

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
Departamento de Morfologia

Gabriel Alvim Machado Mendes

**ALTERAÇÕES IMUNOFUNCIONAIS HEPÁTICAS CAUSADAS POR INÓCULO  
VIRAL (MHV3), EM ANIMAIS PORTADORES DE NAFLD E NASH**

Belo Horizonte

2022

Gabriel Alvim Machado Mendes

**ALTERAÇÕES IMUNOFUNCIONAIS HEPÁTICAS CAUSADAS POR INÓCULO  
VIRAL (MHV3), EM ANIMAIS PORTADORES DE NAFLD E NASH**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Morfologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de  
Menezes

Coorientadora: Dra. Maisa Antunes

Belo Horizonte

2022

!  
043  
.

Mendes, Gabriel Alvim Machado.

Alterações imunofuncionais hepáticas causadas por inóculo viral (MHV3), em animais portadores de NAFLD e NASH [manuscrito] / Gabriel Alvim Machado Mendes. – 2022.

70 f. : il. ; 29,5 cm.

!

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes. Coorientadora: Dra. Maisa Antunes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

!

1. Biologia Celular. 2. COVID-19. 3. Fígado. 4. Hepatócitos. 5. Fígado Gorduroso. 6. Infecções. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Antunes, Maisa. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

!

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

### ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GABRIEL ALVIM MACHADO MENDES

Às **quatorze horas** do dia **29 de novembro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ALTERAÇÕES IMUNOFUNCIONAIS HEPÁTICAS CAUSADAS POR INÓCULO VIRAL(MHV3), EM ANIMAIS PORTADORES DE NAFLD E NASH**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	APROVADO
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADO
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de novembro de 2022.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador)

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

*Dedico esse trabalho, aos falecidos; Wanda, Max, Mário e Aparecida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer minha família, em especial meu pai, Flávio, e minha mãe Raquel, pelo apoio diário, assim como toda família na qual busquei o suporte necessário.

A minha namorada, Fabrícia, por ter me ajudado em todas as etapas do trabalho, fazendo o que estava em seu alcance, demonstrando seu apoio direto e indireto, me mantendo resiliente quanto ao meu objetivo e me auxiliando na manutenção da minha saúde mental e emocional. Sou grato também a sua família que me acolheu nos momentos necessários.

Aos meus amigos de infância, Kalil, Du, Gui, Armache, Panda, Fernandão, Morici, Juliano, Jr, André, que me acompanham há mais de uma década.

Aos meus amigos mais recentes, Laerte e André com os quais já há um laço atemporal, independente da cronologia desses encontros.

Ao meu mestre João, e meu professor Luís, os quais, através da dor do crescimento, conseguiram me fazer criar a mentalidade e a capacidade de me manter confortável em momentos de injúria e desgaste que maior parte das pessoas nunca se sujeitaria a passar.

Aos meus orientadores, em especial, Gustavo, o qual me guiou através do método científico, por vezes não da forma que eu gostaria a princípio, mas da forma que eu necessitava, possibilitando meu crescimento pessoal e profissional e meu amadurecimento ao longo desse período. Espero que essa contribuição tenha sido recíproca.

Aos meus colegas do CGB, em especial a Karen, que me acompanhou em praticamente todos os experimentos, a Kassiana, Malu e Brenda pelos momentos lúdicos dentre dos muitos desafiadores, visto que compartilhamos de muitos desafios e momentos de alívio no final desses. À Cris, que me ajudou e auxiliou nos momentos nos quais sozinho eu não conseguiria.

Ao departamento e ao programa de Biologia Celular, e seus professores, pelo domínio técnico do conteúdo e tato humano.

As agencias financiadoras, que permitiram o desenvolvimento do trabalho.

Este trabalho foi realizado no Center for Gastrointestinal Biology, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e BD Bioscience.

## Resumo

Ao final de 2019, o Covid-19 emergiu da China e, em 2020 já era considerada uma doença pandêmica. Enquanto isso, uma pandemia silenciosa se tornava cada vez mais evidente, afetando cerca de uma a cada quatro pessoas, e se tornando uma constante nos prontuários de indivíduos infectados com os piores prognósticos e maiores taxas de ocupação hospitalar. A “Non alcoholic fat liver disease”, antes tida como uma condição inerte, agora alcançava maior relevância. Com o objetivo de caracterizar os espectros dessa doença, e verificar como esta poderia alterar a dinâmica da resposta imune hepática, animais foram submetidos a insultos dietéticos capazes de induzir essas condições e em seguida, infectados com um vírus semelhante ao coronavírus humano, o MHV3. Foi verificado que independentemente do estágio da doença, animais que apresentavam a esteatose hepática com posterior infecção, apresentavam aumento da área necrótica hepática, assim como fibrose em estágio mais avançado e em maior extensão. Junto a isso, notou-se também alteração vascular, dismorfia do parênquima, e alteração da dinâmica populacional no que tange células residentes e ao infiltrado celular. Portanto, em termos de saúde pública, medidas devem ser estruturadas a fim de atentar a população a estes possíveis riscos, efetivando o diagnóstico prévio e incentivando hábitos que mitigariam o desenvolvimento de um quadro mais letal da doença, algo evitável, porém, que acaba por alterar a dinâmica de cuidados hospitalares.

**Palavras-chave:** Covid-19; MHV3; Inóculo; Viral; Mock; CD; CD Mock; CD MHV3; MCDD Mock; Pandemia; Methionine; Choline; HFD; HF; Dieta; High fat; Diet; Infectados; Tolerogênese; Fígado; NAFLD; NASH; Esteatose; KC; Hepatócito.

## **Abstract**

At the end of 2019, Covid-19 emerged from China and, in 2020, it was already considered a pandemic disease. Meanwhile, a silent pandemic became increasingly evident, affecting about one in four people, and becoming a constant in the medical records of infected individuals with the worst prognosis and highest hospital occupancy rates. NAFLD, previously seen as an inert condition, now reached greater relevance. With the objective of characterizing the spectra of this disease and verifying how it could alter the dynamics of the hepatic immune response, animals were submitted to dietary insults capable of inducing these conditions and then infected with a virus similar to the human coronavirus, the MHV3. It was verified that, regardless of the disease stage, animals that presented hepatic steatosis with subsequent infection, presented an increase in the hepatic necrotic area, as well as fibrosis in a more advanced stage and to a greater extent. Along with this, vascular changes, parenchymal dysmorphia, and changes in population dynamics with regard to resident cells and cell infiltrate were also noted. Therefore, in terms of public health, measures must be structured in order to alert the population to these possible risks, carrying out a prior diagnosis and encouraging habits that would mitigate the development of a more lethal condition of the disease, something avoidable, however, that ends up changing the dynamics of hospital care.

**Keywords:** Covid-19; MHV3; Inoculum; Viral; Mock; CD; CD Mock; CD MHV3; MCDD Mock; Pandemic; Methionine; Choline; HFD; HF; Diet; High fat; Infected; Tolerogenesis; Liver; NAFLD; NASH; Steatosis; KC; Hepatic

## LISTA DE SIGLAS

ACTB	Actina beta
AG	Ácidos Graxos
ALT	Alanina Aminotransferase
CD-31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
Ct	Threshold cycle
CXCL-1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
DM2	Diabetes Mellito tipo 2
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE	Hematoxilina Eosina
HF	High Fat
HFD	High Fat Diet
ICG	Indocianina Green
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
KC	Células de Kupffer
LPS	Lipopolissacarídeo
LSECs	Liver Smooth Endothelial Cells
<i>MCD</i>	<i>Methionine</i> choline diet
MCDD	<i>Methionine</i> choline-deficient diet

MEC    Matriz Extracelular

MHV3    Murine Hepatitis Virus 3

NAFLD    *Non-Alcoholic* Fatty Liver Disease

NASH    Non-Alcoholic Steato Hepatitis

Nfkb    *Non-alcoholic* fatty liver disease

NK    Natural Killer

NKT    Natural Killer T

NO    Óxido Nitrico

PCR    Polymerase Chain Reaction

qPCR    quantitative PCR

RNA    Ribonucleic Acid

RPL4    Ribosomal Protein L4

SARS-CoV-2    Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavírus-2

TGF- $\beta$     Fator de Crescimento Transformante beta

TNF    Fator de Necrose Tumoral

## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1-O fígado.....	14
1.2-A anatomia do Sistema Imune Hepático.....	16
1.3-A imunidade inata do fígado.....	16
1.4-Epidemiologia da NAFD e NASH.....	18
1.5-Diagnóstico.....	19
1.6-Fatores de risco e patologia .....	19
1.7-Covid-19.....	23
<b>2.JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
3.1-Objetivo geral.....	24
3.2-Objetivos específicos .....	24
<b>4.MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>25</b>
4.1- Animais experimentais.....	25
4.2-Dietas para indução de NAFD e NASH.....	25
4.3-Microscopia confocal.....	26
4.4-Ensaio de atividade da ALT.....	26
4.4.1-Teste de função hepática.....	27
4.5-Infecção com o MHV3.....	27
4.5.1-Teste de sobrevivência.....	27
4.6-Análises.....	27
4.6.1-Análise estatística.....	27
4.6.2-Análise histológica.....	28
4.6.3-Análise de imagem.....	28
4.7-Método de Folch.....	28
4.8-Dosagem de TG e colesterol.....	29

4.9-Análise da expressão genica por rT-qPcr.....	29
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
5.1-Ambas dietas induzem diferentes formas de esteatose hepática.....	31
5.2-A dieta HF é capaz de alterar a dinâmica das células residentes hepáticas.....	33
5.3-Ambos insultos dietéticos induzem lesão e disfunção.....	35
5.4- As dietas HF e MCD alteram a dinâmica do infiltrado celular hepático, a morfologia do parênquima e a deposição de colágeno.....	38
5.5-Padronização do inoculo viral.....	39
5.6-O MHV3 é capaz de induzir um deposito anormal de lipídeos no fígado.....	40
5.7-OMHV3 induz morte das KC e necrose em animais mais velhos.....	41
5.8- O insulto viral causa dano independentemente da idade dos animais, porém, animais mais velhos são mais propensos a disfunção.....	43
5.8.1-O MHV3 induz deposição anormal de colágeno nas regiões periportais e parênquimas de animais de ambas as idades.....	45
5.9-O MHV3 diminui a deposição de lipídeos de animais alimentados com dieta MCD.....	46
5.9.1-A dieta HF "prima" o fígado para o dano potencial do inoculo viral.....	48
5.9.2-A dieta MCD potencializa o dano induzido pelo vírus, enquanto a dieta HF permite a progressão da disfunção do inoculo.....	51
5.9.3-Ambas as dietas alteram a dinâmica da resposta imune hepática ao vírus, o que modifica o tônus do infiltrado celular, o grau de lesão e o deposito de colágeno.....	52
5.9.4-As gotículas lipídicas induzem alteração vascular e celular, através de mecanismos mecânicos.....	56
5.9.5-As gotículas lipídicas se co-localizam com os cordoes de hepatócitos viáveis.....	56
5.9.6-Cada estágio da doença, assim como idade do animal, induz diferentes modificações na expressão genica de citocinas estruturais da resposta imune hepática.....	57

<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 - O fígado**

O fígado é um dos maiores órgãos, e a maior glândula do corpo, localizado na cavidade abdominal, no quadrante superior direito, sendo protegido pela caixa torácica e pelo diafragma. Pesa cerca de 1.5 kg em um indivíduo adulto, o que representa cerca de 2,5% do peso corporal, e exerce uma gama de funções no organismo (Moore and Dalley, 2022). O fígado foi caracterizado, primordialmente, como um órgão metabólico, uma vez que apresenta funções no metabolismo dos macronutrientes (lipídeos, proteínas e gorduras), na excreção da bile (líquido amarronzado que auxilia na emulsificação de lipídios), na regulação do volume sanguíneo, na homeostase glicêmica e na detoxificação de substâncias nocivas ao organismo. (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017; Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Liew and Kubes, 2016)

Quanto a seu papel na detoxificação, o fígado age em várias frentes, sendo capaz de realizar a conversão de compostos lipofílicos tóxicos, em compostos polares, inativando-os. Isso facilita a excreção deste tipo de molécula por meio da bile (Boron and Boulpaep, 2017). Além disso, o tecido hepático é o maior local de produção de glutathione, poderoso antioxidante que auxilia nos mecanismos de proteção celular, quando há dano causado por radicais livres, por exemplo. (Boron and Boulpaep, 2017).

Seu papel no metabolismo é crítico, pois, além de processar todos os macronutrientes, também tem a capacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio, assim como participa da síntese de glicose em momentos de estresse energético (gliconeogênese), o que o faz ser um importante regulador da homeostase glicêmica. Junto a isso, tem a capacidade de processar e exportar lipídeos que serão armazenados em diferentes órgãos do corpo, tendo papel chave no metabolismo da maior parte dos aminoácidos (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017; Boron and Boulpaep, 2017). Macroscopicamente, o fígado é dividido em lóbulos, que são estruturas formadas por alongados cordões de hepatócitos, organizados em forma de losangos, que caracterizam a micro anatomia hepática, envolvendo a veia central (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017). No feto, além de seu papel metabólico, o fígado apresenta funções complementares, sendo essencial no processo hematopoiético, representando quase o dobro do peso proporcional ao adulto. Isso

pode ocorrer em função do maior número de populações celulares locais (Boron and Boulpaep, 2017).

Devido a esta dinâmica, regiões diferentes do lóbulo estão expostas a concentrações de substratos e oxigênio diferentes, portanto, devido a essa variação ondulatória no gradiente de substâncias ao longo do tecido, populações celulares de diferentes regiões apresentam perfil metabólico distinto. Assim, percebeu-se a presença de “zonas hepáticas”, em que as células de diferentes regiões dos lóbulos apresentam variadas expressões de genes, que se relacionam com o substrato, conseguindo os processar de maneira mais eficiente (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017). Os hepatócitos periportais apresentam metabolismo caracteristicamente mais oxidativo, devido aos diferentes gradientes de substrato, enquanto os hepatócitos das regiões pericentrais são predominantemente detoxificadores de drogas (Boron and Boulpaep, 2017).

Dentre as populações de células encontradas no fígado, a que se caracteriza, principalmente, por suas funções no âmbito metabólico, são os hepatócitos, população de células epiteliais que correspondem a 80% das células presentes no órgão. Outra população celular essencial para manter a dinâmica funcional hepática, principalmente no que diz respeito ao processo de emulsificação e detoxificação, são os colangiócitos, responsáveis por manter a estrutura e homeostase dos ductos biliares. Além dessas populações epiteliais, também estão presentes, as células estreladas e as células endoteliais sinusoidais (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017).

As células estreladas do fígado existem na forma quiescente e ativada. Na forma quiescente, sua principal função é a de armazenar vitamina A, na forma de Ácido Retinóico, nas gotículas lipídicas; na forma ativada, que geralmente ocorre durante insultos ao tecido hepático, as células estreladas perdem progressivamente o estoque de vitamina A e começam a liberar colágeno, que se deposita no tecido, levando à formação de tecido fibroso e, muitas vezes, à disfunção hepática por formação de fibrose de forma mais acentuada. Uma das características anatômicas do fígado, que é imprescindível a suas funções, é sua estrutura, que permite uma passagem mais lenta do sangue recebido devido a uma organização sinusoidal peculiar, diminuindo a pressão interna através da qual as substâncias fluem pelo órgão. Por este evento são responsáveis as células endoteliais sinusoidais que, por meio da formação de poros,

mantêm uma dinâmica organizacional que permite a troca de informações e substâncias entre os meios, mas sem permitir a passagem de substâncias indesejadas, mantendo as barreiras funcionais (Trefts and Gannon and Wasserman, 2017; Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Liew and Kubes, 2016).

### **1.2- A anatomia do Sistema Imune Hepático**

A partir do começo do século, tem se dado maior atenção às funções imunes desse sistema, visto que ele apresenta uma grande população de células imunes especializadas, e uma formação anatômica que favorece o funcionamento dessas células (Liew and Kubes, 2016). Cerca de 80% do fluxo sanguíneo que irriga o fígado é advindo do trato gastrointestinal, por meio da circulação portal; os outros 20% do sangue circulam por meio da artéria hepática, sendo que cerca de 20 a 25% do "output" cardíaco (1-2L por minuto) passam pelo fígado (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009) Este grande fluxo, que tem como fonte o meio externo, além de ser rico em nutrientes, é rico em patógenos e moléculas não desejadas que, se chegarem à circulação sistêmica, podem apresentar grande risco para a homeostase do organismo (Liew and Kubes, 2016). Com relação à circulação intra-hepática, cerca de 60% do volume sanguíneo do fígado está nos vasos calibrosos, e 40% nos vasos sinusoidais, por meio de um sistema de perfusão de baixa pressão (Boron and Boulpaep, 2017). Na circulação intra-hepática, a micro vascularização é diferente das demais, a disposição e morfologia de seus sinusoides fazem com que o sangue circule de maneira mais lenta em seus capilares, o que permite um maior tempo de contato de sua população de células especializadas com patógenos em circulação, favorecendo a detecção, captura e destruição de organismos invasores.

### **1.3- A imunidade inata do fígado**

Apesar de já ter sido mencionado que os hepatócitos têm suas principais funções relacionadas ao âmbito metabólico, ultimamente, devido a um maior interesse nos aspectos imunológicos do fígado, tem se notado funções desta população também na regulação da resposta imune, principalmente pela expressão de receptores para células imunológicas, síntese de citocinas e substâncias do sistema de complemento (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009).

Para desempenhar seu papel de barreira a agentes invasores, o fígado abriga um grande número de células não parênquimas, especializadas no processo de captura e destruição de microrganismos invasores. No que diz respeito a seu papel imune, o fígado exerce suas funções, principalmente, por meio da resposta imune inata, com diferentes grupos de células (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009).

As células de Kupffer (KC), que são células centrais do sistema de fagocitose mononuclear, correspondem a cerca de 90% dos macrófagos residentes do corpo e são as células imunes em maior abundância no fígado, representando cerca de 35% de todas as células não parênquimas (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009). Essas células estão localizadas dentro dos sinusóides, bem próximas ao parênquima hepático, e funcionam como filtros para substâncias indesejadas e patógenos que ali circulam, além de ser fonte de citocinas e receptores que regulam a dinâmica de resposta do tecido (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009).

Em um estado fisiológico, as células de Kupffer apresentam características tolerogênicas, pois estão em contato frequente com materiais e corpos estranhos, advindos, principalmente, do trato gastrointestinal (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Trefts and Gannon and Wasserman, 2017). Se, nesse momento, essa população apresentar reações inflamatórias exacerbadas, pode haver dano e lesão aos hepatócitos da região (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Tiegs and Lohse, 2010). Em condições patológicas, as células de Kupffer podem perder essa capacidade discriminatória, apresentando perfil imunorreativo exacerbado, causando dano e disfunção hepatocelular. Além das KC, o fígado também abriga outras populações de células imunes, responsáveis por manter a homeostase tecidual. É no tecido hepático que as células Natural Killer (NK) se apresentam em maior densidade, apontando suas respostas por meio do reconhecimento de ligantes de superfície de células danificadas e infectadas, liberando citocinas como o Interferon  $\gamma$  e grânulos contendo perforina e granzima. O fígado também apresenta linfócitos capazes de patrulhar, de forma ativa, sua vasculatura em busca de organismos invasores, as células NKT, que realizam seus movimentos pelo tecido, até mesmo contra o fluxo sanguíneo (Kubes et al, 2018).

Apesar de apresentar uma gama de células residentes que orquestram a resposta imune local, em situações específicas, é necessária a migração de células para o tecido hepático. Em situações fisiológicas, os granulócitos são pouco presentes no

fígado, sendo os neutrófilos, que são células polimorfonucleares de função paradoxal, sua maioria (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Kubes et al, 2018). Em momentos de lesão no tecido ou infecção, células do fígado, como os macrófagos, liberam substâncias e expressam marcadores que são responsáveis por atrair, principalmente, os neutrófilos para o tecido, com o intuito de restabelecer a homeostase local (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Jaeschke and Hasegawa, 2006) . Além disso, o fígado também exerce um papel de regulação da imunidade sistêmica, uma vez que tem a capacidade de sequestrar neutrófilos ativados e plaquetas disfuncionais da circulação, e estimular sua apoptose no tecido, reiterando seu papel de manter o perfil tolerogênico do organismo, evitando respostas inflamatórias supérfluas (Nemeth and Baird and O'Farrelly, 2009; Kubes et al, 2018)

Além da resposta via células imunes, as células endoteliais sinusoidais auxiliam na tolerogênese hepática, uma vez que a exposição crônica ao Lipopolissacarídeo (LPS) as torna hiporresponsivas a este estímulo, mantendo a resposta adequada a tipos celulares específicos, bem como a supressão de respostas pro-inflamatórias das células de Kupffer. Essa manutenção tolerogênica se dá por meio da diminuição da expressão de Nfkb, alterando o mecanismo de adesão dos leucócitos, evitando reações hiperbólicas, desnecessárias e deletérias (Shetty and Lalor and Adams, 2018).

