bowman TA, Greenberg AS. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. *J Lipid Res* 2013; **54**: 1346-1359 [PMID: 23402988 DOI: 10.1194/jlr.M035063]

59 **Garcia-Macia M**, Santos-Ledo A, Leslie J, Paish HL, Collins AL, Scott RS, Watson A, Burgoyne RA, White S, French J, Hammond J, Borthwick LA, Mann J, Bolaños JP, Korolchuk VI, Oakley F, Mann DA. A Mammalian Target of Rapamycin-Perilipin 3 (mTORC1-Plin3) Pathway is essential to Activate Lipophagy and Protects Against Hepatosteatosis. *Hepatology* 2021; **74**: 3441-3459 [PMID: 34233024 DOI: 10.1002/hep.32048]

60 **Kaushik S**, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol* 2015; **17**: 759-770 [PMID: 25961502 DOI: 10.1038/ncb3166]

61 **Asimakopoulou A**, Engel KM, Gassler N, Bracht T, Sitek B, Buhl EM, Kalampoka S, Pinoé-Schmidt M, van Helden J, Schiller J, Weiskirchen R. Deletion of Perilipin 5 Protects Against Hepatic Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Missing Inflammasome Activation. *Cells* 2020; **9** [PMID: 32481590 DOI: 10.3390/cells9061346]

62 **Zhang E**, Cui W, Lopresti M, Mashek MT, Najt CP, Hu H, Mashek DG. Hepatic PLIN5 signals via SIRT1 to promote autophagy and prevent inflammation during fasting. *J Lipid Res* 2020; **61**: 338-350 [PMID: 31932301 DOI: 10.1194/jlr.RA119000336]

63 **Das S**, Seth RK, Kumar A, Kadiiska MB, Michelotti G, Diehl AM, Chatterjee S. Purinergic receptor X7 is a key modulator of metabolic oxidative stress-mediated autophagy and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; **305**: G950-G963 [PMID: 24157968 DOI: 10.1152/ajpgi.00235.2013]

64 **Sharma S**, Mells JE, Fu PP, Saxena NK, Anania FA. GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy. *PLoS One* 2011; **6**: e25269 [PMID: 21957486 DOI: 10.1371/journal.pone.0025269]

65 **Singh R**, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; **458**: 1131-1135 [PMID: 19339967 DOI: 10.1038/nature07976]

66 **Maan M**, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; **504**: 582-589 [PMID: 29438712 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.097]

67 **Li HY**, Peng ZG. Targeting lipophagy as a potential therapeutic strategy for nonalcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol* 2022; **197**: 114933 [PMID: 35093393 DOI: 10.1016/j.bcp.2022.114933]

Figures and Tables

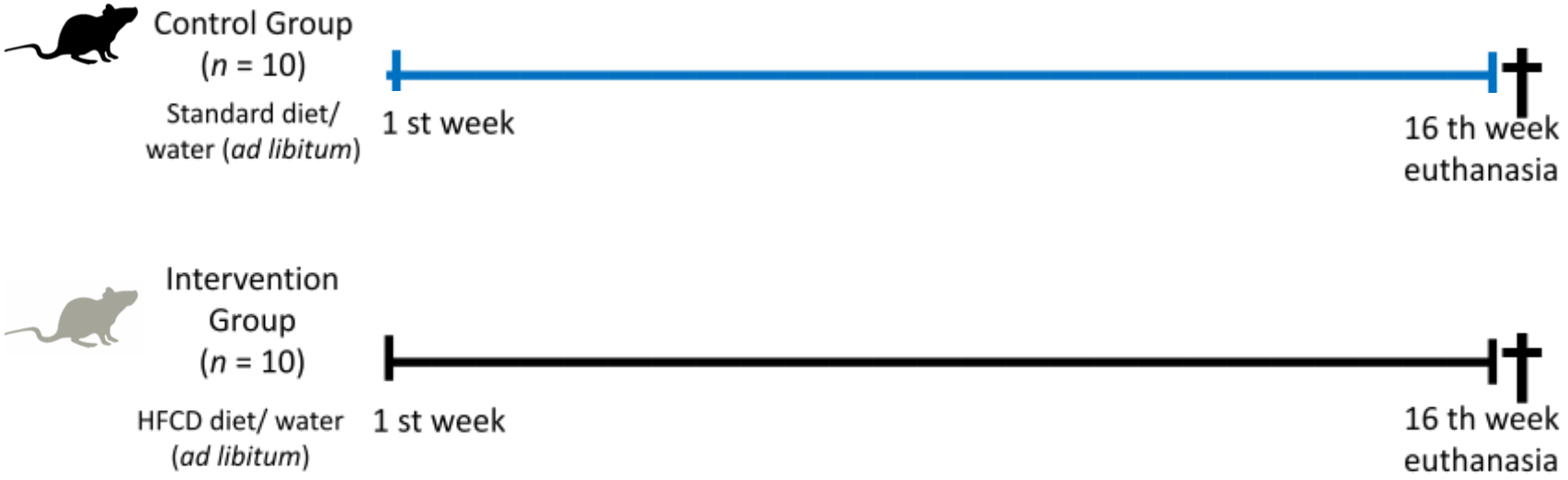

Figure 1 Study design. Animals received a standard or high-fat and choline-deficient diet, together with water (*ad libitum*) during the 16 weeks of the experiment. All animals were euthanized at the end. HFCD: High-fat and choline-deficient.

