

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Ariane Barros Diniz

Análise das alterações imunológicas nas fases iniciais da doença hepática
gordurosa: busca por alternativas para diagnóstico precoce e tratamentos
individualizados

Belo Horizonte
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Ariane Barros Diniz

Análise das alterações imunológicas nas fases iniciais da doença hepática gordurosa: busca por alternativas para diagnóstico precoce e tratamentos individualizados

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para defesa de tese de doutorado.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte
2019

043

Diniz, Ariane Barros.

Análise das alterações imunológicas nas fases iniciais da doença hepática gordurosa: busca por alternativas para diagnóstico precoce e tratamentos individualizados [manuscrito] / Ariane Barros Diniz. - 2019.

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Hepatopatia Gordurosa não Alcoólica. 2. Fígado Gorduroso. 3. Sistema Imunitário. 4. Dieta. 5. Metabolismo. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

ARIANE BARROS DINIZ

219/2019
entrada
2º/2015
2015747952

Às **quatorze horas e trinta minutos** do dia **29 de novembro de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NAS FASES INICIAIS DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA: BUSCA POR ALTERNATIVAS PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE E TRATAMENTOS INDIVIDUALIZADOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutora 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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata 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	APROVADA
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dra. Luciana Costa Faria	UFMG	APROVADA
Dra. Mônica Morais Santos	Universidade Federal de Viçosa	Aprovada
Dr. Pedro Elias Marques Pereira Silva	Rega Institute- KU Leuven, Belgica	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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 2019.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) [Assinatura]

Dr. André Gustavo de Oliveira André Gustavo de Oliveira

Dr^a. Luciana Costa Faria Luciana Costa Faria

Dr^a. Mônica Morais Santos Mônica Morais Santos

Dr. Pedro Elias Marques Pereira Silva Pedro Elias Marques

Vanessa Pinho Professora Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG

Este trabalho foi realizado no Centro de Biologia Gastrointestinal, 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 com o fornecimento de dietas da empresa Research Diet.

“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade...”
(Raul Seixas, 1974)

"Together we stand divided we fall..."
(Pink Floyd, 1979)

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que contribuíram para que eu chegasse até aqui e neste momento só tenho motivos para agradecer.

Agradeço a minha querida mãe, meu exemplo de mulher e luta diária, obrigada pelo constante apoio, pelas infinitas conversas, pelos abraços, por confiar em mim e por me amar de maneira infinita.

Agradeço a minha irmã Isabela que será sempre minha pequena tatu, obrigada pela parceria, pelas risadas, pelo ombro amigo e por me escutar e sempre me dar uma palavra de conforto.

Agradeço ao meu papai, que mesmo diante de todas as dificuldades da vida, sempre me apoiou e incentivou a seguir meu sonho, agradeço também pelo seu imenso orgulho por eu ter me tornado o que sou hoje.

Agradeço em especial ao Gustavo, meu excelente orientador, agradeço pelo exemplo, pela inspiração, pelos conselhos, por ter contribuído tanto para o meu crescimento, e acima de tudo por sempre ter acreditado e confiado no meu trabalho.

Agradeço a minha segunda família, o CGB, as gerações novas e antigas, a todos vocês que me acompanham diariamente que me dão força e que dividem comigo momentos felizes e tristes. Do CGB, agradeço especialmente a Maísa e a Vivi, a Maísa por ter acompanhado todos os meus passos e pela ajuda constante e a Vivi por ter me ensinado a ensinar.

Agradeço também as amigas de vida que o CGB me deu, Bruna, Monica e Sarah pelo carinho infinito mesmo diante de tanta distancia.

Agradeço as “Ls” da minha vida, minhas amigas extra lab, Luiza e Leticia, por me darem tantos momentos felizes e por continuarem comigo mesmo diante das minhas ausências.

Agradeço a professora Denise por ter me trazido e me acolhido neste laboratório no inicio de minha caminhada.

Agradeço a minha madrinha Isa por estar comigo em todos os momentos da minha vida, por me dar a mão sempre que precisei.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio constante e aos meus queridos avós (Paulo, Maria Luiza e Maura) por olharem por mim e me protegerem lá de cima.