#### **1.4- Epidemiologia da NAFLD e NASH**

A Non Alcoholic Fat Liver Disease (NAFLD), ou Esteatose Hepática não Alcoólica, é a principal patologia que acomete o fígado, e se caracteriza por um depósito anormal de lipídeos no tecido hepático. É a causa mais comum de doenças hepáticas crônicas no Ocidente, afetando cerca de 25% da população mundial. Como é uma doença silenciosa, há dificuldade no seu diagnóstico, sendo os sintomas percebidos quando a doença já está em um nível de progressão avançado. Não somente isso, mas, em um estado mais avançado da Non-Alcoholic Steato Hepatitis (NASH), há um aumento na necrose hepática e na inflamação local, junto à formação de fibrose, comprometendo a função do tecido, que ainda pode evoluir para um estágio de carcinoma hepatocelular (Friedman et al, 2018).

Nos Estados Unidos e na Europa, a NAFLD geralmente acomete pacientes obesos, que apresentam Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 25. Já na Ásia, existe uma parte considerável da população que apresenta NAFLD, com IMC dentro do normal,

o que reitera a dificuldade no diagnóstico da doença, principalmente nessa Região (Friedman et al, 2018).

Devido ao fato de se tratar de uma doença silenciosa, em cerca de 35 a 50% dos carcinomas hepatocelulares que evoluem da NASH, os pacientes não apresentavam sintomas e sinais claros para levantar a possibilidade de uma busca por diagnóstico prévio do câncer. Sendo assim, no momento do diagnóstico, o tumor e o estágio da doença já estavam em níveis avançados e, muitas vezes, com menos possibilidade de recuperação do paciente. Apesar disso, os pacientes que apresentam NAFLD têm o dobro de chance de ir a óbito devido a doenças cardiovasculares, do que hepáticas, demonstrando o potencial de acometimento dessa doença, em tecidos extra-hepáticos (Friedman et al, 2018).

### **1.5- Diagnóstico**

A NAFLD por si só, em seus estágios precoces, não apresenta um problema de grande magnitude. O agravante real é seu difícil diagnóstico, em praticamente todas as fases da doença. O método diagnóstico de maior precisão é a Biópsia Hepática, enquanto outros métodos, como a Tomografia Computadorizada e a Ressonância Magnética, apesar de serem relativamente eficazes, principalmente a Ressonância Magnética, são métodos de maior custo. Na NASH o espectro diminui ainda mais, sendo a biópsia e os testes de Elastografia os únicos com um percentual aceitável de acerto (Friedman et al, 2018).

### **1.6 - Fatores de risco e patologia**

A Síndrome Metabólica, que se caracteriza por obesidade central, hiperglicemia e hipertensão, favorece o aparecimento da NAFLD. Deve-se levar em consideração o fluxo bidirecional dessas condições, uma vez que a NAFLD pode levar a condições que favoreçam o desenvolvimento de Diabetes Mellito tipo 2 (DM2), assim como pode se caracterizar por uma diminuição da sensibilidade periférica à insulina. Além disso, também favorece a deposição de lipídeos no tecido hepático, após ocorrer um efluxo de lipídeos do tecido adiposo e um influxo de glicose para o fígado (Friedman et al, 2018).

Apesar de se acreditar que a NASH era somente uma progressão da NAFLD, já se provou que não é tão simples assim. Pode ser que a NASH tenha se desenvolvido de maneira a não apresentar previamente, sinais de esteatose. Esse depósito anormal

de lipídeos no fígado ocorre por vários fatores, dentre eles fatores genéticos (polimorfismo no gene PNPLA3), que alteram o metabolismo lipídico hepático, e fatores ambientais (Friedman et al, 2018).

Basicamente, devido a um acúmulo de energia, esta deve ser depositada de forma eficiente, e a melhor forma é por meio dos lipídeos. Essa relação de oscilação é evidente, uma vez que, em déficit calórico, ocorre diminuição da formação desses lipídeos hepáticos. Importante salientar que a deficiência de alguns micronutrientes acelera a progressão da doença, devido a seu papel na formação de antioxidantes que neutralizariam parte das espécies reativas formadas pelo acúmulo, principalmente de lipídeos livres (Friedman et al, 2018).

Nota-se que os “inputs” energéticos são realizados por meio de carboidratos, lipídeos e proteínas. Uma vez que o organismo está sobrecarregado de energia, e o fígado é um dos principais responsáveis pelo metabolismo energético, inicia-se o depósito de lipídeos em seu parênquima. Porém, é importante salientar que a capacidade do fígado em metabolizar a energia é plástica, uma vez que animais que apresentam perda de peso em modelos para indução de NASH, ainda apresentam esteatose (Rinella et al, 2008).

Como mencionado anteriormente, a Síndrome Metabólica é o maior fator de risco para o desenvolvimento da NAFLD. Essa Síndrome se caracteriza, principalmente, pela perda da sensibilidade periférica à insulina e ao desenvolvimento de obesidade central, o que favorece um aumento de citocinas inflamatórias, por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral (TNF), que aumenta ainda mais essa resistência periférica à insulina. Uma vez que os tecidos periféricos perdem a capacidade de responder a esse hormônio da forma adequada, os músculos perdem a capacidade de captar glicose e o tecido adiposo não consegue manter seus ácidos graxos (AG) esterificados, liberando-os para a circulação. Esta hiperglicemia e aumento de AG circulantes são compensados por um aumento de sua captação pelo fígado, que não consegue lidar de maneira eficiente com esse excesso de nutrientes aos quais está sendo exposto. À medida que há esse aumento dos AG livres no fígado, aumenta o estresse oxidativo lipotóxico local, causando danos hepatocelulares e alterando o perfil de células imunes locais, que passam a apresentar perfil mais reativo e menos tolerogênico, prejudicando não somente as respostas hepáticas, mas também

aumentando a imunorreatividade colateral em todo o organismo. (Friedman et al, 2018; Dixon et al, 2013).

Enquanto anteriormente acreditava-se que o acúmulo de triglicerídeos no fígado era o fator de maior causalidade da patologia, hoje essa hipótese já não faz muito sentido. As gotículas de triglicerídeos se formam paralelamente ao aumento da lipotoxicidade hepática, não sendo a causa em si. Isso é demonstrado uma vez que o desenvolvimento da NASH independente do acúmulo de gotículas de triglicerídeos e, ironicamente, essa formação pode apresentar papel protetor. A formação das gotículas de triglicerídeos podem representar um meio de confinar possíveis substratos lipídicos tóxicos em corpos inertes, não reativos. Porém, se esses lipídeos não forem exportados de maneira eficaz, podem se tornar fonte de mediadores inflamatórios. O depósito excessivo de gotículas lipídicas apresenta suas consequências, podendo comprometer a vasculatura hepática, de forma a comprimila, causando isquemia tecidual e inflamação. Como mencionado, um dos principais fatores que acompanham a NASH é a resistência à insulina, de forma que o fígado não é o órgão mais comprometido. A patogênese da NASH se caracteriza principalmente pela falta de sensibilidade insulínica do tecido adiposo, característica que reforça a ideia da lipotoxicidade por intermediários dos AG. A partir do momento que o tecido adiposo se torna não responsivo à insulina, liberando cada vez mais AG na circulação. Esse efluxo de AG é captado pelo fígado que, progressivamente, perde a capacidade de lidar com os AG. Após esse influxo hepático de lipídeos, o fígado passa a produzir, por conta própria, ainda mais AG, devido à captação aumentada de glicose. Inundado por substratos com potencial tóxico, acentua-se o processo de lesão hepatocelular, causando disfunção e alterando o perfil característico do fígado, antes o regulador da tolerância do organismo. Progressivamente torna-se um retro alimentador no processo de lipotoxicidade, com suas células imunes não somente disfuncionais, mas com potencial pro-inflamatório exacerbado e não necessário (Cusi, 2009; Cusi, 2012).

Os hepatócitos, sendo sobrecarregados por esse imenso fluxo de AG, passam a produzir mais espécies reativas devido ao aumento da atividade mitocondrial, diminuindo o estoque hepático de antioxidantes. O desequilíbrio no Sistema Redox estimula a mudança de estado das células endoteliais dos sinusóides hepáticos, que passam por um processo chamado capilarização, perdendo suas fenestras, o que

resulta na incapacidade dos hepatócitos em exportar suas lipoproteínas e na diminuição da síntese de óxido nítrico, essencial para manter o estado quiescente das células estreladas (Maslak and Gregorius and Chlopicki, 2015). O aumento de colesterol e ácidos graxos livres no tecido, eleva a lipotoxicidade local, ativando as Células de Kupffer, que passam a liberar mais TNF, IL-1b e Interleucina 6 (IL-6) (Prieur and Röszer and Ricote, 2010). Esse “input” inflamatório ativa as células estreladas hepáticas, estimulando o depósito exacerbado de colágeno, o processo de capilarização das Liver Smooth Endothelial Cells (LSEC's) e a síntese de Fator de Crescimento Transformante beta (TGF-b) (Deleve, 2015). O TGF-b aumenta ainda mais a migração das células estreladas e também estimula a apoptose de mais hepatócitos, contribuindo para a fibrogênese (Kumar, 2021; Shetty and Lalor and Adams, 2018).

É por meio da liberação de Oxido Nítrico (NO) que as LSECs não capilarizadas regulam a quiescência das células estreladas, a ativação das Células de Kupffer e a homeostase do metabolismo de lipídeos e glicose no fígado. Uma vez que deficiência de NO resultou em formação exacerbada de gotículas lipídicas no tecido. Esses dados reiteram a importância desse radical na manutenção da homeostase hepática (Maslak and Gregorius and Chlopicki, 2015).

Dentre as células imunes do fígado, são essenciais ao processo de resposta e até mesmo na progressão da doença, as Células de Kupffer, peças-chave na regulação do perfil tolerogênico hepático. Progressivamente ao acúmulo de gotículas lipídicas, os macrófagos alteram seu perfil, tornando extremamente reativos contribuindo para um maior dano colateral. Além de responder a mediadores inflamatórios liberados por outras células ativadas, os macrófagos respondem diretamente ao excesso de compostos lipídicos no fígado. Isso é verificado, por exemplo, em modelos de indução de NAFLD, via dietas com alto percentual de gordura, onde a depleção das KC's contribuiu para a resolução da doença. (Dixon et al, 2013; Prieur and Röszer and Ricote, 2010)

Por meio da liberação acentuada de TNF e da diminuição da liberação de Interleucina 10 (IL-10), os macrófagos ativados são capazes de diminuir a sensibilidade periférica à insulina e alterar a polarização de outras populações celulares, aumentando o potencial lipotóxico em todo o organismo (Yazici and Sezer, 2017).

Uma das principais características que determinam a progressão da NAFLD para a NASH é o depósito anormal de matriz extracelular, formando áreas de fibrose que, ao longo do tempo, alteram a capacidade funcional do órgão. Durante a patogênese da doença, os macrófagos aumentam a liberação de TNF, e diminuem a síntese de citocinas reguladoras e imunossupressoras. O aumento da expressão de TNF no tecido demonstrou-se essencial no recrutamento de granulócitos, como os neutrófilos, que acabam por aumentar o dano colateral no tecido, além de auxiliar no processo de fibrogênese tecidual. Sendo essencial na manutenção desse processo, a IL-10 age de forma direta e indireta na regulação da fibrogênese hepática, podendo agir na linha de frente, inibindo a síntese de colágeno pelas células estreladas e estimulando a remodelação tecidual em um momento de resolução, induzindo a síntese de enzimas proteolíticas, como por exemplo, a colagenase. Ao mesmo tempo orquestra todo o processo, uma vez que regula a expressão de TGF- $\beta$  e o TNF. O papel da IL-10 nos processos descritos vem se tornando cada vez mais preponderante, visto que controla a senescência das células estreladas hepáticas e a apoptose das já ativadas (Huang et al, 2020; Kumar 2021)

Células endoteliais dos sinusóides hepáticos também participam do processo fibrogênico do tecido. Durante o início do processo, suas fenestras acabam sendo preenchidas pela Matriz Extracelular (MEC), principalmente por glicosaminoglicanos, danificando-as. O dano causado às células endoteliais estimula a polarização dessas células para um perfil pró-inflamatório, estimulando a liberação de TGF- $\beta$ . Como consequência, essas células perdem a capacidade de remodelação do tecido fibroso, além de estimular as células estreladas a liberar ainda mais matriz (Deleve, 2015)

### **1.7 - Covid-19**

O Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) é um Coronavírus que induz à COVID-19, que ao emergir da China em 2019, infectou milhões de pessoas em todo o mundo, sendo caracterizada como uma doença pandêmica, pela Organização Mundial da Saúde - OMS, em março de 2020 (Sachdeva et al, 2020).

Dos pacientes infectados, uma minoria apresenta sintomas graves e necessidade de internação. Aparentemente, a progressão da doença se dá de formas mais graves em obesos e pessoas com outras comorbidades metabólicas porém, recentemente, pesquisas têm demonstrado que, independentemente da presença de obesidade, a

NAFLD, por si só, já é capaz de alterar o prognóstico e a severidade da doença. Enquanto pacientes eutróficos infectados com o SARS-COV-2 não apresentam dano hepático significativo, pacientes acometidos por doenças hepáticas como a NAFLD e NASH, apresentam alterações desproporcionais na função e aumento no dano hepatocelular (Sachdeva et al, 2020).

As doenças do espectro da NAFLD são caracterizadas por serem de difícil diagnóstico, de forma que, até em estados avançados da doença, a mesma apresenta-se assintomática. Muitas vezes, o diagnóstico se torna mais claro somente quando o paciente já apresenta sinais de cirrose ou hepatocarcinoma, sendo este o momento com menos vias terapêuticas eficazes (Friedman et al, 2018)

Devido ao fato da NAFLD se tratar de uma pandemia silenciosa, uma grande parcela da população pode estar acometida por esta doença e não perceber que carrega consigo um fator de risco para o desenvolvimento de uma forma mais grave e letal do Covid-19. Com o intuito de compreender os mecanismos imunes que orquestram essa maior susceptibilidade e, a partir disso, ampliar a possibilidade para criação de novas medidas terapêuticas, foi desenvolvido um modelo de indução de NAFLD e NASH em camundongos posteriormente infectados com um inóculo viral semelhante ao Corona vírus humano, o Murine Hepatitis Virus 3 (MHV3).

## **2. Justificativa**

Evidências sugerem que comorbidades preexistentes – como sobrepeso, diabetes e hipertensão – predispõem o indivíduo a um quadro mais grave da doença. Assim, é imprescindível entender se, de fato, indivíduos com NAFLD e suas variações são mais susceptíveis aos Coronavírus, bem como os mecanismos envolvidos na susceptibilidade e potenciais agentes terapêuticos (Mahamid et al, 2021).

## **3. Objetivos**

### **3.1 - Objetivo geral**

- Investigar a proliferação hepática do Coronavírus e possíveis intervenções terapêuticas em grupos de risco aumentado por comorbidades hepáticas.

### **3.2 Objetivo específico**

- Estabelecer modelo de infecção por coronavírus murino;
- Estabelecer diferentes modelos de indução de comorbidades hepáticas;

- Verificar como se dá a interação entre o organismo infectado e as comorbidades que o afetam;
- Elucidar os mecanismos envolvidos na susceptibilidade a infecções observadas durante quadros de esteatose hepática, utilizando uma combinação de imageamento in vivo e análises bioquímicas.

#### **4. Material e método**

##### **4.1 - Animais experimentais**

Os animais utilizados na pesquisa foram camundongos machos de 4 semanas, da linhagem C57/BL6, advindos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Os animais foram acondicionados em micro isoladores de polipropileno Alesco, no Biotério do Centro de Biologia Gastrointestinal e tiveram água e ração correspondentes Ad libidum, tendo temperatura, umidade e luz reguladas com ciclo claro/escuro de 12 em 12h. Todos os procedimentos realizados de eutanásia e tratamento estão de acordo e detalhados com o CEUA no protocolo 163/2021.

##### **4.2 - Dietas para indução de NAFLD e NASH**

Para indução de cada uma das patologias, foram utilizadas dietas e protocolos diferentes. Para NAFLD, os animais foram alimentados por dezesseis semanas, com uma dieta com alto teor de gordura (40%kcal lipídeos, 40%kcal carboidratos e 20%kcal proteínas), sendo o óleo de palma a principal fonte lipídica. Esta dieta foi fornecida pela Research Diet. Para indução da NASH, foi utilizada uma ração deficiente em componentes-chave do metabolismo hepático (Metionina e Colina), fornecida pela RHOSTER (Dieta DMC RHOSTER), durante três semanas.

Para cada dieta experimental foi utilizada a dieta controle em seu respectivo tempo de alimentação, a qual apresentava 10% de suas calorias advindas de lipídeos (Normonutricional).

## DIETA DMC INDUTORA DE NASH(RH19524E)

visualização dos sinusoides hepáticos foi utilizado o anticorpo anti-CD3 (2µg por animal) conjugado com o polímero BD Horizon Brilliant™ Violet com emissão em 421 nanômetros (BV421), anticorpo anti-F4/80 (conjugado com APC)(2µg por animal, Becton Dickinson, BD) para células de Kupffer e anticorpo anti-GR-1 conjugado com PE(4 µg por animal).Após 5 minutos, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil; 60mg/Kg e 15mg/Kg, respectivamente) e laparatomizados na linha média para exposição e retirada do fígado (ex vivo). *Feito isso*, uma solução de Bodipy (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boron, 1mg/ml, diluído em DMSO) foi depositada diretamente sob o fígado (1µg/por animal) para marcação fluorescente de gotículas lipídicas neutras. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1R equipado com detector espectral (Nikon Shinagawa, Tokyo, Ja)

### **4.4- Ensaio de atividade da Alanina Amino Transferase (ALT)**

Uma maneira indireta de verificar lesão no tecido hepático é por meio da presença aumentada da enzima ALT no plasma. Para isso foi realizado um teste cinético (Bioclin). Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 15.000 RPM por 10 minutos em ambiente resfriado, para coleta do soro. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, podendo ou não haver necessidade de diluições, dependendo do grupo experimental específico, junto com o substrato (Tampão Tris pH7,8. LDH, L-alanina, NaCl e Azida Sódica) e coenzimas (Alfacetogluturato, NADH e Azida Sódica), ambos fornecidos pelo fabricante. A placa contendo as amostras foi

mantida a 37°, por 50 segundos, e então foi lida num espectrofotômetro (340nm) a 37°, em intervalos de um minuto, durante quatro minutos.

#### **4.4.1 Teste de função hepática**

Para verificar a função hepática, no que diz respeito à sua função de depuração, foi utilizado o teste de Indocyanine Green (ICG), que é um corante de Cianina, administrado no animal por via venosa, de acordo com o peso do animal a ser analisado(20mg/KG). Sua variação no sangue do animal corresponde à capacidade de filtração e perfusão hepática (ICG; Sigma Missouri, USA). Uma vez que há um aumento em relação ao controle, há um indício de disfunção no que tange ao funcionamento hepático ou seu aporte sanguíneo (indício de alteração vascular). Após 10 minutos, o sangue é coletado e centrifugado. O ensaio é realizado em uma microplaca de 96 poços após diluição, e lido em um espectrofotômetro (800nm).

#### **4.5 Infecção com o MHV3**

Os animais foram sutilmente anestesiados com uma mistura de Xilazina (8-15mg/kg) e Ketamina (60-80mg/kg), para permitir a indução viral, via nasal, como forma de mimetizar a infecção pelo Coronavírus humano. Os animais receberam uma solução nasal contendo 30ul de Salina, a qual continha, ou não (Mock), partículas virais que poderiam variar quantitativamente de  $10^1$  até  $10^3$  PFU (Unidades formadoras de placa). Após a inoculação, os animais eram acompanhados até que voltassem ao seu estado fisiológico de consciência e, posteriormente, acondicionados no biotério.

Todos procedimentos foram realizados dentro do fluxo para ideal controle biológico, assim como o material utilizado foi descartado corretamente e/ou autoclavado.

#### **4.5.1 Teste de sobrevivência**

A fim de verificar a capacidade do animal de responder a diferentes doses de inóculos foram conduzidos testes com o propósito de verificar o tempo de sobrevivência pós infecção. Para isso, grupos experimentais foram inoculados com diferentes proporções virais, e seus respectivos grupos controles receberam volume de salina na proporção semelhante. Os animais foram acompanhados por 15 dias após o insulto, e os resultados foram computados.