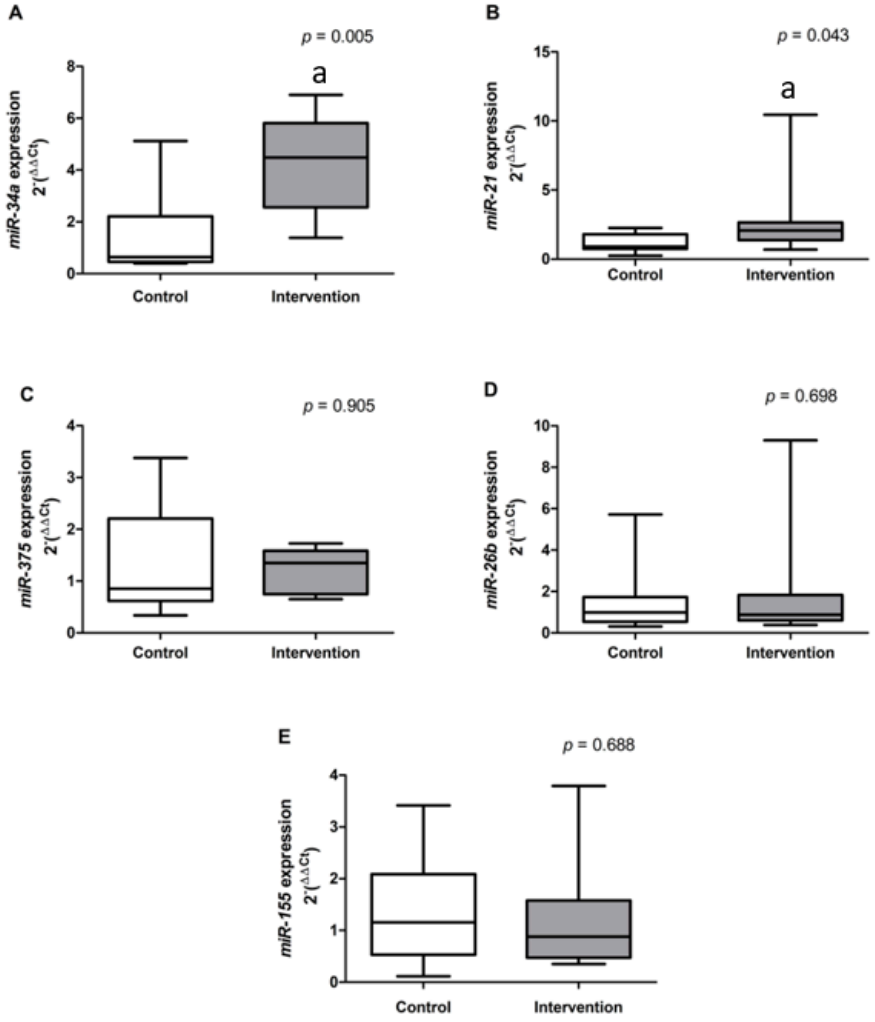

Figure 2 Gene expression of circulating microRNAs. A: Micro (mi)R-34a; B: MiR-21; C: MiR-375; D: MiR-26b; E: MiR-155 ($P = 0.688$). Mann-Whitney U test, $^{a}P < 0.05$ considered significant. Variables are described as median (25th-75th percentiles).