Agradeço as minhas queridas amigas da nutrição (Gi, Ba, Mari, Eriquinha, Val e Maria) por todo carinho e companheirismo mesmo que de longe.

Agradeço a todos os professores do Programa de pós-graduação em Biologia Celular que contribuíram para ampliar meus conhecimentos e a toda equipe do programa pela ajuda no dia-a-dia.

Enfim, agradeço a Deus por me conceder força e saúde para que chegasse até aqui.

Certamente sem todo este apoio eu não chegaria até aqui, fica então o meu muito obrigado a todos vocês!

Novembro de 2019

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral:.....	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais de experimentação e protocolo experimental.....	20
3.2 Avaliação do peso corporal e índice de adiposidade.....	20
3.4 Ensaios bioquímicos	21
3.5 Teste de função hepática	21
3.6 Técnicas histológicas	21
3.7 Microscopia confocal intravital.....	21
3.8 Isolamento de hepatócitos primários murinos.....	22
3.9 Isolamentos de células não-parênquimais hepáticas (LNPCs)	22
3.10 Isolamento de células de Kupffer (KCs)	23
3.11 Injeção sistêmica de <i>Escherichia coli</i>	24
3.12 Carga bacteriana no fígado (Colony Forming Unit - CFU)	24
3.13 Modelo de lesão hepática aguda induzida por droga	24
3.14 Expressão gênica por PCR em tempo real	25
3.15 Geração de quimeras	25
3.16 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Alterações no meio imunológico hepático são encontradas desde as fase iniciais da doença gordurosa do fígado não alcoólica (NAFLD).....	27
4.2 Consumo de <i>High Fat Diet</i> por curtos períodos de tempo gera alterações corporais subclínicas e causa um expressivo acúmulo de gordura nos hepatócitos	30
4.3 O ambiente imunológico hepático sofre grandes alterações nas fases iniciais da esteatose hepática.....	35
4.4 Alterações nas células de Kupffer geradas pelo consumo de high fat diet predispõe a infecções.....	40
4.5 Alterações gênicas causadas pelas fases iniciais de NAFLD são diferentes nos compartimentos imune e metabólico hepático	43
4.6 O consumo de dieta <i>high fat</i> por curtos períodos agrava a lesão hepática aguda induzida por droga, levando a um aumento nas taxas de mortalidade	47
4.7 Sinalização via Toll-like Receptor 4 (TLR4) é essencial para tolerância das células de Kupffer nas fases iniciais da NAFLD	51
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS	61

ANEXO 1	66
Tabela 1 – Composição das dietas utilizadas.....	66
ANEXO 2	67
Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para análise de expressão genica.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransfererese

APAP – *Acetaminophen*, Paracetamol

CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFU – *Colony Forming Unit*

DCs – Células Dendríticas

H&E – Hematoxilina Eosina

HF – *High Fat diet* (dieta rica em gordura)

ICG – Indocianina *Cardio Green*

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

KCs – Células de Kupffer

LNPCs – Células não parenquimais hepáticas

NAFLD – *Non-alcoholic Fat Liver Disease*, Doença Gordurosa Hepática não Alcoólica