#### **4.6 Análises**

##### **4.6.1 Análise estatística**

A análise estatística realizada, assim como o desenvolvimento dos gráficos foi feita por meio do software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad software, Inc). Os valores foram expressos como média das amostras, e dois grupos foram considerados estatisticamente significativos quando  $P \leq 0,05$ . O teste estatístico utilizado nesse estudo foi o Teste T de Student.

#### **4.6.2 Análise histológicas**

Apos anestesiados e não responsivos, os animais foram sacrificados e o fígado foi coletado e fixado em formaldeído, a 4% em solução salina de tampão fosfato, pH 7,4 (PBS), desidratado em álcool e incluído em parafina. Em seguida, cortes de 4 micrometros de espessura foram feitos em um micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), e Tricrômico de Masson (TM). A lâmina hepática foi analisada utilizando um microscópio Olympus BX40, por meio de objetivas de 4x, 10x e 20x, visto que cada objetiva apresentava uma ferramenta adequada para a visualização do fenômeno apresentado.

Objetivas de 10x e 20x foram utilizadas primordialmente para distinguir os fenômenos celulares observados via HE. Para se obter uma visualização mais ampla do dano tecidual e da alteração parenquimal em termos de extensão, fez-se o uso da objetiva de 4x, em laminas marcadas com TM.

#### **4.6.3 Análise de imagens**

As imagens foram analisadas de forma semiautomática utilizando o software ImageJ. A área de gordura foi calculada no que tange ao percentual do campo caracteristicamente preenchido pelos lipídios, podendo ser visualizados pela marcação específica em relação a área total da imagem adquirida através da técnica de microscopia confocal, enquanto a quantificação de células foi feita de maneira absoluta de acordo com a suas respectivas morfologias, manualmente.

#### **4.7 Método de Folch**

Para a extração de lipídios do fígado utilizamos esse método, que tem como princípio a solubilização dos lipídios via metanol e clorofórmio, seguida da precipitação destes para sua extração. O protocolo consistiu na coleta de 200 mg de fígado, seguida de solubilização em uma Solução de Extração (Clorofórmio + Metanol 2:1), filtragem e

centrifugação do líquido restante após adição de uma solução salina (Cloreto de Sódio 0,9%). Ao final, os lipídios extraídos e solubilizados em uma fase no tubo Falcon foram retirados e transferidos para um tubo Eppendorf de 2 ml. Dessa forma, foram deixados em uma Capela de Exaustão para evaporação da fase líquida dessa solução e, assim, ao final desse processo, os lipídios se encontram precipitados no fundo do tubo Eppendorf. Finalmente, os lipídeos foram pesados (levando em consideração o peso do tubo Eppendorf vazio) e seguiram para o passo posterior.

#### **4.8 Dosagem de Triglicerídeos e Colesterol**

As dosagens de Triglicérides e Colesterol foram realizadas no fígado dos camundongos. Para essas medições, foram utilizados testes cinéticos (Bioclin). As amostras de fígado foram coletadas e processadas conforme método de Folch. O ensaio consiste na degradação de triglicerídeos e colesterol na presença de um reagente enzimático próprio (fornecido no kit). Este, foi realizado em uma microplaca de 96 poços sem a necessidade de diluições e lida em um espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA - 500nm) a 37 °C em intervalos de cinco minutos até a completa reação da amostra padrão (fornecida no kit).

#### **4.9 Análise da expressão gênica por RT-PCR**

O Ribonucleic RNA) total, obtido a partir do fígado total, foi retirado de 10mg do tecido. A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo 25 Relia Prep™ RNA TissueMiniprep System (Promega). Ao final da extração, a concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nano Drop® ND1000, EUA) a 260 e 280 nm. Dessa forma, foram utilizados 1000 ng de RNA para a síntese de Complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA), utilizando para isso o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi submetida a 25 °C por 5 minutos, 50 °C por 90 minutos e 70 °C, por 15 minutos. O cDNA produzido foi armazenado a -20 °C. Para a validação dos resultados de Polymerase Chain Reaction (PCR) em tempo real, foi determinado um controle endógeno, que foi útil como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes em estudo. Dentre os genes testados [Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), Ribosomal Protein L4 (RPL4), 18s e Actina beta- (Actb)], e utilizando-se da análise estatística feita pelo programa NormFinder, o melhor normalizador escolhido para este estudo foi Gapdh. As reações foram realizadas

utilizando o Rotor-Gene Q (Qiagen) e os resultados obtidos foram analisados no Prism 8.0. O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5 µL de SYBR® Green quantitative PCR (qPCR) Master Mix (Bio-Rad, EUA), 5 µM de cada iniciador (Tabela 1) e 1 µL de cDNA em um volume final de 10 µL. O protocolo de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60 °C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5 µL de SYBR® Green qPCR Master Mix e 5 µM, de cada iniciador

Seguindo o protocolo já estabelecido, a quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseada no valor de threshold cycle (Ct) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (Gapdh), para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de  $\Delta Ct$ , calculou-se o  $\Delta\Delta Ct$ , que corresponde ao  $\Delta Ct$  amostra –  $\Delta Ct$  do calibrador, sendo que, nos experimentos realizados, o calibrador foi o animal que não recebeu nenhum insulto, sendo dietético ou viral. A relação da expressão gênica entre a amostra e o calibrador foi calculada utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Os resultados foram obtidos no RotorGene Q Series Software e analisados no Prism 8.0. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “Curva de Melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, como dímeros ou contaminação, comprovando a especificidade da reação.

Gene	Foward	Reverse
<i>Gapdh</i>	5' – AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG – 3'	5' – TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA – 3'
<i>Actb</i>	5' - GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG – 3'	5' – CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T – 3'
<i>18s</i>	5' – CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG – 3'	5' – CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC – 3'
<i>Cxcl1</i>	5' – CTG GGA TTC ACC TCA AGA ACA TC - 3'	5' – CAG GGT CAA GGC AAG CCTC – 3'
<i>IL1-b</i>	5' – GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T – 3'	5' – ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT – 3'
<i>IL-10</i>	5' – GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG – 3'	5' – CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG – 3'
<i>IL-6</i>	5' – TAG TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC – 3'	5' – TTG GTC CTT AGC CAC TCC TTC – 3'
<i>Tnf</i>	5' – CCT TCC TCT CCC AGA TGT TTC – 3'	5' – ACG GGT CAG TCA CCA AATC – 3'

**Tabela 2-** Primers utilizados durante a reação de RTqPCR.

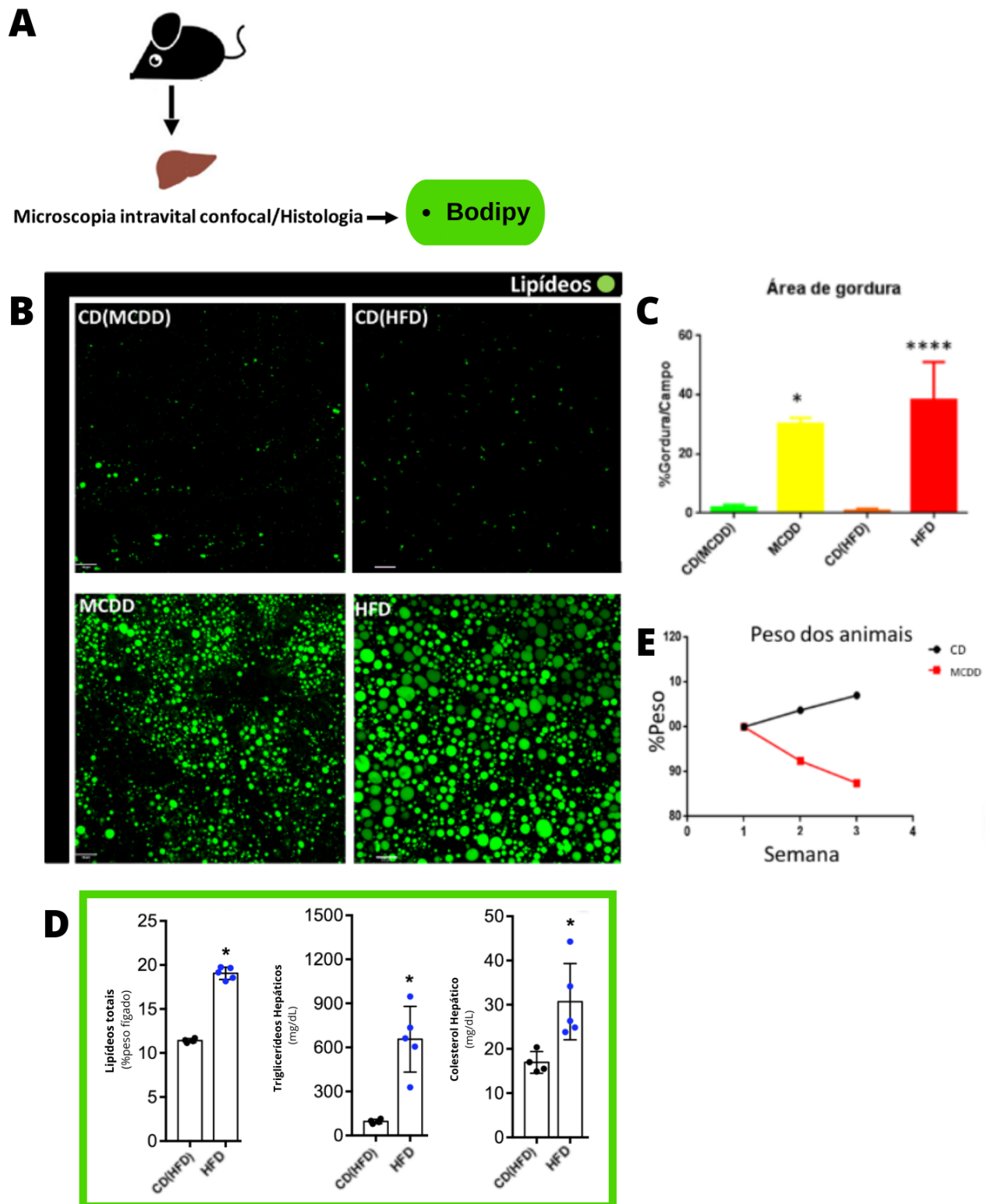
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5. Resultados

### 5.1 Ambas dietas induzem diferentes formas de esteatose hepática

Para caracterizar as patologias, o primeiro passo foi verificar a dinâmica lipídica no fígado, após ambos os insultos dietéticos. Para isso, foi utilizado o protocolo já padronizado, por meio do corante de lipídeos neutros, o Bodipy (Figura 1. A) Utilizando a microscopia confocal, foi observado um aumento drástico na deposição de lipídeos no fígado de um animal alimentado com a High Fat Diet (HFD), assim como no grupo alimentado com *Methionine* choline-deficient diet (MCDD) (Figura 1.B, C). Nota-se também, gotículas de diferentes perfis, macro e micro vesiculares (Figura 1.B) Vale mencionar que, apesar do fenótipo final ser a deposição de lipídeos no fígado, o mecanismo por meio do qual isso ocorre é diferente para cada uma das dietas, uma vez que os animais alimentados com a dieta *Methionine* choline defficient (MCD) apresentam perda de peso severa (Figura 1 E), o que não é observado em experimentos com dietas High Fat (HF) (Dado não apresentado).

Pode-se perceber também a deposição via testes bioquímicos realizados (Figura 1. D)

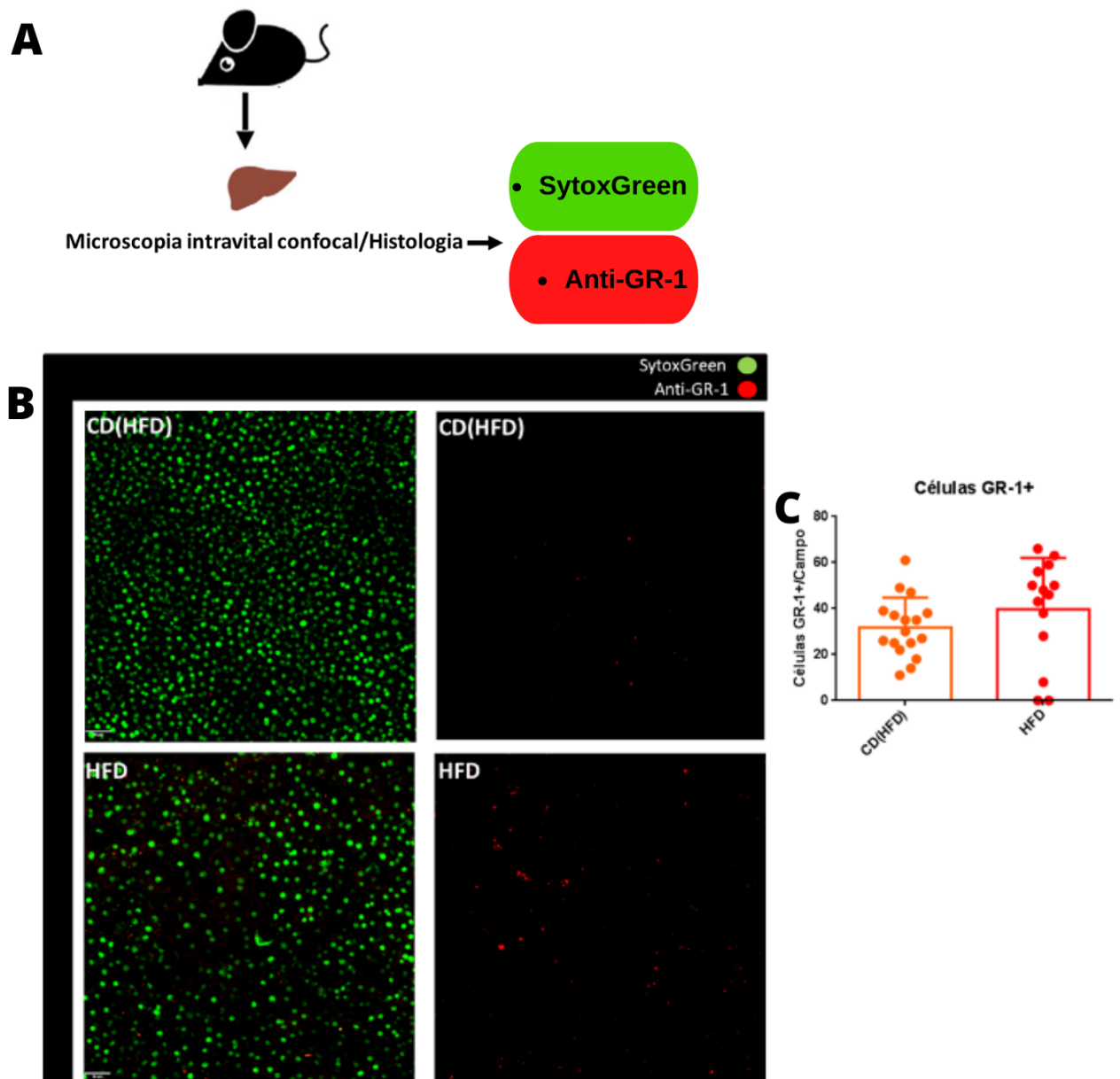


**Figura 1- HFD e MCDD induzem diferentes perfis de esteatose: (A)** Modelo para visualização da esteatose na microscopia confocal. **(B)** Ambas dietas induzem diferentes perfis de esteatose. Objetiva de 20x. **(C)** Quantificação da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem. **(D)** A dieta HFD induz alteração na proporção de lipídeos hepáticos. **(E)** Animais alimentados com dieta MCD apresentam anorexia. (N > 2). Resultados exibidos como média ± SEM. \*p<0,05 se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

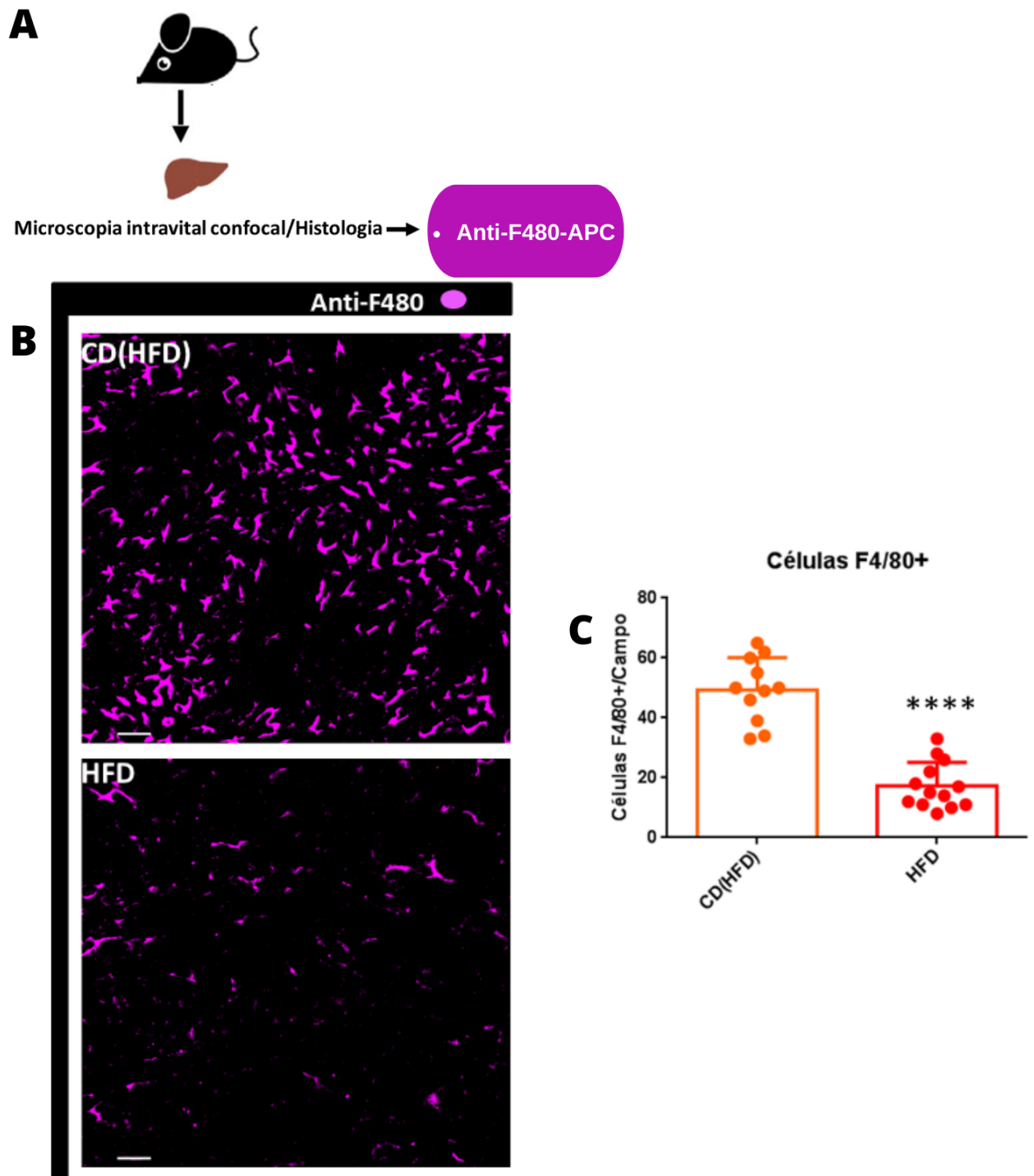
### **5.2A dieta HF é capaz de alterar a dinâmica das células residentes hepáticas.**

Com o objetivo de visualizar a integridade do parênquima e a dinâmica populacional, o próximo passo foi utilizar de marcadores para células específicas, ligadas a homeostase hepática. Para visualizar a migração de células para o tecido, foi utilizado o anticorpo Anti-GR-1(PE), com o qual não foi possível ver diferenças entre o grupo controle e o grupo alimentado com dieta HF (Figura 2. A,B,C) Porém, ao utilizar a marcação via Anti-F480(APC)(Figura 3.A), percebe-se diminuição severa dos macrófagos hepáticos, reforçando a capacidade do insulto esteatótico de alterar a dinâmica populacional do fígado (Figura 3. B,C)



**Figura 2- A HFD altera a disposição dos hepatócitos no parênquima: (A)** Modelo para visualização de necrose e neutrófilos na microscopia confocal. **(B)** A HFD induz dismorfia dos hepatócitos. Objetiva de 20x. **(C)** Quantificação de células GR1 por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média ± SEM. \*p<0,05 se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.