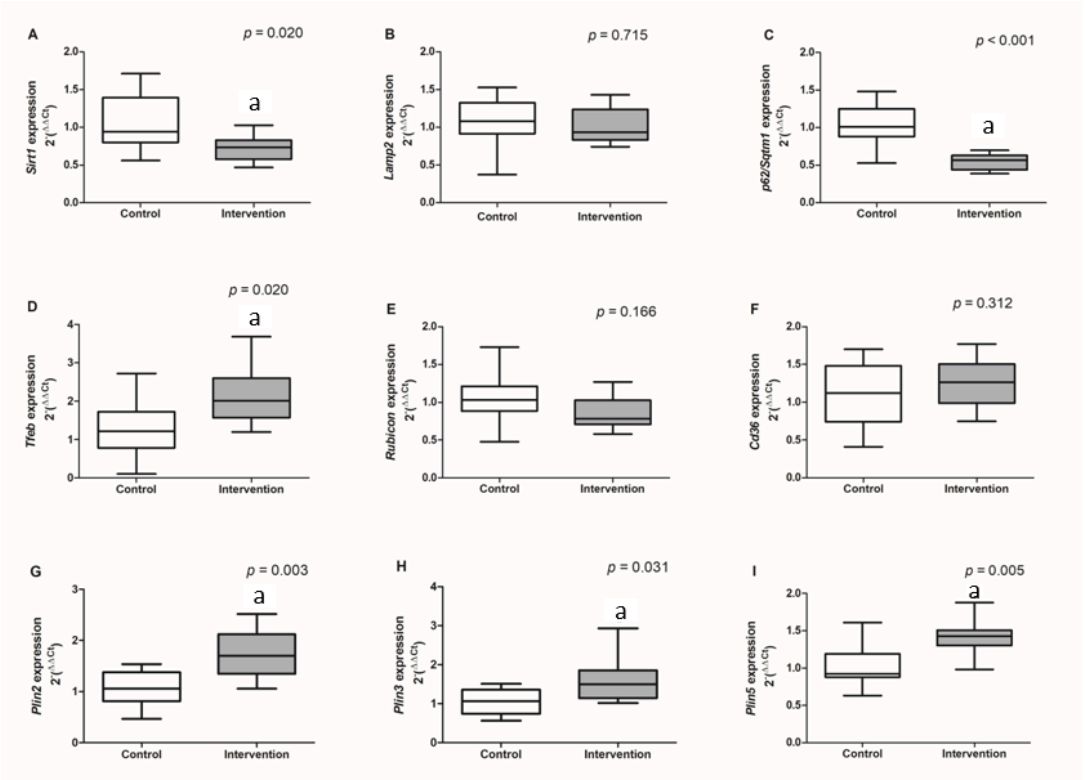

Figure 3 Hepatic gene expression of lipophagy markers. A: Sirtuin-1; B: Lysosome-associated membrane protein-2*;* C: P62/sequestosome-1*;* D: Transcription factor EB*;* E: Rubicon*;* F: *Cd36*; G: Perilipin *2* (*Plin2*); H: *Plin3;* I: *Plin5*. $^{a}P < 0.05$ considered significant, Mann-Whitney *U* test. Variables are described as median (25th-75th percentiles). *Lamp2*: Lysosome-associated membrane protein-2; *Plin*: Perilipin; *p62/Sqstm1*: P62/sequestosome-1; *Sirt1*: Sirtuin-1; *Tfeb*: Transcription factor EB.

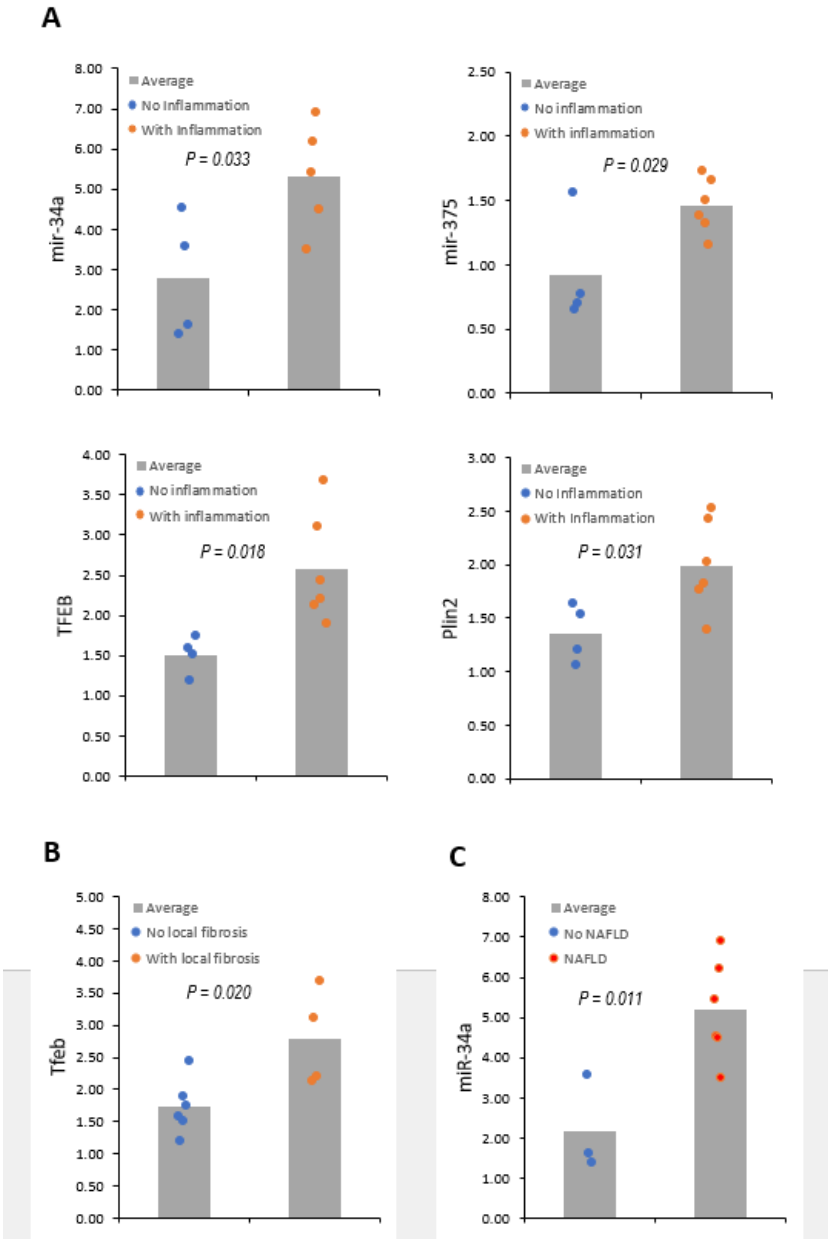

Figure 4 Inflammation, fibrosis, and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease status. A: Results after dividing the intervention group in two halves according to their inflammation status; B: Results after dividing the intervention group in two halves according to their fibrosis status; C: Results after dividing the intervention group in two halves according to their metabolic dysfunction-associated fatty liver disease status. *Plin*: Perilipin; *Tfeb*: Transcription factor EB.