NAS – *NAFLD Activity Score*

NASH – *Non-alcoholic steatohepatitis*, Esteato-hepatite não Alcoólica

SD – *Standard diet*, dieta padrão

PCR – Reação em cadeia de polimerase

TLR – *Toll-Like Receptors*, Receptores do tipo toll

WT – *Wild Type*, tipo selvagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com NAFLD incluídos no estudo	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão de genes inflamatórios em biópsias hepáticas humanas. ..	29
Figura 2: Desenvolvimento do modelo de esteatose em estágio inicial em camundongos através do consumo de dieta <i>high fat</i> por curto prazo.	33
Figura 3: Visualização do acúmulo de gordura hepático <i>in vivo</i> para confirmação do estágio inicial da NAFLD.	34
Figura 4: Imunofenotipagem por citometria de fluxo das fases iniciais da NAFLD.	37
Figura 5: Visualização dos neutrófilos hepáticos <i>in vivo</i> nas fases iniciais da NAFLD.	38
Figura 6: Visualização das células de Kupffer <i>in vivo</i> nas fases iniciais da NAFLD.	39
Figura 7: O consumo de dieta <i>high fat</i> por curtos períodos leva à redução da capacidade de combater infecções bacterianas.	42
Figura 8: Expressão gênica de diferentes vias imunológicas e metabólicas em células não-parenquimais do fígado e hepatócitos.	45
Figura 9: Expressão gênica de diferentes vias do sistema imunológico em células Kupffer.	46
Figura 10: Hiper-responsividade à sobredose de paracetamol (APAP) exibida por camundongos alimentados com dieta <i>high fat</i> por curtos períodos.	49
Figura 11: Expressão gênica de diferentes vias imunológicas e metabólicas em células não-parenquimais do fígado e hepatócitos em camundongos desafiados com paracetamol (APAP).	50
Figura 12: Efeitos da sinalização do receptor <i>Toll-like</i> 4 (TLR4) nos momentos iniciais da patogênese da NAFLD.	54
Figura 13: Efeitos da sinalização do receptor <i>Toll-like</i> 4 (TLR4) nos diferentes compartimentos hepáticos em momentos iniciais da NAFLD apos desafio com paracetamol (APAP).	55

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é uma das doenças crônicas mais frequentes no mundo. As limitações na compreensão de sua patogênese, especialmente nos estágios iniciais, impedem o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais eficazes e de novos tratamentos. No presente trabalho, mapeamos as alterações imunológicas no fígado durante os estágios iniciais da NAFLD em camundongos e em seres humanos, e propusemos um novo modelo animal de esteatose hepática inicial, que pode servir como uma plataforma para impulsionar os avanços no diagnóstico rápido e precoce auxiliando também nos métodos terapêuticos. Para tal, biópsias hepáticas de pacientes diagnosticados com NAFLD branda, foram coletadas para desenvolvimento de um perfil de expressão gênica, e camundongos foram alimentados com dieta *high fat* por curtos períodos para mimetizar a esteatose inicial. A resposta imune do fígado em camundongos foi investigada detalhadamente usando uma combinação de imagem intravital confocal, expressão gênica, isolamento celular, citometria de fluxo e ensaios de transplante de medula óssea. Sendo assim, foi possível observar grandes alterações imunológicas em humanos e camundongos nas fases iniciais da esteatose hepática. Em camundongos, essas alterações aumentaram significativamente a taxa de mortalidade por lesão hepática aguda induzida por drogas e também predisuseram os animais a infecções bacterianas. Além disso, a deleção de TLR4 tanto nas células imunológicas do fígado quanto nos hepatócitos reduziu a tolerância hepática, especialmente nas células de Kupffer, nos momentos iniciais de ingestão da dieta *high fat*. Dessa forma, concluímos que o sistema imunológico do fígado é capaz de sentir de maneira precoce o acúmulo de gordura hepática, gerando uma resposta bifásica ao consumo de dieta rica em gordura. Observamos ainda que as células do fígado parecem estar sendo primadas por ligantes de TLR4, o que confere ao fígado uma tolerância imunológica nas fases iniciais mas que a manutenção do insulto dietético pode levar a uma hiper-responsividade a lesões hepáticas agudas e a uma inabilidade em controlar infecções bacterianas.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most frequent chronic disease in the world, and limitations in our understanding of its pathogenesis, especially in initial stages, are precluding the development of diagnosis tools and new treatments. Here we mapped the immunological changes in liver during the early stages of fatty liver disease in mice and humans, and proposed a novel mouse model of initial liver steatosis, which may serve as a platform to drive advances in rapid diagnosis and therapeutic fields. For that, liver biopsies from patients in early stages of NAFLD were collected to further profiling of gene expression, and mice received high fat diet for short periods to mimic initial steatosis. Liver immune response in mice was detailed investigated using a combination of confocal intravital imaging, gene expression, cell isolation, flow cytometry and bone marrow transplantation assays. We observed major immunologic changes in both humans and mice in the early phases of liver steatosis. In mice, these changes significantly enhanced mortality rate upon drug-induced liver injury and also predisposed mice to bacterial infections. Also, deletion of TLR4 in liver cells dampened liver tolerogenesis, especially in Kupffer cells, in the initial time points of dietary insult. In conclusion, liver immune system acts as a sentinel for early and minor changes in hepatic lipid content, mounting a biphasic response upon high fat diet insult. Priming of liver immune cells by gut-derived TLR4 ligands may add to liver tolerogenesis in initial phases, but continuous insults may drive hyper-responsiveness to damage and reduced ability to control infections.