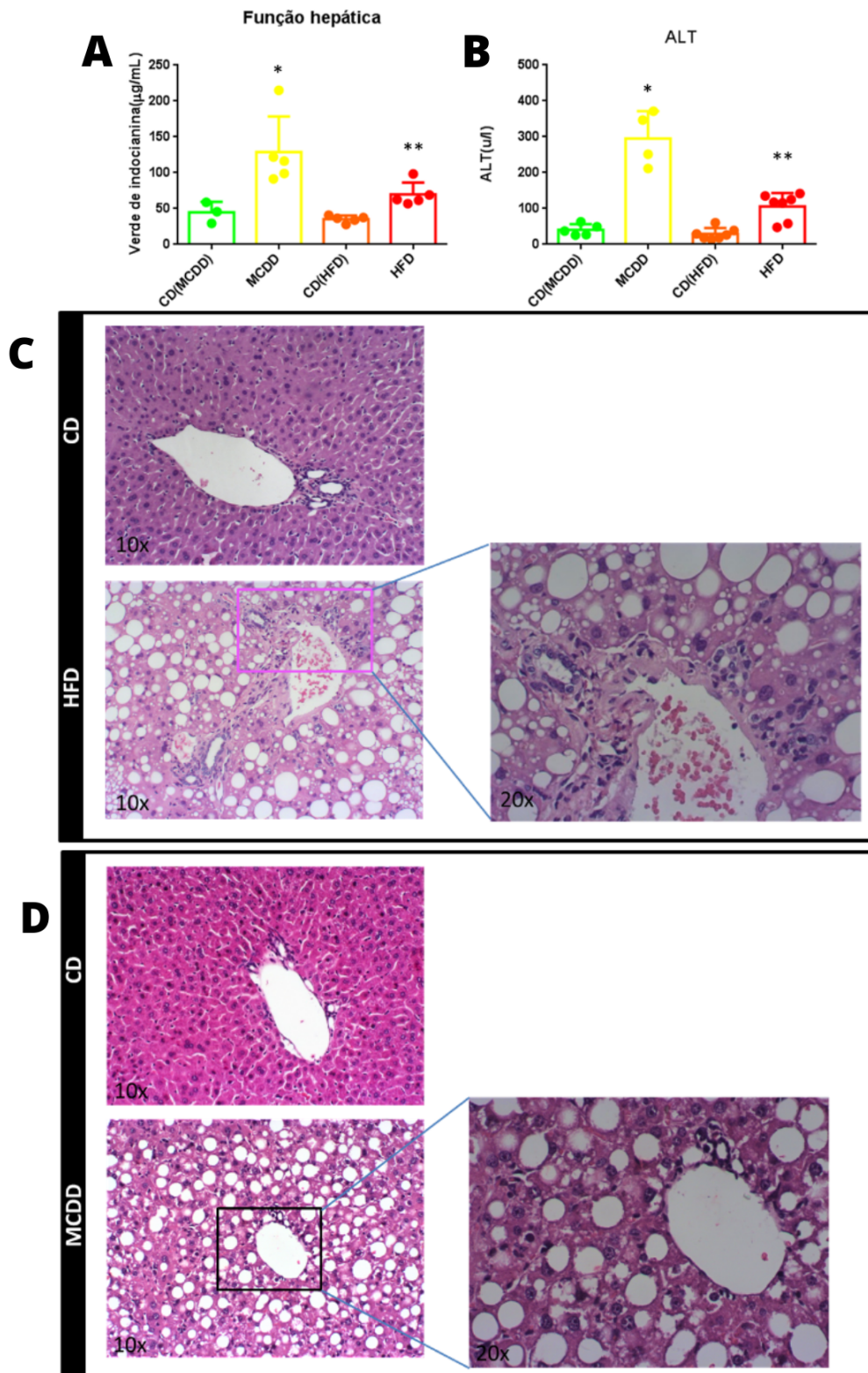
**Figura 3- A HFD altera a população de células de Kupffer:** (A) Modelo para visualização de células de Kupffer na microscopia confocal. (B) A HFD induz depleção da população de Kupffer. Objetiva 20x. (C) Quantificação de células de Kupffer por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 Ambos os insultos dietéticos induzem lesão e disfunção.

Uma vez que ambas as dietas são capazes de alterar a deposição de lipídeos no fígado de maneira diferente, e ainda pode-se perceber a capacidade da dieta HF em

comprometer o arranjo imune hepático, o próximo passo foi averiguar a presença de lesão, de forma indireta, e a manutenção de sua função e arranjo vascular. A ALT, indicador indireto de lesão hepática, encontra-se elevada nos dois grupos que receberam as respectivas dietas (Figura 4. B), assim como a concentração do ICG no plasma dos animais (Figura 4.A). Esses resultados reforçam a capacidade lesiva e disfuncional de ambas as dietas.

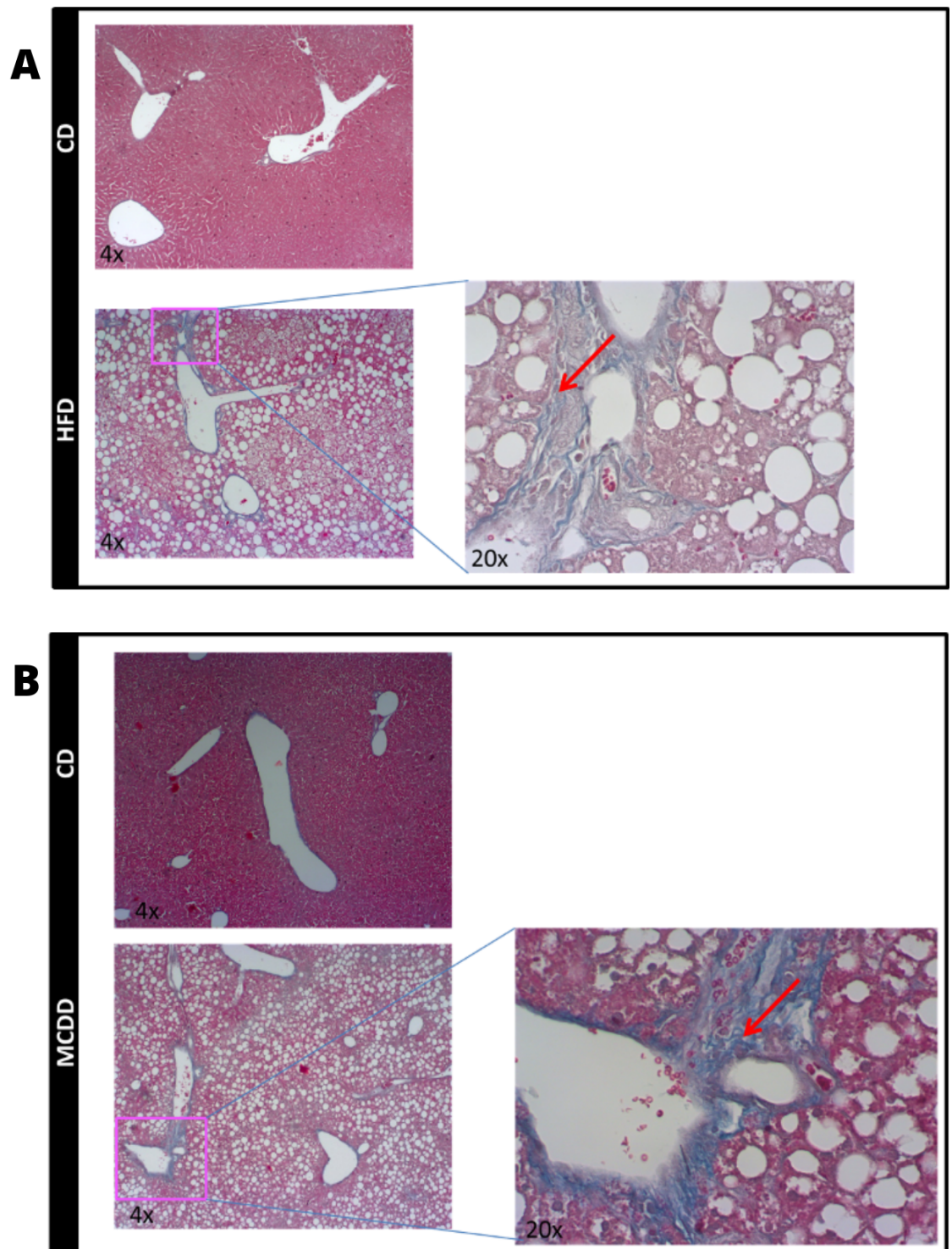


**Figura 4- Ambas dietas alteram a função e integridade hepática: (A)** Ambas dietas induzem disfunção no que tange a capacidade de depuração de ICG. **(B)** Ambas dietas causam dano quantificado por ALT. **(Histologia marcação com HE) (C)** A HFD induz infiltração leucocitária e deposição de lipídeos no parênquima. **(Histologiamarcação com HE) (D)** A MCDD induz infiltração, apoptose, tumefação e deposição de lipídeos no parênquima.  $N > 5$ . Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor

#### **5.4 As dietas HF e MCD alteram a dinâmica do infiltrado celular hepático, a morfologia do parênquima e a deposição de colágeno**

Para confirmar os fenótipos celulares observados via microscopia confocal, e investigar possíveis outros fenômenos, foi realizado teste de microscopia ótica, utilizando marcação via HE. Reiterando-se a presença de esteatose, tanto de perfil macro, como micro vesicular. Ambos os insultos dietéticos induzem aumento do infiltrado celular, principalmente na região centro lobular e Peri portal. Além da degeneração gordurosa, também é visualizada a presença de degeneração do tipo hidrópica e acúmulo anormal de colágeno em ambos os grupos (Figura 4. C, D. Figura 5. A, B)

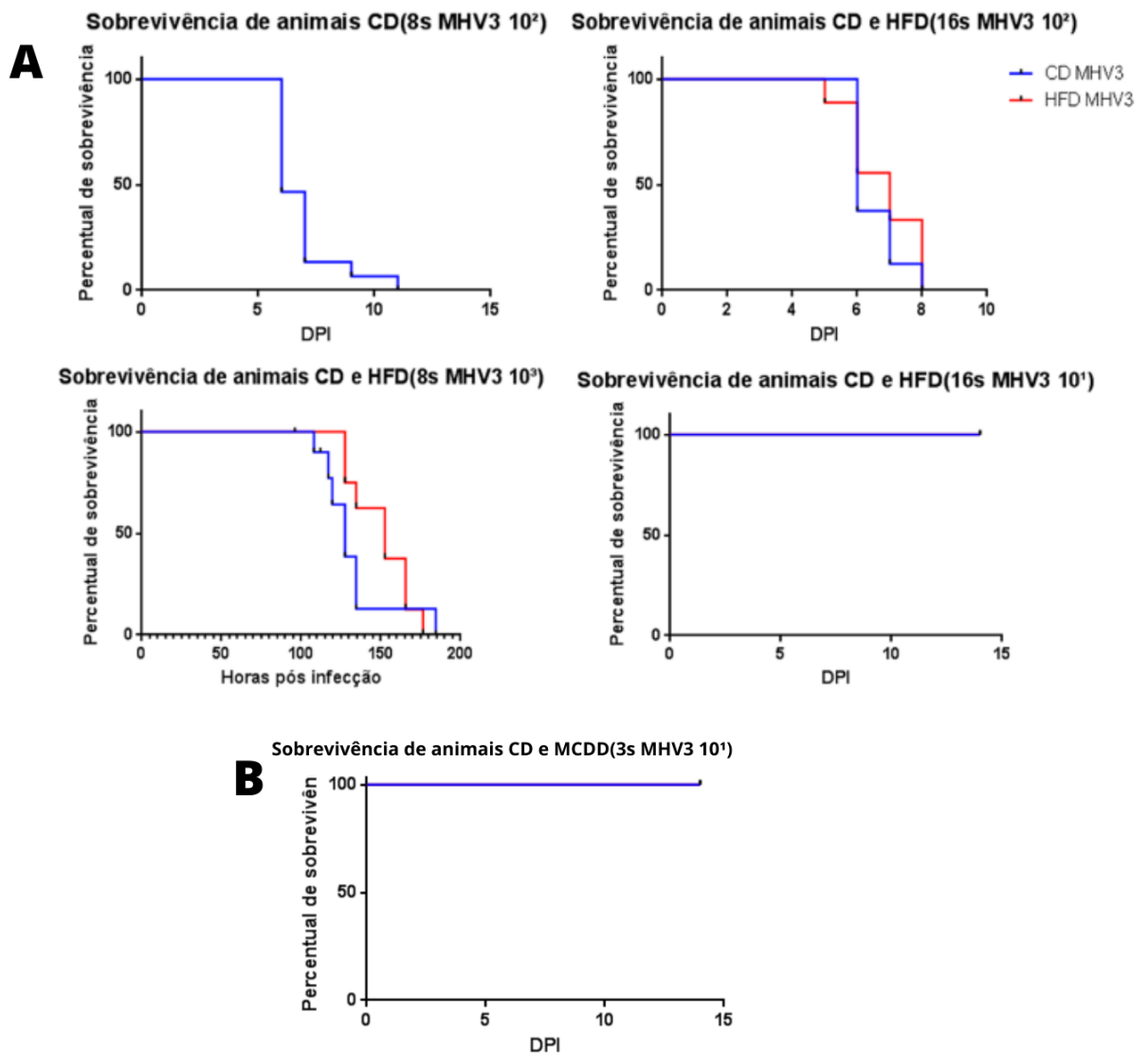


**Figura 5- (Histologia marcação com TM) Ambas dietas alteram a remodelação de colágeno do fígado: (A) A HFD (B) A MCDD. (A,B) As dietas aumentam a deposição de colágeno de forma patológica na região periportal.**

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5 Padronização do inóculo viral

Para a adequação do inóculo viral foram testadas diferentes doses. Visto que, em todas as doses letais, os animais alimentados com dieta HF morriam de maneira semelhante aos do grupo controle, a dose considerada mais adequada e factível era o inóculo de  $10^1$ PFU (Figura 6. A), assim como para os animais alimentados com dieta MCD (Figura 6.B).



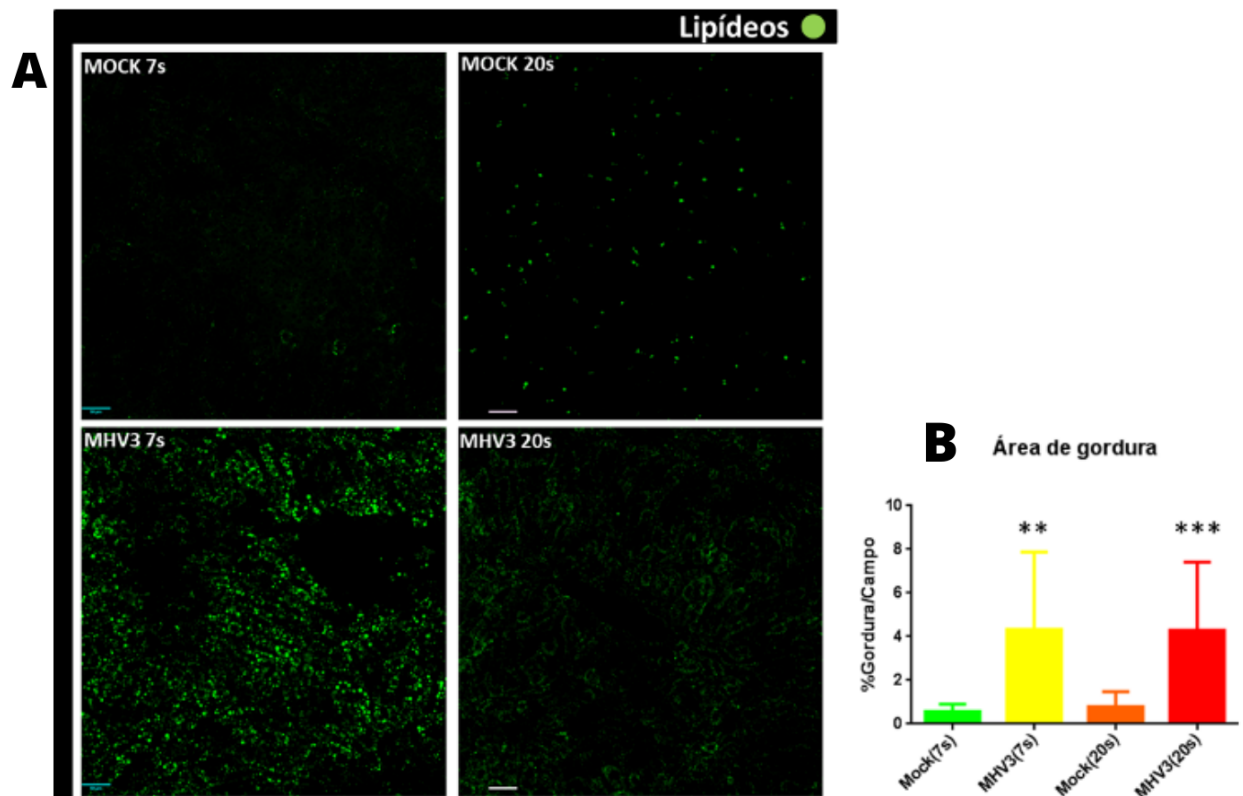
**Figura 6- As dietas não alteram a mortalidade dos animais infectados: (A)** A HFD não altera a mortalidade dos animais quando comparada ao controle com diferentes inóculos. **(B)** A MCDD não altera a mortalidade de animais infectados com o menor inóculo.  $N > 5$ . Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.6O MHV3 é capaz de induzir um depósito anormal de lipídeos no fígado

Trabalhos anteriores mostram a capacidade de agentes agressores de alterar a maneira como o organismo lida com as macromoléculas, sobretudo, a forma que o

fígado passa a lidar com o influxo de nutrientes. Devido a isso, foi testada a hipótese de o insulto viral, por si só, ser um agente esteatótico, o que se confirma em animais de ambas as idades, uma vez que, em animais infectados, há uma alteração na dinâmica de deposição lipídica no fígado (Figura 7. A, B).

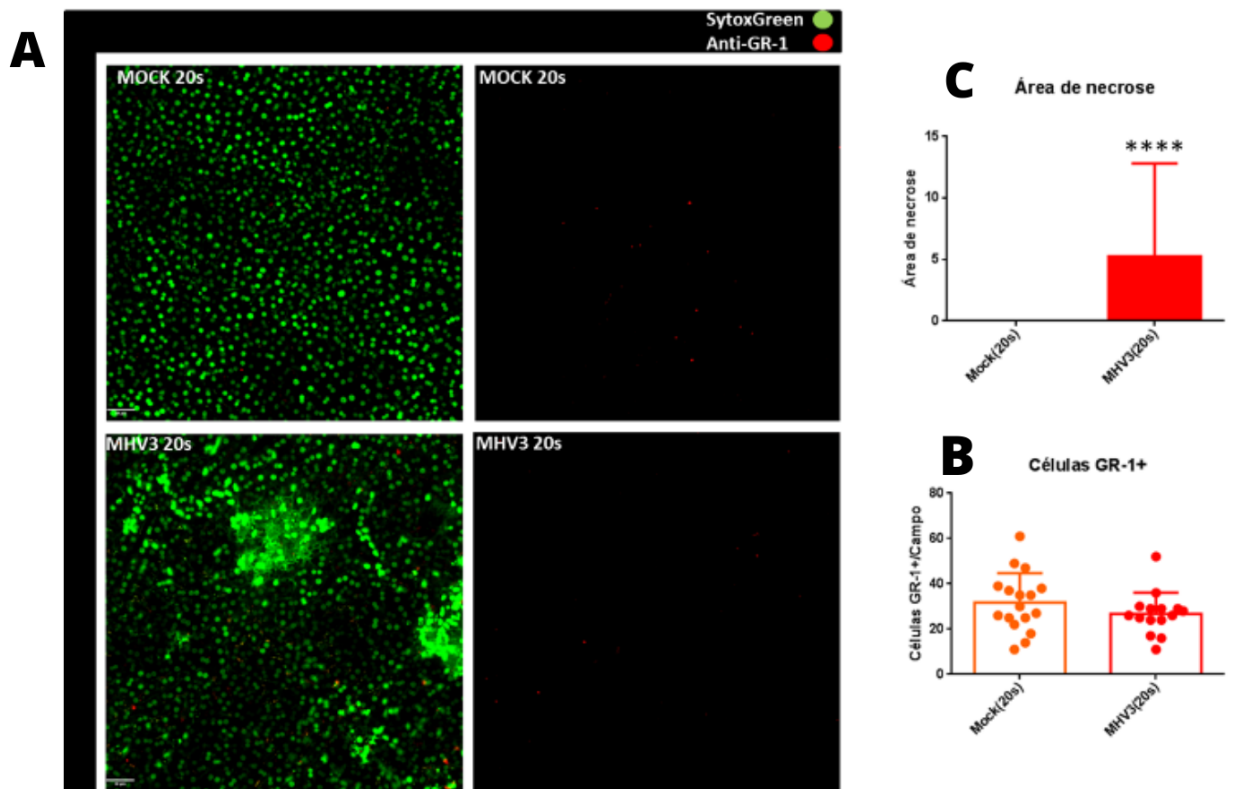


**Figura 7- Os Mhv3 induz esteatose nos animais de ambas idades:** (A) O inóculo viral aumenta a deposição de gordura no fígado de animais de ambas as idades. Objetiva de 20x. (B) Quantificação da área de gordura por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