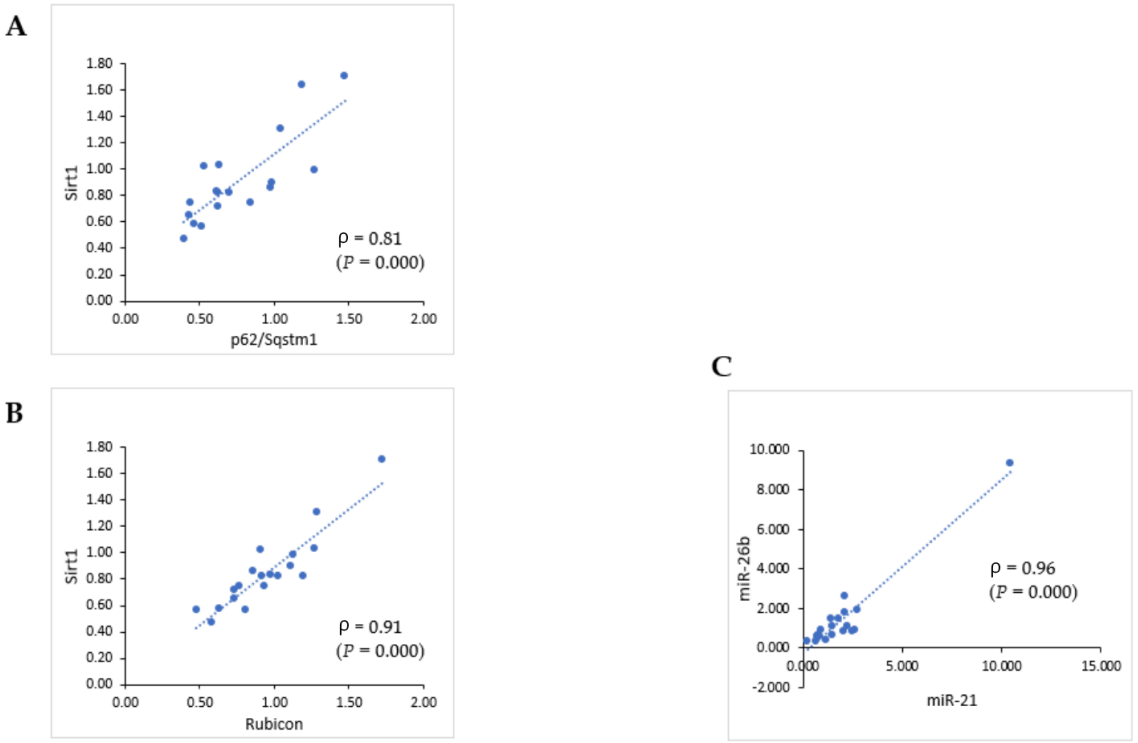

Figure 5 Correlations between circulating microRNAs and gene expression. A: Correlation between Sirtuin-1 (*Sirt1*) and *p62*/sequestosome-1; B: Correlation between *Sirt1* and rubicon; C: Correlation between *micro (mi)R26b* and *miR-21*. *P62/Sqstm1*: Sequestosome-1; *Sirt1*: Sirtuin-1.

Table 1 Correlations between circulating microRNAs and gene expression of hepatic lipophagy

		mRNAs				**Gene expression of hepatic lipophagy**							
Variables		**miR-375**	**miR-21**	**miR-26b**	**miR-155**	***p62/Sqstm1***	**Rubicon**	***Cd36***	***Tfeb***	***Plin2***	***Plin3***	***Plin5***	***Lamp2***	***Sirt1***
miRNAs	miR-34a	0.245	0.573[2,a]	0.303	-0.105	-0.389	-0.002	0.480[a]	0.470[a]	0.455	0.159	0.317	0.075	-0.397
	miR-375		0.111	0.220	0.196	0.040	0.086	-0.091	-0.008	-0.107	-0.087	-0.246	-0.444	-0.144
	miR-21			0.962[1,b]	0.579[2,b]	-0.389	-0.273	-0.035	0.227	0.099	-0.173	0.501[a]	-0.040	-0.376
	miR-26b				0.709[2,b]	-0.071	-0.14	-0.072	0.023	-0.157	-0.290	0.366	-0.099	-0.245
	miR-155					0.177	0.141	-0.007	-0.209	-0.318	-0.004	0.098	-0.347	0.002
Gene expression of hepatic lipophagy	*p62/Sqstm1*						0.776[2,b]	0.313	-0.165	-0.283	-0.250	-0.334	0.065	0.806[2,b]
	Rubicon							0.488[a]	0.357	0.043	-0.107	-0.194	0.104	0.909[1,b]
	Cd36								0.624[2,b]	0.488[a]	0.553[a]	0.289	0.460[1]	0.339
	Tfeb									0.788[2,b]	0.266	0.679[2,b]	0.428	0.275
	Plin2										0.466	0.655[2,b]	0.199	-0.024
	Plin3											0.378	0.138	-0.142
	Plin5												0.256	-0.066
	Lamp2													0.192

[1]Variables represent Pearson's correlation coefficient, moderate ($0.3 < r < 0.6$).