1. INTRODUÇÃO

O fígado é considerado o maior órgão interno do corpo, anatomicamente, localiza-se no quadrante superior direito do abdômen, logo abaixo do diafragma e constitui aproximadamente 2,5% da massa corpórea total (Vollmar e Menger, 2009). Microscopicamente, o fígado é dividido em diversas seções poliédricas, denominadas lóbulos hepáticos, onde estão localizados os hepatócitos, que são as células do parênquima hepático. Os hepatócitos se estendem da periferia do lóbulo até um vaso central, denominado veia centrolobular. Estas células parenquimais formam cordões que se entremeiam por uma vasta rede de pequenos vasos semelhantes aos capilares, conhecidos como sinusóides (Vollmar e Menger, 2009; Jenne e Kubes, 2013).

O fígado é responsável por desempenhar funções metabólicas, biosintéticas e detoxificantes. Tais atividades vitais são realizadas pelos hepatócitos, que constituem cerca de 60% a 80% de todas as células do fígado (Vollmar e Menger, 2009; Xu *et al.*, 2014). Dentre essas funções estão a produção de albumina, fatores de coagulação e proteínas de fase aguda; metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos; secreção de bile e hormônios; armazenamento energético, controle glicêmico, dentre outras. Somado a isso, estas células parenquimais também apresentam grande capacidade de detoxificar compostos como amônia, hormônios esteróides, medicamentos, contaminantes ambientais, álcool e drogas (Rossaint e Zarbock, 2013).

Além dos hepatócitos, o fígado abriga uma vasta rede imunológica que constitui uma das primeiras linhas de defesa entre o hospedeiro e o meio ambiente. Essa complexa rede celular, é composta por células *natural killer* (NKs), T *natural killer* (NKTs), linfócitos T, linfócitos B, células dendríticas (DCs), neutrófilos, eosinófilos e componentes do complemento. Existe ainda uma população singular de macrófagos residentes, as células de Kupffer (KCs), localizadas no interior dos sinusóides (Jenne e Kubes, 2013; Xu *et al.*, 2014). O envolvimento da população imune hepática na captura e reconhecimento de patógenos já é bem descrito e aceito, porem a literatura já descreve a

participação de tais células na progressão de doenças crônicas como a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). As células dendríticas parecem ser imunorreguladoras pois sua depleção exacerba a inflamação o dano hepático e a fibrose (Henning *et al.*, 2013; Tacke e Yoneyama, 2013; Heymann e Tacke, 2016). Os macrófagos tem papel crítico na inflamação e na resistência a insulina e em pacientes com fibrose estes são encontrados em números elevados; as células de Kupffer são capazes de propagar a inflamação via TNF e segundo Zeng sua depleção atenua a inflamação hepática, porém Wan e colaboradores mostram que tais células podem ter um efeito protetor hepático na NAFLD ao expressarem IL-10 (Tomita *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015; Heymann e Tacke, 2016). O papel dos neutrófilos nas doenças hepáticas crônicas ainda não é bem estabelecido, porém é comum observar um infiltrado neutrofilico nos quadros de NASH (Liang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014; Heymann e Tacke, 2016). Os linfócitos T, tanto TCD4⁺ como TCD8⁺ mostram-se elevados na NASH e parecem ser ativados promovendo inflamação e progressão da doença (Wolf *et al.*, 2014; Heymann e Tacke, 2016). As células NKT levam ao aumento da inflamação e da fibrose hepática contribuindo para progressão da patologia e além disso, são capazes de promover a esteatose via aumento da captação lipídica pelos hepatócitos (Syn *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2014; Heymann e Tacke, 2016). De maneira geral a maioria das células imune hepáticas parecem estar envolvidas na progressão e/ou desenvolvimento da NAFLD e NASH. Porém pouco se sabe sobre o comportamento e papel da população imune hepática nas fases iniciais da NAFLD.