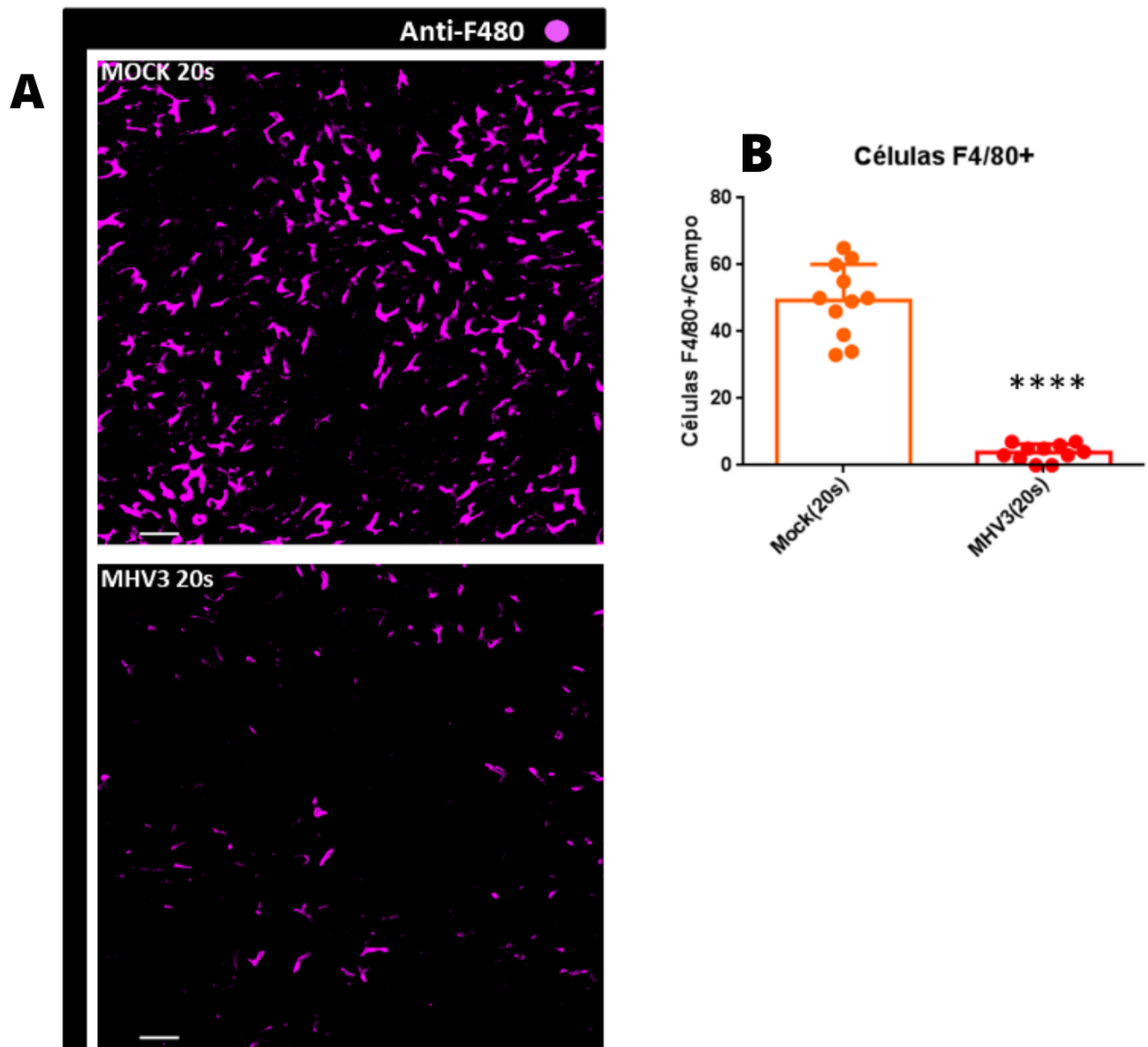
### 5.7O Mhv3 induz morte das KC e necrose em animais mais velhos

A partir da visualização da perturbação causada no metabolismo hepático, o próximo passo foi visualizar a dinâmica das células já mencionadas anteriormente, porém, apenas nos animais em idade mais avançada. De forma semelhante à dieta HF, o inóculo viral foi capaz de induzir a morte das KC (Figura 9. A,B), gerando zonas de necrose, marcadas por SytoxGreen (Figura 8. A, C), sem comprometer a migração de células GR-1+(Figura 8. A,B)



**Figura 8- O inóculo induz necrose no grupo de animais senis: (A)** O inóculo viral induz necrose dos hepatócitos. Objetiva de 20x. **(B)** Quantificação de células GR1 por campo. **(C)** Quantificação da área de necrose com relação a área total do campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média ± SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

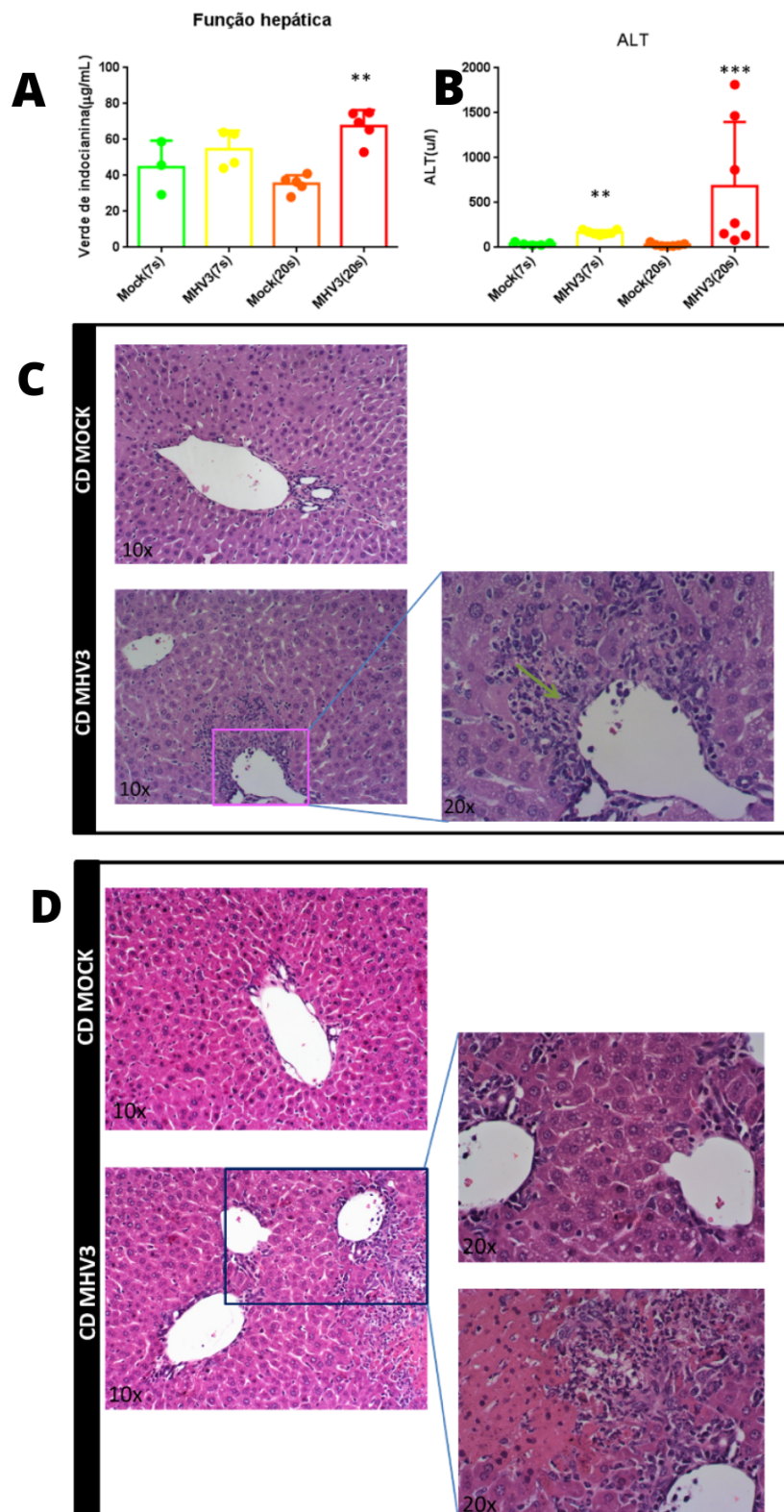


**Figura 9- O inóculo viral causa depleção das células de Kupffer: (A)** O inóculo induz morte das KC. Objetiva 20x. **(B)** Quantificação de células de Kupffer por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p$ <0,05 se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### **5.8O insulto viral causa dano independente da idade dos animais, porém animais mais velhos são mais propensos a disfunção**

Com a alteração lipídica observada nos animais de ambas as idades, e as alterações imuno-morfológicas induzidas nos animais em idade mais avançada, o próximo passo foi verificar se esses fenômenos refletem em disfunção e dano ao tecido. Apesar de se observar aumento de ALT em ambas as idades (Figura 10. B), indicativo de lesão hepática, a função aferida por ICG, encontra-se alterada somente nos animais mais velhos (Figura 10. A), demonstrando possível efeito decorrente do processo de senilidade.

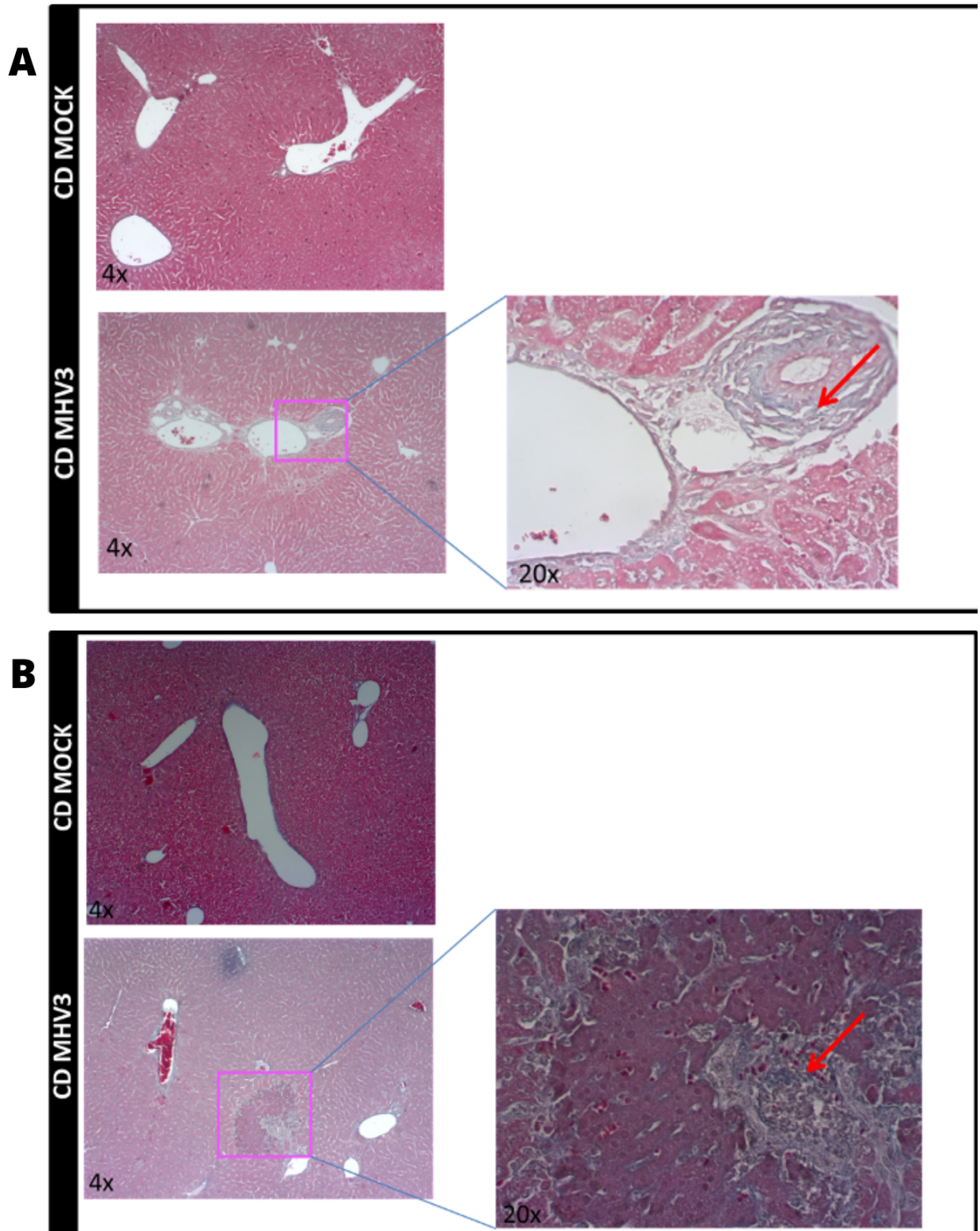


**Figura 10- O inóculo induz dano e infiltração no fígado independente da idade do animal: (A)** Animais mais novos são resistentes a disfunção induzida pelo vírus. **(B)** O vírus induz necrose aferida por ALT, independente da idade do animal. **(Histologia marcação com HE) (C)** Animais mais velhos. **(Histologia marcação com HE) (D)** Animais mais novos. **(C,D)** Apresentam infiltração e necrose periportal. Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.  $N > 3$ .

Fonte: Elaborado pelo autor.

### **5.8.1 O MHV3 apresenta induz deposição anormal de colágenos nas regiões periportais e parênquimas de animais de ambas as idades**

Devido à perturbação no parênquima (Figura 10. C, D), tanto em termos celulares, quanto em sua morfologia, levantou-se a hipótese de que a dinâmica de remodelação e deposição de colágeno poderia estar alterada, devido a própria característica das patologias. Utilizando-se de marcação via Tricrômico de Massom, nota-se o aumento na deposição de colágeno em ambos os grupos, indicando o início de um processo fibrótico, essencialmente na região periportal, fenótipo característico do início do processo (Figura 11. A, B).



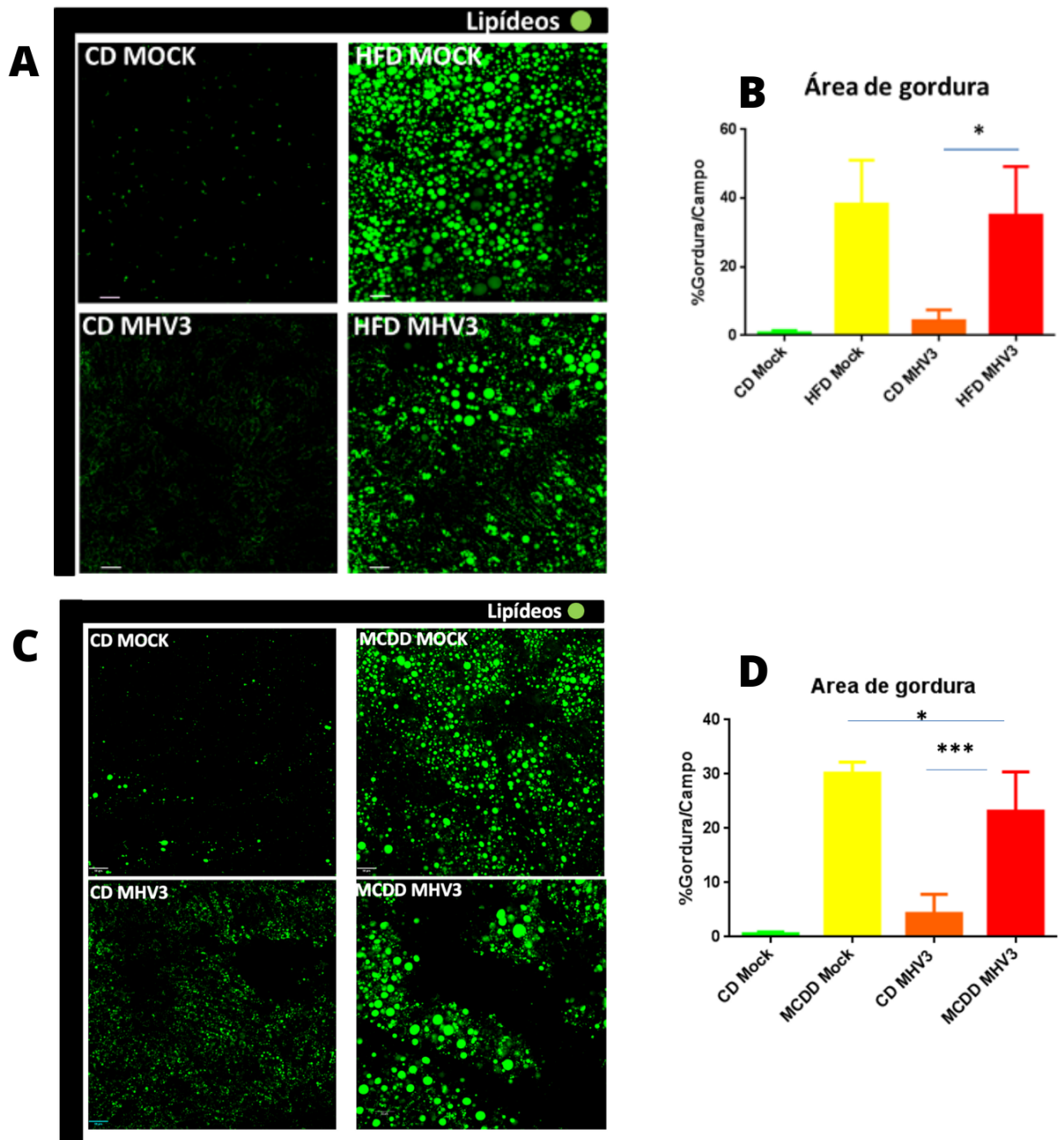
**Figura 11- (Histologia marcação com TM) Ambos inóculos alteram a remodelação de colágeno do fígado: (A) Animais mais velhos. (B) Animais mais novos. (A,B) O inóculo aumentam a deposição de colágeno de forma patológica até em áreas extraportais.**

Fonte: Elaborado pelo autor.