[2]Variables represent Pearson's correlation coefficient, strong ($0.6 < r < 0.9$).

[3]Variables represent Pearson's correlation coefficient, very strong ($0.9 < r < 1.0$).

[a]$P < 0.005$, correlation is significant.

[b]$P < 0.001$, correlation is significant.

Lamp2: Lysosome-associated membrane proteins-2; mi: Micro; *Plin*: Perilipin; *p62/Sqstm1*: P62/sequestosome-1; *Sirt1*: Sirtuin; *Sirt1*: Transcription factor-EB.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados originais desta tese articulam, em um único modelo experimental, dois eixos historicamente estudados de forma isolada na MASLD: a desregulação da lipofagia e as alterações epigenéticas. Desde sua publicação, esse trabalho tem sido citado em revisões e estudos que abordam desde a biologia molecular básica de organelas hepáticas até a busca por biomarcadores não invasivos aplicáveis à prática clínica. Cinco publicações recentes ilustram, sob ângulos distintos, como esses achados têm contribuído para a construção do conhecimento atual e para o delineamento de novas perguntas de pesquisa (84,85,86,87,88).

No eixo da lipofagia e da autofagia hepática, três artigos de revisão posicionam os achados desta tese como evidência experimental relevante. Palacios-Ramírez e colaboradores (2025), em revisão dedicada à autofagia na doença hepática associada ao envelhecimento, fazem uso do presente estudo para sustentar a noção de que a lipofagia comprometida promove o acúmulo de triglicerídeos e a esteatose, integrando os achados a uma discussão mais ampla sobre o papel das perilipinas, do Rubicon e da SIRT1 como alvos protetores para retardar o envelhecimento (84). De forma complementar, Weiskirchen e colaboradores (2026), em revisão que trata da dinâmica das gotículas de lipídios na regulação metabólica, citam este trabalho para fundamentar a afirmação de que a lipofagia inadequada exacerba a esteatose, enquanto autofagia excessiva ou descontrolada pode desencadear morte celular e inflamação (85). Por sua vez, Hwang e colaboradores (2025), mencionam o artigo ao abordar sobre o impacto da lipofagia sobre o estresse oxidativo e a esteato-hepatite, recorrendo aos achados desta tese para sustentar que a falha da lipofagia não apenas contribui para o acúmulo de gordura, mas também desencadeia processos críticos que impulsionam a lipotoxicidade, estresse oxidativo mitocondrial e do retículo endoplasmático, ativação de células estreladas hepáticas e fibrogênese e progressão da MASH (86). Em conjunto, esses três trabalhos fazem uso dos achados aqui apresentados para sustentar empiricamente a relevância da lipofagia na progressão da MASLD.

No eixo das alterações epigenéticas, outros dois trabalhos trazem os resultados sobre miR-34a e miR-21 obtidos nesta tese. Wang e colaboradores (2025) citam o presente trabalho como evidência de que a expressão aumentada desses miRNAs em modelos animais contribui para o desenvolvimento da doença (87). Já Priego-Parra e colaboradores (2025), em revisão sobre o índice Triglicerídeo-glicose-circunferência abdominal (TyG-WC) como biomarcador

da MASLD, listam os achados aqui apresentados entre as evidências que sustentam o papel dos miRNAs como mediadores epigenéticos da doença (88).

Em síntese, a apropriação dos achados desta tese por estudos publicados em revistas que tratam de hepatologia à biologia química sugere que a investigação aqui apresentada contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre a interface entre lipofagia, alterações epigenéticas e progressão da MASLD. Mais do que descrever um conjunto de alterações em um modelo experimental, os resultados ofereceram um substrato empírico que tem sido mobilizado para fundamentar revisões, hipóteses sobre biomarcadores e propostas terapêuticas.

Resta, contudo, um amplo espaço para investigação adicional. Os achados do presente estudo abrem múltiplas linhas de investigação que merecem aprofundamento em pesquisas futuras. A seguir, são apresentadas algumas direções consideradas particularmente promissoras.

Primeiramente, faz-se necessária a validação dos achados no nível proteico, mediante o uso de *Western blot* e imuno-histoquímica, com vistas à confirmação da expressão diferencial dos marcadores avaliados na presente tese. A avaliação direta do fluxo autofágico, por meio de ensaios com inibidores específicos, permitirá a caracterização mais precisa do estado funcional da autofagia e da lipofagia nesse modelo.

Em segundo lugar, a integração de abordagens proteômica, lipidômica, metabolômica e sequenciamento de nova geração, possibilitará a caracterização global dos mecanismos moleculares da MASLD e a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos.

Em terceiro lugar, estudos translacionais com amostras humanas, incluindo soro, plasma e biópsias hepáticas, são essenciais para a validação clínica dos achados experimentais. A correlação entre os marcadores moleculares avaliados e desfechos clínicos relevantes, como progressão para fibrose avançada, cirrose, descompensação hepática, carcinoma hepatocelular e mortalidade, pode servir como base para a aplicação clínica desses biomarcadores.

Em quarto lugar, intervenções farmacológicas direcionadas aos alvos identificados, incluindo agonistas do TFEB, antagonistas de miR-34a e miR-21, e moduladores das perilipinas, devem ser avaliadas em modelos pré-clínicos e, eventualmente, em ensaios clínicos. A combinação de múltiplas intervenções, atuando sinergicamente em diferentes pontos da cascata fisiopatológica, pode oferecer benefícios superiores às monoterapias.

Em quinto lugar, a relação entre a microbiota intestinal, os mecanismos epigenéticos e a autofagia/lipofagia hepática merece investigação aprofundada. Estudos do nosso grupo de

pesquisa têm sugerido que intervenções sobre a microbiota, como a rifaximina e probióticos, podem modular favoravelmente esses mecanismos, configurando uma estratégia terapêutica integrativa e promissora (77).

Por fim, a investigação dos determinantes individuais, incluindo polimorfismos genéticos, padrões epigenéticos basais, composição da microbiota e fatores ambientais, possibilitará a caracterização de subgrupos de pacientes com perfis fisiopatológicos distintos, abrindo caminho para abordagens de medicina de precisão na MASLD. Tais avanços têm o potencial de transformar substancialmente o manejo clínico dessa importante hepatopatia, com benefícios diretos para a saúde pública.

Na redação desta Tese foi utilizado aplicativo Claude da Anthropic, versão Opus 4 *on line*, para revisão da redação, bem como o aplicativo Zotero, versão 9 para Windows, para a indicação das referências bibliográficas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta‐analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, jul. 2016.

[2] XIAN, Y.-X.; WENG, J.-P.; XU, F. MAFLD vs. NAFLD: shared features and potential changes in epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and pharmacotherapy. **Chinese Medical Journal**, v. 134, n. 1, p. 8–19, 5 jan. 2021.

[3] HUANG, D. Q.; EL-SERAG, H. B.; LOOMBA, R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 4, p. 223–238, abr. 2021.

[4] FRIEDMAN, S. L. et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 24, n. 7, p. 908–922, jul. 2018.

[5] RINELLA, M. E. et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. **Hepatology**, v. 78, n. 6, p. 1966–1986, dez. 2023.

[6] TRAUNER, M.; FUCHS, C. D. Novel therapeutic targets for cholestatic and fatty liver disease. **Gut**, v. 71, n. 1, p. 194–209, jan. 2022.

[7] NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 824, 13 jun. 2022.

[8] JUANOLA, O. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5227, 14 maio 2021.

[9] DI MAURO, S. et al. Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11905, 2 nov. 2021.

[10] HUANG, P.-S. et al. Functional and Clinical Significance of Dysregulated microRNAs in Liver Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5361, 26 out. 2021.

[11] LI, H.-Y.; PENG, Z.-G. Targeting lipophagy as a potential therapeutic strategy for nonalcoholic fatty liver disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 197, p. 114933, mar. 2022.

[12] RODRIGUES, P. M. et al. miR‐21‐5p promotes NASH‐related hepatocarcinogenesis. **Liver International**, v. 43, n. 10, p. 2256–2274, out. 2023.

[13] XIE, D. et al. Expression and prognostic significance of miR-375 and miR-221 in liver cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 2305–2309, ago. 2017.

[14] JIN, F. et al. MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 1, p. e2540–e2540, 12 jan. 2017.

[15] MARTINEZ-LOPEZ, N.; SINGH, R. Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 215–237, 17 jul. 2015.

[16] SCHULZE, R. J.; SATHYANARAYAN, A.; MASHEK, D. G. Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 10, p. 1178–1187, out. 2017.

[17] GAO, Y. et al. Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. **Redox Biology**, v. 36, p. 101635, set. 2020.

[18] LONGO, L. et al. Gut Dysbiosis and Increased Intestinal Permeability Drive microRNAs, NLRP-3 Inflammasome and Liver Fibrosis in a Nutritional Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Adult Male Sprague Dawley Rats. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. Volume 13, p. 351–368, set. 2020.

[19] SANTHEKADUR, P. K.; KUMAR, D. P.; SANYAL, A. J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 230–237, fev. 2018.

[20] LUDWIG, J. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 55, n. 7, p. 434–438, jul. 1980.

[21] ESLAM, M. et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 1, p. 202–209, jul. 2020.

[22] COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 33–37, jan. 2011.

[23] ÁLVARES-DA-SILVA, M. R. et al. FLI and FIB-4 in diagnosing metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in primary care: High prevalence and risk of significant disease. **Annals of Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 101584, jan. 2025.