### **5.9O MHV3 diminui a deposição de lipídeos no fígado de animais alimentados**

**com dieta MCD**

Com o objetivo de verificar o potencial das comorbidades em conjunto com o insulto viral, realizou-se a quantificação dos lipídeos hepáticos (Figura 12. A-D). No caso da dieta MCD, o vírus é capaz de induzir uma diminuição dos lipídeos hepáticos, quando comparado ao animal não infectado (Figura 12. B, D)



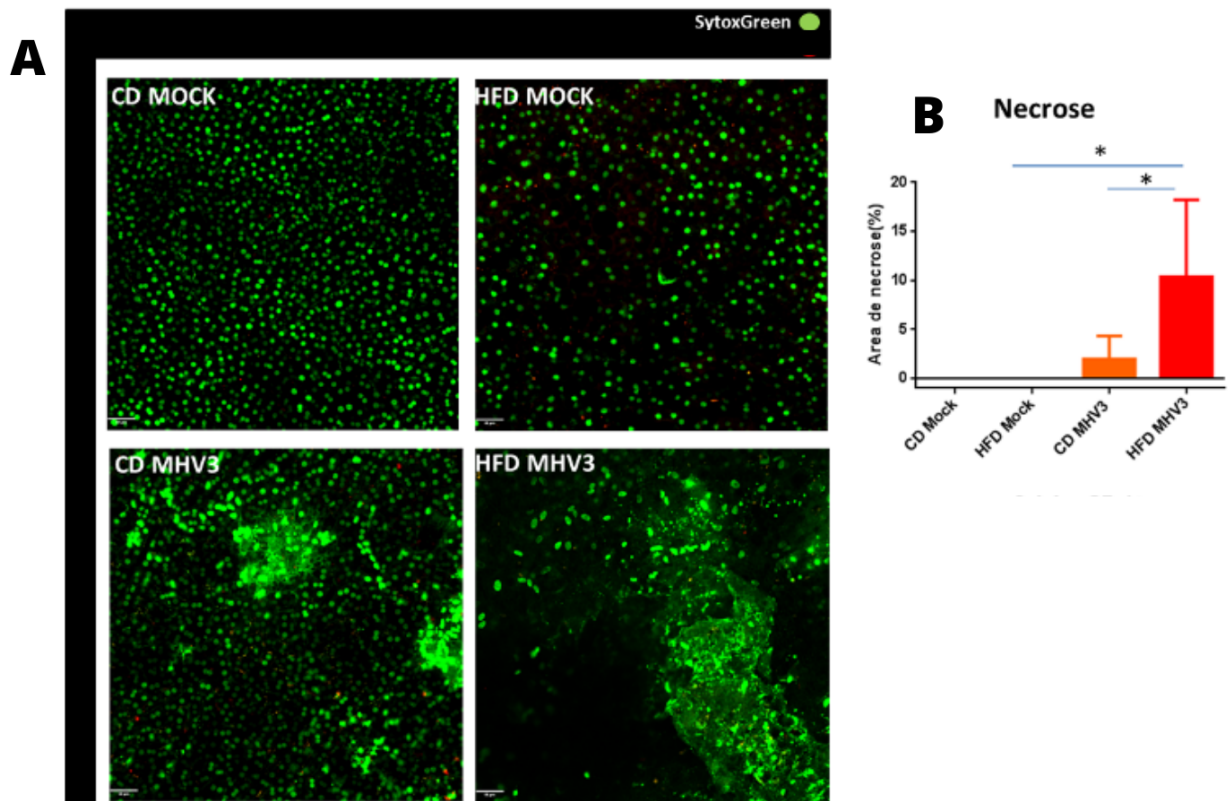
**Figura 12- O vírus não altera a deposição de lipídeos em animais HFD, mas sim em animais MCDD esteatóticos: (A)** Visualização das gotículas lipídicas. **(B)** Animais esteatóticos infectados não alteram o perfil lipídico quando comparado a ambos controles. **(C)** Visualização das gotículas lipídicas. **(D)** Animais infectados alimentados com dieta MCD apresentam perda de gotículas lipídicas (N > 2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.9.1 A dieta HF “prima” o fígado para o dano potencial do inóculo viral

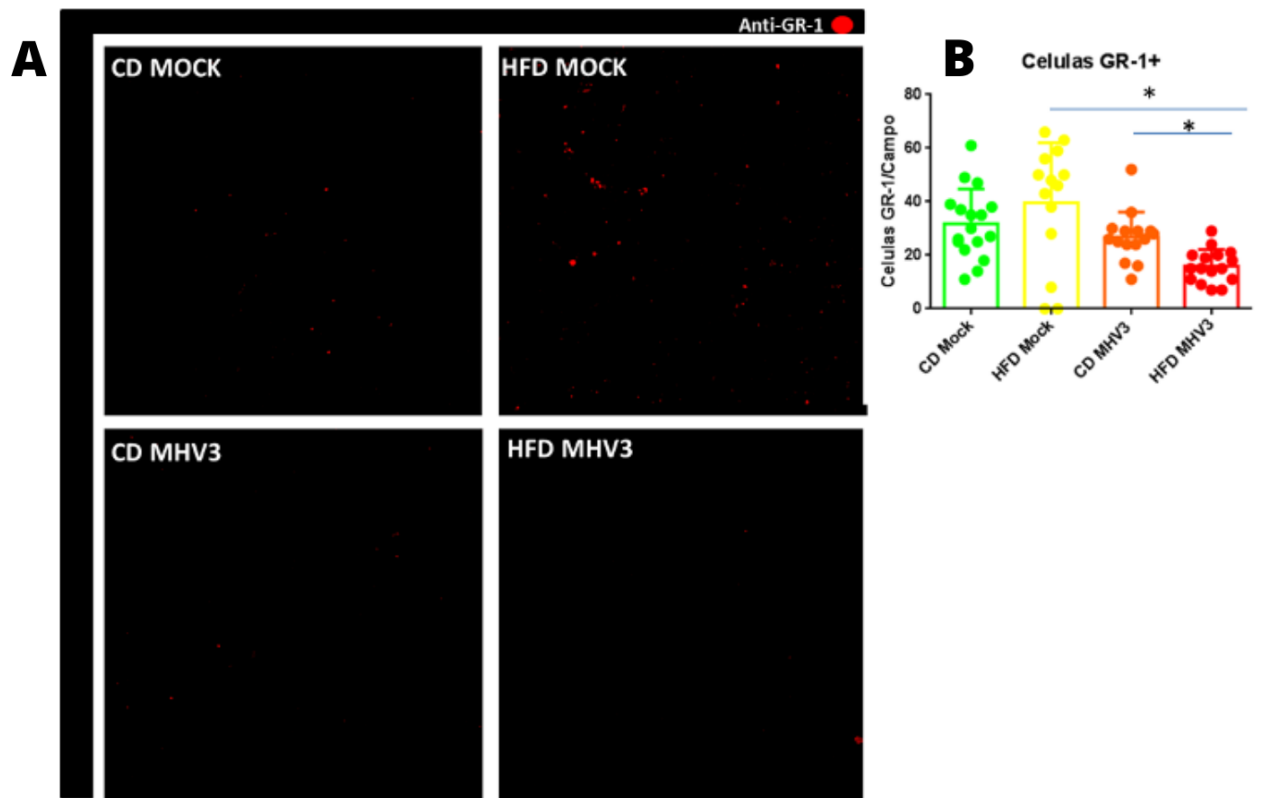
O inóculo viral, por si só, já é capaz de induzir necrose tecidual, perceptível via SytoxGreen. Porém, a dieta HF é capaz de exacerbar esse efeito, reforçando o potencial lesivo do inóculo (Figura 13. A, B), o que talvez tenha relação com a

depleção de células GR-1+, devido ao microambiente induzido pela dieta HF(Figura 14. A, B). Em contrapartida, a intersecção dos insultos não foi capaz de exacerbar o efeito de diminuição da população das células F480+(Figura 15. A, B).



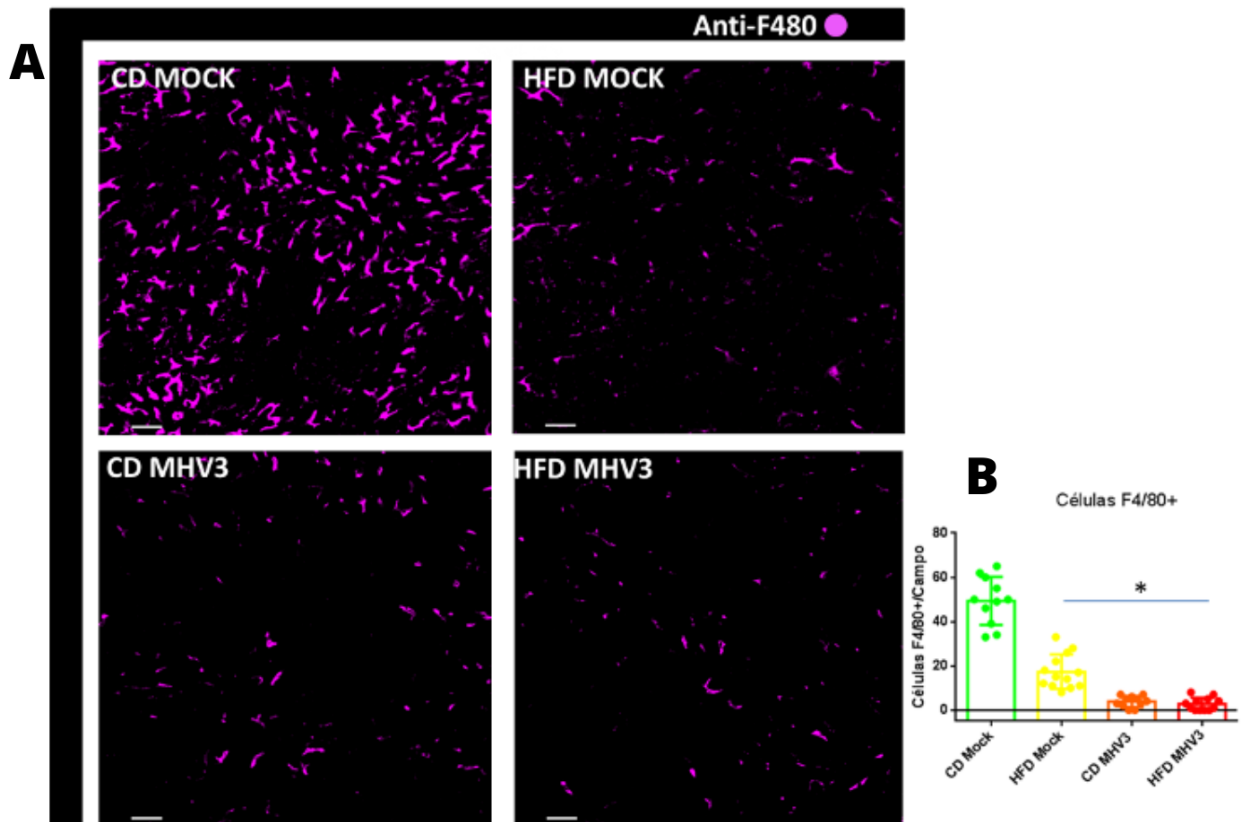
**Figura 13- A HFD exacerba o dano induzido pelo inóculo viral:** (A) Visualização das áreas de necrose marcadas por SytoxGreen. Objetiva de 20x. (B) Quantificação da área de necrose com relação a área total do campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p$ <0,05 se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.



**Figura 14- A HFD exacerba o depleção de células GR1:** (A) Visualização das células GR1 positivas. Objetiva de 20x. (B) Quantificação das células GR1 por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

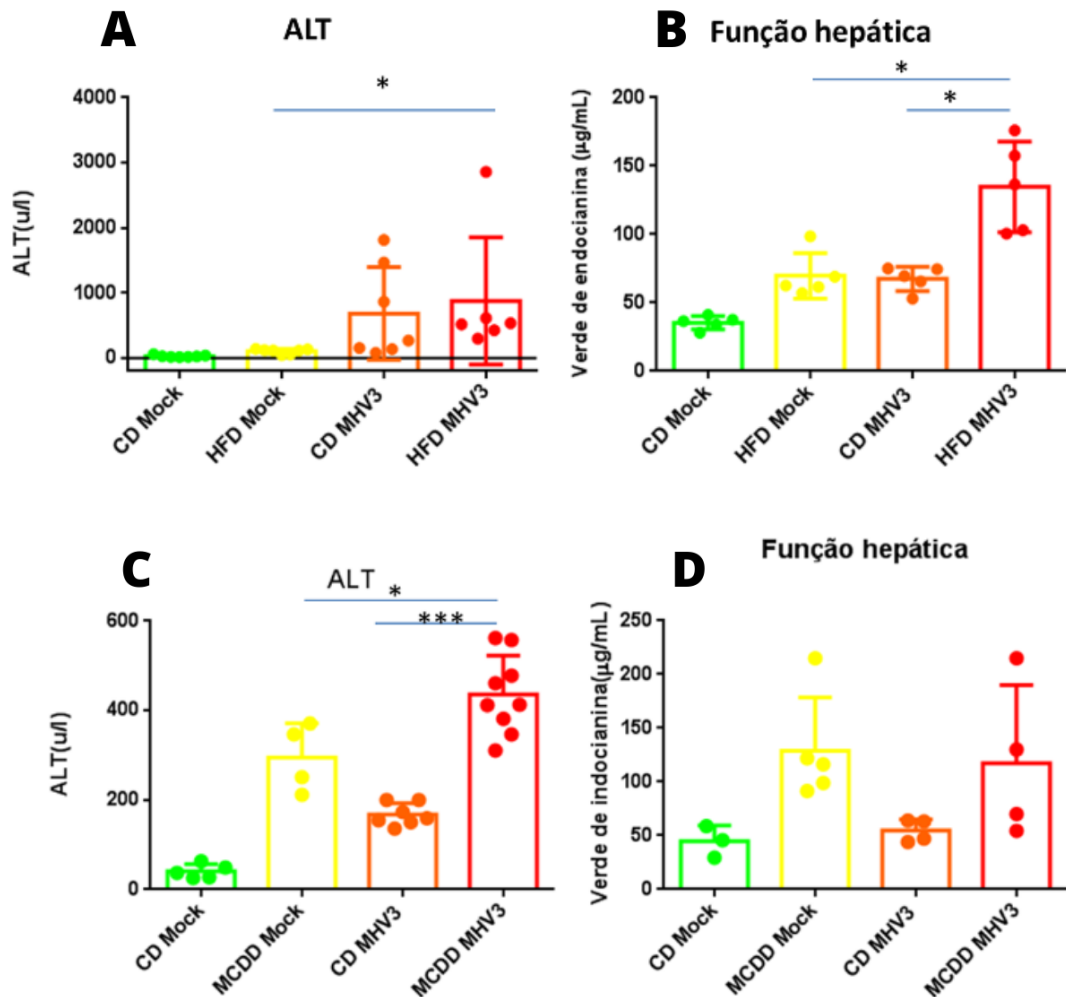


**Figura 15- A HFD não altera a dinâmica das KCs em animais posteriormente infectados: (A)** Visualização das células de Kupffer. Objetiva de 20x. **(B)** Quantificação das KCs por campo (média de 5 campos por animal, N>2). Resultados exibidos como média ± SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.9.2 A dieta MCD potencializa o dano induzido pelo vírus enquanto a dieta HF permite a progressão da disfunção do inóculo

Com as observações fenotípicas realizadas, testou-se os parâmetros funcionais e homeostáticos do tecido. Quanto à percepção de lesão via ALT, o grupo MCDD MHV3 apresentou aumento da lesão (Figura 16. C), o que não refletiu em disfunção (Figura 16. D). Já nos experimentos realizados com a dieta HF, apesar de a dieta não ser capaz de alterar o perfil lesivo do inóculo (Figura 16. A), ela foi capaz de induzir uma disfunção mais elevada do que a observada anteriormente (Figura 16. B)



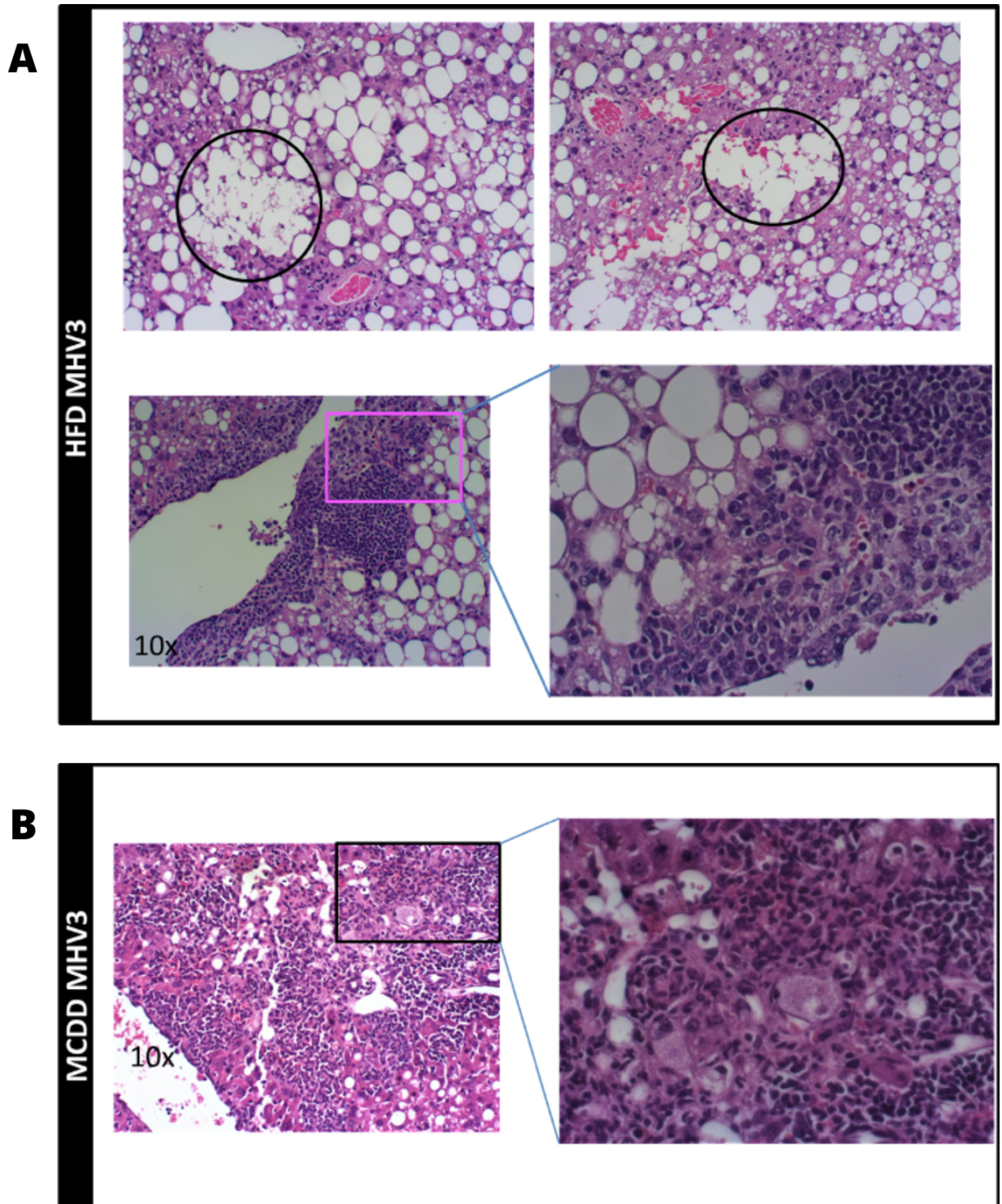
**Figura 16- A MCDD exacerba o dano do inóculo enquanto a HFD exacerba a disfunção induzida pelo mesmo: (A, B) Quantificação da lesão e disfunção hepática induzida por ambos os insultos (HFD, MHV3). (C, D) Quantificação da lesão e disfunção hepática induzida por ambos os insultos (MCDD, MHV3). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle,  $N > 3$ .**

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.9.3 Ambas as dietas alteram a dinâmica da resposta imune hepática ao vírus, o que modifica o tónus do infiltrado celular, o grau de lesão e o depósito de colágeno

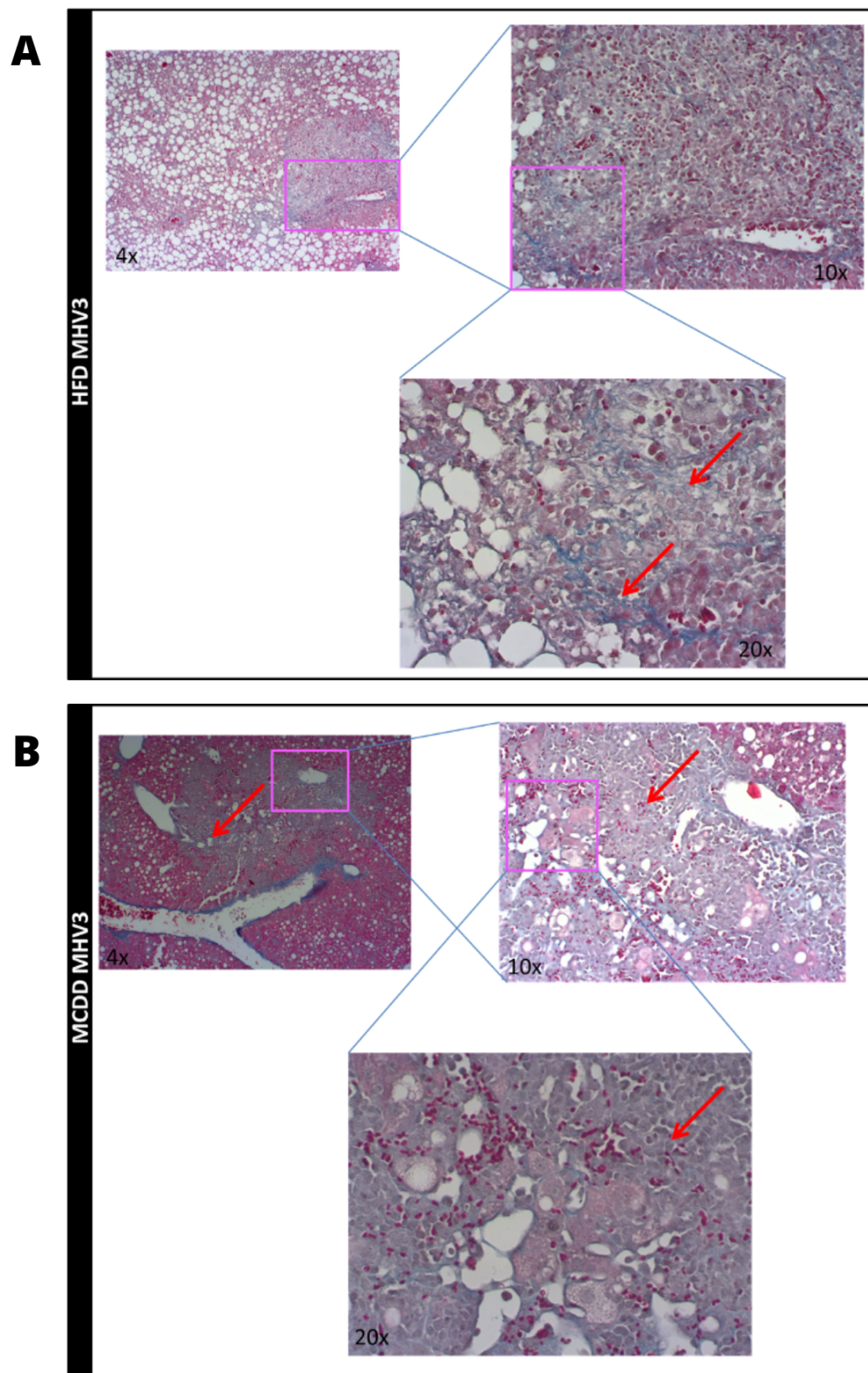
Com o intuito de verificar a integridade do parênquima, quanto a alterações morfológicas decorrentes de dano e/ou alteração em sua composição, bem como à dinâmica populacional de células residentes e transitórias, utilizou-se a técnica de microscopia ótica, com as colorações já descritas. No que tange à dinâmica populacional, pode-se verificar um aumento exacerbado no infiltrado inflamatório, com extensas áreas de necrose, que acometem ambos os grupos que foram primados com

suas respectivas dietas, assim como fica mais evidente a presença de corpúsculos de Mallory e hepatócitos em estado de degeneração hidrópica (Figura 17. A, B). Especificamente no caso da dieta HF, ainda se evidenciaram formações lipídicas maciças, cercadas por regiões aparentemente necrosadas (Figura 17. A). A formação de cicatrizes fibrosas também apresentou alteração, tornando-se mais presentes (Figura 18. A, B) e ainda assumindo, em muitos campos, o estágio cirrótico da doença, principalmente nos animais alimentados com a dieta MCD (Figura 18. B).