[24] MA, W. et al. Association of NAFLD with cardiovascular disease and all-cause mortality: a large-scale prospective cohort study based on UK Biobank. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 13, p. 20406223221122478, jan. 2022.

[25] CHRISTOPHER P. DAY, O. F. W. J. Steatohepatitis a tale of two hits. **GASTROENTEROLOGY**, v. 114, n. 4, 1998.

[26] TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Multiple Parallel Hits Hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836–1846, nov. 2010.

[27] GRIFFIN, J. D. et al. Integrated Action of Autophagy and Adipose Tissue Triglyceride Lipase Ameliorates Diet-Induced Hepatic Steatosis in Liver-Specific PLIN2 Knockout Mice. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1016, 25 abr. 2021.

[28] DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343–1351, 2 maio 2005.

[29] WU, H. et al. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1850–1860, nov. 2016.

[30] GRAFFMANN, N. et al. Modeling Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Immature Hepatocyte-Like Cells Reveals Activation of PLIN2 and Confirms Regulatory Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. **Stem Cells and Development**, v. 25, n. 15, p. 1119–1133, ago. 2016.

[31] SATHYANARAYAN, A.; MASHEK, M. T.; MASHEK, D. G. ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism. **Cell Reports**, v. 19, n. 1, p. 1–9, abr. 2017.

[32] DING, J. et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPARα expression in nonalcoholic fatty liver disease. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13729, 2 set. 2015.

[33] CHOUDHARY, N. S.; DUSEJA, A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, p. 2–2, jan. 2021.

[34] JONAS, W.; SCHÜRMANN, A. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. **Molecular Metabolism**, v. 50, p. 101111, ago. 2021.

[35] ZHU, Y. et al. Hepatocyte Sirtuin 6 Protects against Atherosclerosis and Steatohepatitis by Regulating Lipid Homeostasis. **Cells**, v. 12, n. 15, p. 2009, 5 ago. 2023.

[36] XIN, S. et al. Efficacy of serum miRNA test as a non-invasive method to diagnose nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Gastroenterology**, v. 20, n. 1, p. 186, dez. 2020.

[37] BAFFY, G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1977–1988, 4 dez. 2015.

[38] ZHANG, Z. et al. NAFLD and vitamin D: Evidence for intersection of microRNA-regulated pathways. **Nutrition Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 120–139, jun. 2023.

[39] EZAZ, G. et al. Differential Associations of Circulating MicroRNAs With Pathogenic Factors in NAFLD. **Hepatology Communications**, v. 4, n. 5, p. 670–680, maio 2020.

[40] HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1130–1134, 28 jun. 2007.

[41] WANG, L. et al. miR-34a is a microRNA safeguard for Citrobacter-induced inflammatory colon oncogenesis. **eLife**, v. 7, p. e39479, 13 dez. 2018.

[42] ZHANG, T. et al. Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 7, 31 jan. 2020.

[43] RODRIGUES, P. M. et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 4, p. e2748–e2748, 13 abr. 2017.

[44] CALO, N. et al. Stress-activated *miR-21/miR-21** in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1871–1881, nov. 2016.

[45] FU, X. et al. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 6, p. 2497–2509, 1 jun. 2015.

[46] WIEGAND, C. et al. Stress-associated changes in salivary microRNAs can be detected in response to the Trier Social Stress Test: An exploratory study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7112, 8 maio 2018.

[47] BLAYA, D. et al. Profiling circulating microRNAs in patients with cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. **JHEP Reports**, v. 3, n. 2, p. 100233, abr. 2021.

[48] BLAYA, D. et al. Expression of microRNA‐155 in inflammatory cells modulates liver injury. **Hepatology**, v. 68, n. 2, p. 691–706, ago. 2018.

[49] FENG, L. et al. YY1- *MIR372* -SQSTM1 regulatory axis in autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. 8, p. 1442–1453, 20 ago. 2014.

[50] GE, Y.-Y. et al. MicroRNA-100 promotes the autophagy of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the expression of mTOR and IGF-1R. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 6218–6228, 15 ago. 2014.

[51] RUSTEN, T. E.; STENMARK, H. p62, an autophagy hero or culprit? **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 207–209, mar. 2010.

[52] LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. **Cell**, v. 176, n. 1–2, p. 11–42, jan. 2019.

[53] KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 759–770, jun. 2015.

[54] NISHIMURA, T.; TOOZE, S. A. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 32, 26 maio 2020.

[55] WANG, C. et al. Small-molecule TFEB pathway agonists that ameliorate metabolic syndrome in mice and extend C. elegans lifespan. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 2270, 22 dez. 2017.

[56] BASELLI, G. A. et al. Rare ATG7 genetic variants predispose patients to severe fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 77, n. 3, p. 596–606, set. 2022.

[57] LIN, Y.-C. et al. Variants in the autophagy-related gene IRGM confer susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease by modulating lipophagy. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 6, p. 1209–1216, dez. 2016.

[58] SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1131–1135, abr. 2009.

[59] CAROTTI, S. et al. Lipophagy Impairment Is Associated With Disease Progression in NAFLD. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 850, 17 jul. 2020.