**Figura 17- (Histologia marcação em HE) Ambas dietas induzem maior infiltrado e dano celular ao parênquima hepático: (A) Visualização de animais HFD MHV3. (B) Visualização histológica de animais MCDD MHV3.**

Fonte: Elaborado pelo autor.

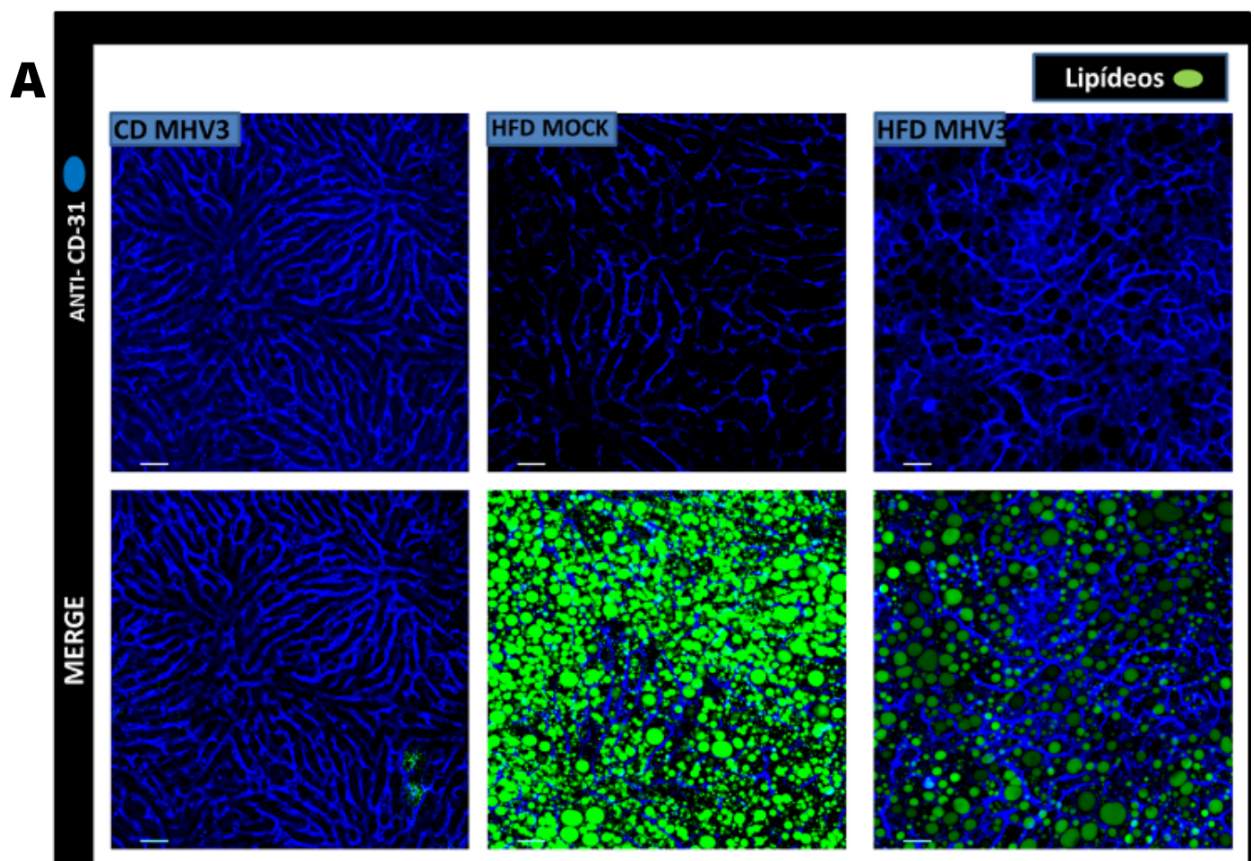


**Figura 18- (Histologia marcação com TM) Ambas dietas induzem zonas mais intensas e graus mais avançados de fibrose: (A) Visualização de animais HFD MHV3. (B) Visualização histológica de animais MCDD MHV3.**

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.9.4 As gotículas lipídicas induzem alteração vascular e celular, através de mecanismos mecânicos

Citadas, porém pouco investigadas, são as modificações induzidas pela capacidade mecânica da gotícula lipídica de pressionar a vasculatura e alterar a dinâmica vascular do microambiente hepático. Com isso, decidiu-se investigar se as gotículas alterariam a micro vasculatura hepática e sua dinâmica. Ao analisar a disposição dos vasos e sua morfologia, nota-se como os vasos se confluem de maneira diferente e, além disso, como as gotículas participam do processo, possivelmente alterando toda perfusão do órgão e, portanto, seu funcionamento (Figura 19. A).

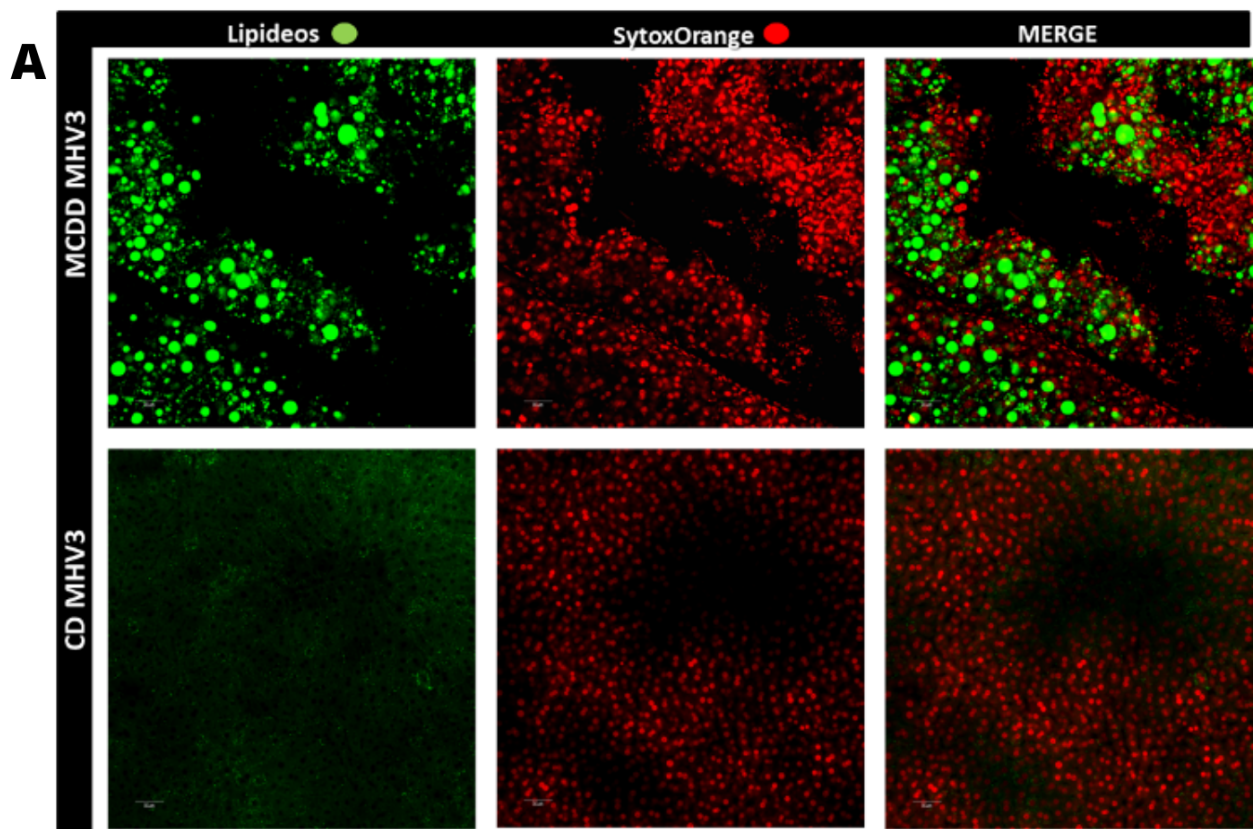


**Figura 19- As gotículas lipídicas alteram a microvasculatura hepática: (A)** As gotículas lipídicas são capazes de alterar a morfologia vascular e celular do fígado através da imposição de forças mecânicas. Objetiva de 20x .

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.9.5 As gotículas lipídicas se co-localizam com cordões de hepatócitos viáveis

Durante a observação da deposição lipídica pela marcação com Bodipy, e pela maneira que as gotículas se dispunham no nível da microscopia ótica, surgiu a hipótese de que a forma peculiar da distribuição lipídica no parênquima dos animais MCDD, quando comparada aos animais HFD, teria relação com áreas ocupadas por cicatrizes fibróticas, que impediriam a regeneração local, causando o aspecto visualizado. Para que isso fosse possível, marcou-se concomitantemente os hepatócitos, via SytoxOrange, e os lipídeos, via Bodipy. Ao realizar o experimento, confirmou-se o fenótipo hipotetizado, no qual as gotículas se organizam conforme a distribuição dos cordões de hepatócitos, na qual as regiões não preenchidas do parênquima apresentam um indicativo de tecido necrótico ou cicatriz fibrosa, nos animais MCDD MHV3, provavelmente, tratando-se de lesões crônicas, visto que, diferentemente do padrão observado nos animais HFD MHV3, não há material genético extravasado pelo parênquima (Figura 20. A).



**Figura 20- As gotículas lipídicas estão co-localizadas nas regiões marcadas por SytoxOrange:**  
**(A)** Co-visualização das gotículas lipídicas em relação aos hepatócitos . Objetiva de 20x .

Fonte: Elaborado pelo autor.

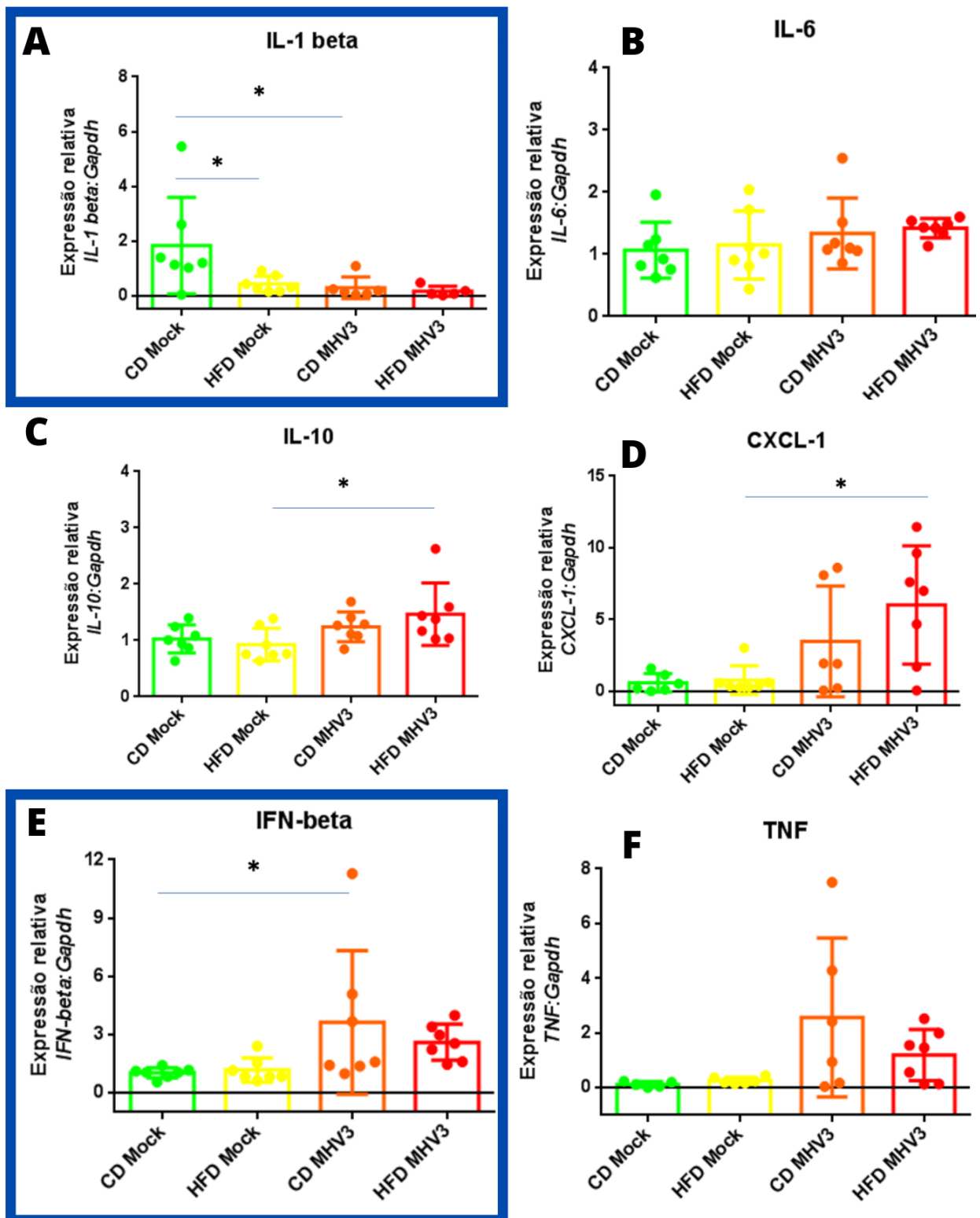
### 5.9.6 Cada estágio da doença, assim como idade do animal induz diferentes modificações da expressão gênica de citocinas estruturais da

### **resposta imune hepática**

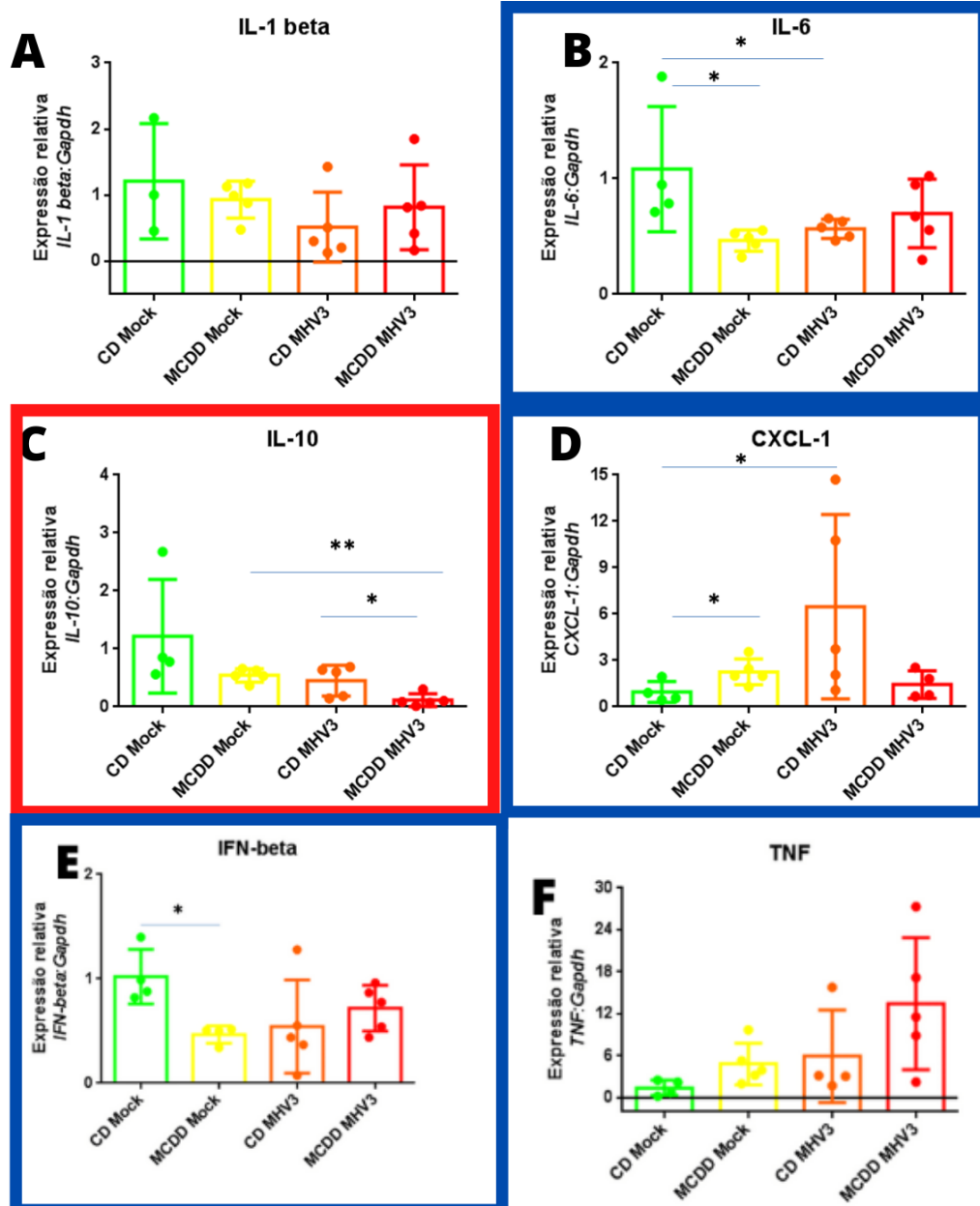
Com o intuito de compreender o mecanismo que orchestra as alterações visualizadas, foram realizados testes de expressão gênica para citocinas que participam do processo de resposta inflamatória. Animais alimentados com dieta MCD apresentaram supressão da expressão de IL-6 (Figura 22. B) e Interferon-beta (Figura 22. E), e aumento da expressão de C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL-1) (Figura 22. D), de forma que a dieta HF induziu supressão de Interleucina 1 (IL-1) Beta (Figura 21. A)

Quanto ao inóculo viral, notou-se um aumento na expressão CXCL-1 (Figura 22. D) assim como supressão de IL-6 (Figura 22. B) nos animais mais novos infectados. No grupo mais velho, entretanto, foi visualizada supressão na expressão de IL-1 beta (Figura 21. A) e aumento na expressão de Interferon-beta (Figura 21. E)

Ao tratar da intersecção entre os insultos, a expressão de IL-10 nos animais MCDD infectados foi suprimida em relação a todos seus controles, enquanto não há nenhuma outra alteração significativa na expressão de outras citocinas testadas (Figura 22. C)



**Figura 21- Expressão genica aferida por teste de RTqPCR em animais HFD: (A)** Tanto o insulto viral como o dietético (HFD) suprimem a expressão de IL-1 beta. **(B)** IL-6. **(C)** IL-10. **(D)** CXCL-1. **(E)** O vírus induz aumento de expressão de IFN-beta. **(F)** TNF. Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle,  $N > 3$ .



**Figura 21- Expressão genica aferida por teste de RTqPCR em animais MCDD: (A) IL-1 beta. (B) A dieta e o vírus suprimem a expressão de IL-6. (C) A intersecção dos insultos suprime a expressão IL-10. (D) A dieta e o vírus aumentam a expressão de CXCL-1. (E) A dieta suprime a expressão IFN-beta. (F) TNF** Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  se comparado com o controle,  $N > 3$ .

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6. Discussão

Ao analisar o potencial esteatótico dos insultos, foi percebido que as dietas HF e a MCD foram capazes de induzir o aumento da deposição de lipídeos no fígado através da visualização por marcação de Bodipy no microscópio confocal e utilizando-se da análise histológica. O fenótipo induzido pelo uso das dietas HF e MCD já é descrito na literatura, uma vez que a dieta HF também apresenta maior densidade energética,

favorecendo o desenvolvimento da doença. Também se confirmou o potencial esteatótico do MHV3, fenótipo já relatado na literatura, na qual o insulto viral foi capaz de aumentar a deposição triglicéridos no tecido (Bingen et al, 1992; Martin et al, 1991), o que foi observado de forma clara na microscopia confocal e mais discretamente por meio da microscopia ótica. Uma vez que um dos efeitos do inóculo já descritos pela literatura e visualizado por nós é a alteração da dinâmica das células de Kupffer, essa perturbação na dinâmica celular pode induzir desequilíbrio no metabolismo lipídico, favorecendo a esteatose micro vesicular, já que também se visualizou aumento do infiltrado celular, reforçando ainda mais esse desequilíbrio (Steffan et al, 1995).

Observa-se que os animais alimentados com a dieta deficiente em metionina e colina apresentam deposição de lipídeos no fígado por um processo independente do fator relativo ao influxo excessivo de energia, visto que os mesmos apresentam perda de peso, e anorexia severa. Essa esteatose parece ter relação com a diminuição da capacidade de exportação de lipídeos do fígado, via lipoproteínas, assim como a dificuldade em lidar com as espécies reativas produzidas devido a perda da eficiência do sistema redox hepático, pela deficiência de colina e metionina, moléculas essenciais na síntese de glutathione (Marcolin et al, 2011; Rinella et al, 2008). Animais alimentados com dietas indutoras de NASH apresentaram uma piora do quadro esteatótico após supressão farmacológica do Interferon-beta (Møhlenberg et al, 2019). Embora fossem notados indícios de necrose nos grupos que receberam qualquer um dos insultos dietéticos e virais utilizando-se da quantificação de ALT, durante a visualização do parênquima via SytoxGreen, porém, não foi visualizada alteração nos animais HFD Mock, apenas nos animais CD MHV3 (Senis). Isso se deve ao fato de que para que se observe áreas de necrose extensas via confocal, é necessária uma lesão mais intensa, ao tempo que pequenas alterações no turnover hepático já podem ser aferidas via aumento de ALT. O fenótipo observado através da marcação via Sytox não corresponde ao resultado durante a quantificação visual das células F480+, as quais apresentam-se em menor número independente da visualização por Sytox. A supressão das citocinas IL-1b e IL-6 (Ju et al., 2002), correlaciona-se com os grupos que apresentaram depleção da população de KC nos experimentos realizados, o que vai de acordo com a literatura, a qual demonstra essa população como sendo a principal fonte desses mediadores (McDonald et al, 2013).

Células reconhecidas por expressarem GR-1, as quais são principalmente neutrófilos e monócitos, não apresentaram diferença em sua concentração no tecido, independente do insulto, sendo viral ou dietético (HFD), o que pode indicar que o processo não tem como mediador principal as células extra-hepáticas, além do que, nestes mesmos grupos observou-se depleção das células de Kupffer, as quais apresentam papel no processo de adesão neutrofílica nos sinusóides hepáticos (McDonald et al, 2013).

Por outro lado, grandes quantidades de leucócitos foram visualizadas por meio da técnica histológica nas regiões periportais e pericentrais de ambos os grupos de animais infectados, independentemente da idade, além de focos de infiltrado que foram visualizados ao longo de todo o parênquima. Em ambos os grupos alimentados com as dietas MCD e HF também se evidenciaram focos de infiltração celular, porém, de maneira mais espaçada e menor densidade celular. Animais mais novos infectados, assim como os alimentados com a dieta MCD apresentaram aumento da expressão de CXCL-1, a qual funciona como fator quimiotático para neutrófilos e monócitos, o que pode ser uma das causas do acúmulo perivascular dos leucócitos vistos na histologia (Maltby and Wright and Sheron, 1996), expressa principalmente em hepatócitos em apoptose (Faouzi et al, 2001). Porém, essa infiltração apresenta caráter transitório nos sinusóides, não estimulando de maneira adequada a adesão nas vênulas pós-sinusoidais, devido á menor capacidade de induzir expressão de moléculas de adesão quando comparada a IL-1b e TNF (Kato et al, 2002).

Apesar dos animais mais velhos não apresentarem aumento da expressão de CXCL-1, há o aumento da expressão de Interferon beta, que é um dos sinalizadores para o início do processo de infiltração neutrofílica no tecido (Lieh et al, 2013). Ao mesmo tempo, esses animais apresentaram supressão na expressão de il-6. Sendo uma citocina pleiotrópica, capaz de desempenhar diversas funções. Dentre essas, é capaz induzir a mitose dos hepatócitos, protegendo da deposição exacerbada de matriz extracelular, portanto, controlando plasticidade do processo (Cressman et al, 1996). Apresentando papel essencial no controle do dano agudo hepático, portanto, sua supressão favorece a piora da lesão.

As KC são células chave no processo tolerogênico do fígado, porém, as mesmas alteram seu perfil durante a patogênese da NAFLD e NASH. Ao se tornar mais reativas, as KC passam a secretar mais citocinas inflamatórias que têm a capacidade

de primar o fígado para insultos subsequentes, e, ao mesmo tempo, diminuir a expressão de IL-10. Os macrófagos são possivelmente um dos limitantes na patogênese do MHV3, uma vez que, a susceptibilidade do organismo se relaciona à capacidade do vírus de se replicar no seu interior (Virelizier and Allison, 1976), induzindo o processo de apoptose (Belyavshy et al, 1998). Como observado, tanto o insulto viral no grupo mais velho, como o insulto com dieta HF, são capazes de induzir depleção no número de macrófagos hepáticos, provavelmente, por diferentes mecanismos. Animais alimentando com dieta HF apresentam diminuição das células de Kupffer, provavelmente, por efeitos lipotóxicos (Xu et al, 2021), e também provável hipoxia e disfunção na perfusão tecidual, causada pela pressão induzida pela gotícula lipídica. O efeito foi visualizado em outros trabalhos com modelos mais avançados de NAFLD (Diniz et al, 2020).

Já foi demonstrado que durante a patogênese da esteatose, a alteração morfológica da vasculatura, o estado hiper metabólico hepático, o aumento do metabolismo aeróbico e a hipoperfusão derivada de uma vasoconstrição, é capaz de induzir uma hipoxia tecidual que acomete e altera o perfil de ativação de diversas populações celulares (Henly et al, 1993; Kondo et al, 2010; Nasrin et al, 2010).

Com o objetivo de aferir a função do tecido após os insultos dietéticos e virais, o que pode ser aferido por meio do teste por ICG, verificamos ambas as dietas são capazes de induzir disfunção hepática. Antes de hipotetizar os motivos que causaram a alteração nas concentrações plasmáticas do ICG, deve-se entender sua dinâmica e cinética. O principal regulador dessa dinâmica é o fígado, mais precisamente, os hepatócitos. Portanto, um aumento da concentração desse marcador pode indicar precisamente dois fatores (Gasperi and Mazza and Prospero, 2016).

Intrinsicamente ao órgão, o aumento da disfunção pode ser explicado por um menor número de hepatócitos, consequência de um aumento de morte celular, ou uma disfunção não relacionada com uma diminuição da massa celular. Porém, as funções hepáticas podem estar preservadas, e esse aumento da concentração do ICG pode ser indicativo de uma menor perfusão do órgão, que, diminuiria a taxa de filtração por tempo. Portanto, não será utilizado o termo função e sim filtração, visto que a função pode estar inalterada, e o limitante ser o fluxo de entrada do sangue. A filtração, portanto, se dá pelo fluxo sanguíneo hepático e a função hepatocelular (Gasperi and Mazza and Prospero, 2016).

Ao analisar a capacidade de filtração hepática dos grupos que receberam a dieta como insulto dietético, percebe-se disfunção em ambos. Esta disfunção pode ser diversas etiologias. Animais alimentados com dieta HF apresentam aumento do peso com relação a animais alimentados com dieta MCD que inclusive induz uma perda exacerbada de peso. O aumento da deposição de lipídeos na cavidade abdominal do animal, assim como o excesso de peso, são fatores capazes de alterar a vascularização e a perfusão de alguns órgãos, como por exemplo, o fígado (Kondo et al, 2010).

Tratando-se dos insultos virais, apenas os animais mais velhos apresentaram incapacidade no que tange à função aferida, indicativo de uma preservação dos animais em idade menos avançada, uma vez que os mesmos apresentaram menores níveis de ALT.

Durante a visualização por histologia, pode-se perceber a presença de esteatose de perfil micro e macro vesicular. A esteatose de perfil macro vesicular é capaz de causar o estufamento do hepatócito, o que acaba por diminuir a luz dos sinusóides, induzindo uma possível hipoxia tecidual. Sendo observados também infiltrados celulares e sinais de degeneração hidrópica em ambos os grupos dietéticos. Apesar de, durante a microscopia confocal, não ter sido possível a visualização de infiltrados no grupo testado (HFD), durante a histologia, muitos aglomerados foram visualizados, assim como indícios de degeneração hidrópica, o que indica que, provavelmente, as células ali presentes não eram representadas pelo marcador escolhido para a realização da técnica de microscopia confocal.

Durante a análise histológica, focando-se na integridade do parênquima e na deposição de tecido fibroso, todos os insultos isolados foram capazes de induzir fibrose. Porém, o insulto com a dieta MCD induziu fibrose em um grau mais avançado, uma vez que se nota a presença de cicatrizes fibrosas em regiões extra portais e centro-lobulares

Foram visualizados aglomerados de células não parênquimas nos grupos infectados, que foram primados com quaisquer uma das dietas, sendo MCD ou HF. Esse aumento concentra-se principalmente em torno de grandes vasos, mas não se torna visível da mesma forma ao longo do parênquima. Ao utilizar a técnica de microscopia confocal, usando o marcador anti-GR-1, com o intuito de visualizar a dinâmica do infiltrado hepático no grupo HFD MHV3, notou-se uma depleção de células no grupo que sofreu

ambos os insultos, diferente desse aglomerado celular visualizado na histologia. Como já mencionado, a infiltração dos leucócitos depende de alguns fatores, liberados principalmente pelas células endoteliais sinusoidais. Devido a ampla destruição do parênquima visualizada no grupo HFD MHV3 e MCDD MHV3 possivelmente, as células imunes conseguiriam perceber os sinais químicos que estimulariam a primeira fase da resposta, induzindo sua migração. Porém, ao chegarem no tecido, não teriam a capacidade de infiltrar-se, devido a disfunção e morte das células locais acessórias para o processo, como as KC e as células do endotélio, o que poderia ser uma explicação para o fenótipo observado através de diferentes técnicas (Wang and Liu, 2021; Shetty and Lalor and Adams, 2018).

A NASH caracteriza-se principalmente pela indução de fibrose no tecido, devido a maior atividade das células estreladas. Foram identificados durante a histologia a presença de cicatrizes fibrosas em ambos os grupos infectados, porém, sendo mais evidentes no grupo MCDD MHV3. A alteração no microambiente hepático altera a polaridade de suas células, tornando-as mais reativas e disfuncionais, por exemplo, em decorrência da NASH, ou uma infecção, como a caracterizada. Combinadas, essas alterações alteram todo perfil homeostático hepático. Hepatócitos passam a liberar mais espécies reativas, as próprias células de Kupffer passam a responder de maneira indesejada a certos insultos, causando danos colaterais no tecido hepático e induzem a saída das células estreladas de seu estado quiescente, aumentando desproporcionalmente o depósito de colágeno. Esses fatores agindo em retroalimentação, em um tecido que apresenta disfunção em seu sistema redox, faz com que insultos dificilmente danosos tomem proporções catastróficas, como a perda da massa hepática funcional em detrimento de sua substituição por tecido fibroso (Kumar et al, 2021).

Ao investigar a função e a integridade hepática decorrente da intersecção dos insultos virais e dietéticos, foi realizado os testes de ICG e ALT. No que tange a integridade do parênquima, o grupo MCDD MHV3 apresentou piora na lesão quando comparada a seus controles, assim como o grupo HFD MHV3 demonstrou uma disfunção desproporcional aos grupos controle. A primagem do ambiente com as respectivas dietas, faz com que o vírus apresente maior potencial necrótico nos animais mais novos, o que antes não acontecia, e exacerbe o potencial deletério da esteatose induzida pela dieta HF, intensificando a disfunção.

Na tentativa de entender o mecanismo que orchestra o fenótipo observado, foi realizado testes de expressão genica para diferentes citocinas que participam, principalmente, na resposta inflamatória aguda. O grupo MCDD MHV3 apresentou supressão da expressão de IL-10, quanto a todos seus controles. A IL-10 é produzida por várias células, dentre elas, macrófagos e hepatócitos, com a função de regular a tolerogênese hepática. Devido aos insultos, o tecido torna-se mais reativo, diminuindo a produção deste mediador. O próprio MHV3, se caracteriza por infectar e causar a apoptose de macrófagos e morte de células endoteliais hepáticas. A diminuição da expressão da IL-10, devido ao perfil mais reativo das populações hepáticas, somado ao menor número de células produtoras desse mediador diminui o tônus tolerogênico hepático podendo causar dano colateral e respostas não reversíveis, como morte celular e as áreas de cirrose observadas.

## **7. Conclusão**

A presença de esteatose hepática, independentemente da progressão que se encontra, demonstrou-se ser um catalisador no que tange a disfunção e lesão induzida pelo vírus. De forma que o tecido se encontra morfológicamente tomado por extensas áreas necróticas e fibróticas, além de infiltrados inflamatórios, não vistas em animais eutróficos inoculados com o vírus. Juntos, os dados demonstram que a NAFLD é capaz de alterar a resposta imune hepática ao insulto viral, e em seu estado mais avançado (NASH), essas alterações podem ser mediadas pela perda do tônus tolerogênico decorrente da supressão de IL-10, propiciando uma resposta posteriormente letal a insultos recorrentes.

## Referências

- BELYAVSKY, M et al. **Coronavirus MHV-3-induced apoptosis in macrophages.** Virology, v.250, n.1, p.41-49, 1998.
- BINGEN, A et al. **Modification of the amount of cholesterol in hepatic steatosis induced in susceptible and resistant mice infected with MHV3: a biochemical and ultrastructural study.** Hepatology, n.15, v.6, p.1137-1146.
- BORON, Walter F; BOULPAEP, Emile. **Medical Physiology.** 3.ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.
- CRESSMAN, Drew et al. **Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice.** Science, v.274, n.5291, p.1379-1383, 1996.
- CUSI, Kenneth. **Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis.** Clin Liver Dis., v.13, n.4, p.545-563, 2009.
- CUSI, Kenneth. **Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications.** Gastroenterology, v.142, n.4, p.711-725, 2012.
- DELEVE, Laurie D. **Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Hepatic Fibrosis.** Hepatology, v.61, n.5, p.1740-1746, 2015.
- DINIZ, Ariane Barros et al. **Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD.** JHEP Rep, v.2, n.4, 2020.
- DIXON, Laura J et al. **Kupffer Cells in the Liver.** Compr Physiol, v.3, n.2, p.785-797, 2013.
- FAOUZI, S et al. **Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF-kappa B-independent, caspase-3-dependent pathway.** J Biol Chem, v.276, n.52, p.49077-49082, 2001.
- FRIEDMAN, Scott L. et al. **Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies.** Nat Med, v.24, n.7, p.908-922, 2018.
- GASPERI, Andrea De; MAZZA, Ernestina; PROSPERI, Manlio. **Indocyanine green kinetics to assess liver function: Ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery?** World J Hepatol, v.8, n.7, p.355-367, 2016.

HENLY, Debra; Berry, Michael. **Effect of palmitate concentration on the relative contributions of the beta-oxidation pathway and citric acid cycle to total O<sub>2</sub> consumption of isolated rat hepatocytes.** *Biochim Biophys Acta*, v.1175, n.3, p.269-276, 1993.

HUANG, Yue-Hong et al. **Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis.** *Cell Signal*, v.66, 2020.

JAESCHKE, Hartmut; HASEGAWA, Tadashi. **Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury.** *Liver Int*, v.26, n.8, p.912-919, 2006.

KATO, Atsushi et al. **Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.282, n.4, p.G608-616, 2001.

KONDO, Kazunari et al. **Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, improves hepatic microcirculatory patency and oxygen availability in a high-fat-diet-induced fatty liver in mice.** *Adv Exp Med Biol*, v.662, p.77-82, 2010.

KUBES, Paul; JENNE, Craig. **Immune Responses in the Liver.** *Annu Rev Immunol*, v.36, p.247-277, 2018.

KUMAR, Santosh et al. **Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis.** *Adv Drug Deliv Rev*, v.176, 2021.

LIEHL, Peter et al. **Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection.** *Nat Med*, v.20, p.47-53, 2014.

LIEW, Pei Xiong; KUBES, Paul. **Microanatomy and Immunity in the Liver.** *Encyclopedia of Immunology*, v.3, p.434-442, 2016.

LIVAK, Kenneth; SCHMITTGEN, Thomas D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.** *Methods*, v. 25, n.4, p.402-408, 2001.

MAHAMID, Mahmud et al. **Nonalcoholic fatty liver disease is associated with COVID-19 severity independently of metabolic syndrome: a retrospective case-control study.** *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v.33, n.12, p.1578-1581, 2021.

MALTBY, J; WRINGHT, S; SHERON, N. **Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis.** Hepatology, v.24, n.5, p.1156-1160,1996.

MARCOLIN, Éder et al. **Methionine-and Choline- deficient diet induces non-alcoholic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis.** Arq Gastroenterol, v.48, n.1, 2011.

MARTIN, Jean-Pierre. **Altered pathogenicity in the liver induced by a mouse hepatitis virus type 3 thermosensitive mutant.** J Hepatol, v.13. p,61-70, 1991.

MASLAK, Edyta; GREGORIUS, Aleksandra; STEFAN, Chlopicki, **Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO-based therapy targeted to the liver.** Pharmacol Rep, v.67, n.4, p.689-694, 2015.

MCDONALD, Braedon et al. **Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.305, n.11, p.G797-806, 2013.

MØHLENBERG, Michelle et al. **The role of IFN in the development of NAFLD and NASH.** Cytokine, v.124, 2019.

MOORE, Keith L; DALLEY, Arthur F. **Anatomia orientada para clínica.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koongan, 2022.

NASRIN, Nargis. **SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells.** J Biol Chem, v.285, n.42, p.1995-2002, 2010.

NEMETH, Ester; BAIRD, Alan W; O'FARRELLY. **Microanatomy of the liver immune system.** Semin Immunopathol., v.31, n.3, p.333-343, 2009.

KUBES, Paul; JENNE, Craig. **Immune Responses in the Liver.** Annu Rev Immunol., v.36, p.247-277, 2018.

XAVIER, Prieur; RŐSZER, Tamás; RICOTE, Mercedes. **Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome.** Biochimica et biophysica acta, v.1801, n.3, p.327-337, 2010.

RINELLA, Mary E et al. **Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet.** J Lipid Res, v.49, n.5, p.1068-1076, 2008.

SACHDEVA, Sonali et al. **NAFLD and COVID-19: a Pooled Analysis.** SN Compr Clin Med, v.2, n.12, p.2726-2729, 2020.

SHETTY, Shishir; LALOR; Patricia F; ADAMS, David H. **Liver sinusoidal endothelial cells- gatekeepers of hepatic immunity**. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. v.15, n.9, p. 555-567, 2018.

STEFFAN, Anne-Marte et al. **Mouse hepatitis virus type 3 infection provokes a decrease in the number of sinusoidal endothelial cell fenestrae both in vivo and in vitro**. *Hepatology*, v.22, n.2, p.395-401, 1995.

TIEGS, Gisa; LOHSE, Ansgar W. **Immune tolerance: What is unique about the liver**. *J Autoimmun*, v.34, n.1, p.1-6, 2010.

TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen; WASSERMAN, David H. **The liver**. *Curr Biol*, v.27, n.21, p.1147-1151, 2017.

VIRELIZIER, J; ALLISON, A. **Correlation of persistent mouse hepatitis virus (MHV-3) infection with its effect on mouse macrophage cultures**. *Arch Virol*, v.50, n.4, p.279-285,1976.

WANG, Yang; LIU, Yulan. **Neutrophil-Induced Liver Injury and Interactions Between Neutrophils and Liver Sinusoidal Endothelial Cells**. *Inflammation*, v.44, n.4, p.1246-1262, 2021.

XU, Liyun et al. **Hepatic Macrophage as a Key Player in Fatty Liver Disease**. *Front. Immunol*, v.12, 2021.

YAZICI, Dilek; SEZER, Havva. **Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity**. *Adv Exp Med Biol*, v.960, p.277-304.