[60] SHROFF, A.; NAZARKO, T. Y. SQSTM1, lipid droplets and current state of their lipophagy affairs. **Autophagy**, v. 19, n. 2, p. 720–723, 1 fev. 2023.

[61] JIANG, Y. et al. Elucidation of SIRT-1/PGC-1α-associated mitochondrial dysfunction and autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v. 20, n. 1, p. 40, dez. 2021.

[62] MAAN, M. et al. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n. 3, p. 582–589, out. 2018.

[63] FENG, L. et al. Sirt1 deacetylates and stabilizes p62 to promote hepato-carcinogenesis. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 4, p. 405, 14 abr. 2021.

[64] MIURA, I. et al. Prevention of non‐alcoholic steatohepatitis by long‐term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice. **Physiological Reports**, v. 9, n. 9, maio 2021.

[65] SAHANI, M. H.; ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. **Autophagy**, v. 10, n. 3, p. 431–441, 3 mar. 2014.

[66] KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[1]. **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, 2 jan. 2021.

[67] NAJT, C. P. et al. Liver-specific loss of Perilipin 2 alleviates diet-induced hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 9, p. G726–G738, 1 maio 2016.

[68] ASIMAKOPOULOU, A. et al. Deletion of Perilipin 5 Protects against Hepatic Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Missing Inflammasome Activation. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1346, 28 maio 2020.

[69] MCMANAMAN, J. L. et al. Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 5, p. 1346–1359, maio 2013.

[70] GARCIA‐MACIA, M. et al. A Mammalian Target of Rapamycin‐Perilipin 3 (mTORC1‐Plin3) Pathway is essential to Activate Lipophagy and Protects Against Hepatosteatosis. **Hepatology**, v. 74, n. 6, p. 3441–3459, dez. 2021.

[71] DAS, S. et al. Purinergic receptor X7 is a key modulator of metabolic oxidative stress-mediated autophagy and inflammation in experimental nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 12, p. G950–G963, 15 dez. 2013.

[72] SHARMA, S. et al. GLP-1 Analogs Reduce Hepatocyte Steatosis and Improve Survival by Enhancing the Unfolded Protein Response and Promoting Macroautophagy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25269, 21 set. 2011.

[73] QIAN, H. et al. Autophagy in liver diseases: A review. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 82, p. 100973, dez. 2021.

[74] TANAKA, S. et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1994–2014, dez. 2016.

[75] RADA, P. et al. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 9, p. 802, 25 set. 2020.

[76] LONGO, L. et al. Gut dysbiosis and systemic inflammation promote cardiomyocyte abnormalities in an experimental model of steatohepatitis. **World Journal of Hepatology**, v. 13, n. 12, p. 2052–2070, 27 dez. 2021.

[77] MICHALCZUK, M. T. et al. Rifaximin on epigenetics and autophagy in animal model of hepatocellular carcinoma secondary to metabolic-dysfunction associated steatotic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 75–90, 27 jan. 2024.

[78] HARRISON, S. A. et al. A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 390, n. 6, p. 497–509, 8 fev. 2024.

[79] SANYAL, A. J. et al. Phase 3 Trial of Semaglutide in Metabolic Dysfunction–Associated Steatohepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 392, n. 21, p. 2089–2099, 5 jun. 2025.

[80] ARMISEN, J. et al. AZD2693, a PNPLA3 antisense oligonucleotide, for the treatment of MASH in 148M homozygous participants: Two randomized phase I trials. **Journal of Hepatology**, v. 83, n. 1, p. 31–42, jul. 2025.

[81] LONGO, L. et al. Redefining the Role of Ornithine Aspartate and Vitamin E in Metabolic-Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease through Its Biochemical Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 6839, 21 jun. 2024.

[82] LANGE, E. C. et al. Ornithine aspartate effects on bacterial composition and metabolic pathways in a rat model of steatotic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 16, n. 5, p. 832–842, 27 maio 2024.

[83] DE FREITAS, L. B. R. et al. Ornithine Aspartate and Vitamin-E Combination Has Beneficial Effects on Cardiovascular Risk Factors in an Animal Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1773, 28 nov. 2022.

[84] PALACIOS-RAMÍREZ, R.; FRANCÉS, D. E.; GARCÍA-MIGUEL, O. M. Autophagy in age-related liver disease. **Geromedicine**, 2025.

[85] WEISKIRCHEN, R.; WEISKIRCHEN, S.; LONARDO, A. Lipid droplet dynamics in metabolic regulation. **RSC Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 517–535, 2026.

[86] HWANG, J. S.; LAI, T. H.; KIM, D. R. Targeting Lipophagy in Liver Diseases: Impact on Oxidative Stress and Steatohepatitis. **Antioxidants**, v. 14, n. 8, p. 908, 24 jul. 2025.

[87] WANG, Q. et al. Exploring the potential mechanisms of OSBPL3 in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by integrating bulk and single-cell RNA sequencing data. **Medicine**, v. 104, n. 52, p. e46273, 26 dez. 2025.

[88] PRIEGO-PARRA, B. A. et al. Triglyceride-glucose-waist circumference index: A powerful tool for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 17, n. 7, 27 jul. 2025.