Devido ao grande número de atividades realizadas pelo fígado, sabe-se que este órgão encontra-se vulnerável a injúrias induzidas por diversas condições, como por exemplo, consumo excessivo de gorduras e uso abusivo de medicamentos (Rossaint e Zarbock, 2013; Vinken *et al.*, 2013). O consumo excessivo de gordura pode gerar um acúmulo de gordura no fígado capaz de danificar diretamente os hepatócitos, podendo levar ao desenvolvimento de uma doença hepática crônica (Tessari *et al.*, 2009).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é atualmente uma

das principais causas de lesão hepática crônica, e a incidência desta doença vem crescendo rapidamente ao longo dos anos (ABDELMALEK, 2016; YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018). Estima-se que a prevalência mundial de NAFLD tenha sido de 15% em 2005, aumentando para 24% no ano de 2017 (YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018). O continente que concentra a maior incidência de NAFLD é a América do Sul, onde 31% da sua população é acometida por NAFLD, sendo o Brasil detentor de aproximadamente 20% dos portadores (YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018). Os estudos que indicam a frequência de NAFLD na população brasileira ainda são escassos, porém em um estudo realizado por Cotrim e colaboradores, pacientes que já possuíam o diagnóstico de NAFLD em diferentes regiões brasileiras foram avaliados, e identificou-se que dentre estes 42% apresentavam esteatose simples, 58% esteatohepatite e 27% apresentavam fibrose. Ainda, esse estudo concluiu que no Brasil a NAFLD é mais frequente em homens e na forma assintomática (COTRIM; PARISE; OLIVEIRA; LEITE *et al.*, 2011). Apesar de já serem muito elevadas, as porcentagens de frequência de NAFLD podem ser ainda maiores, uma vez que estudos baseados somente em dosagem sérica de transaminases hepáticas podem subestimar tal índice (YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018).

Além dos danos à saúde dos indivíduos, a NAFLD traz grande impacto econômico acarretando em enormes gastos para o sistema público de saúde. Somente nos EUA, por exemplo, gastam-se anualmente 103 bilhões de dólares com estes pacientes, e devido a sua rápida expansão, estima-se que tais gastos aumentem em dez vezes até o ano de 2025 (ABDELMALEK, 2016; YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018).

A doença hepática gordurosa não alcoólica é caracterizada histologicamente pela presença de vacúolos de lipídeos em mais de 5% dos hepatócitos, e que ocorre na ausência de consumo significativo de álcool, uso de medicação esteatogênica ou distúrbios hereditários que possam causar acúmulo de gordura no fígado não relacionados à alimentação (MICHAUT; MOREAU;

ROBIN; FROMENTY, 2014; TESSARI; CORACINA; COSMA; TIENGO, 2009). Critérios histológicos subdividem a NAFLD em Esteatose Simples (NAFL) e Esteatohepatite Não Alcoólica (NASH). A NAFL é caracterizada pela presença de esteatose isolada ou associada a inflamação lobular, porém sem a existência de demais injúrias hepáticas. Já nos quadros de NASH são observados balonismo de hepatócitos, necrose, fibrose e/ou corpos de Mallory-Denk. A NAFLD pode variar de uma forma benigna até formas mais graves, podendo progredir para cirrose em até 25% dos pacientes, estando associada a risco de 15-20% de progressão para carcinoma hepatocelular (BELLENTANI, 2017; BYRNE; TARGHER, 2015; ITAGAKI; SHIMIZU; MORIKAWA; OGAWA *et al.*, 2013; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; YOUNOSSI; STEPANOVA; RAFIQ; MAKHLOUF *et al.*, 2011).

A NAFLD pode ter diversas etiologias, e dentre as causas alimentares o consumo excessivo de frutose e/ou gordura saturada tem sido apontado como fator principal para o desenvolvimento da doença, sendo capaz de gerar o acúmulo de lipídios hepáticos e aumentar os níveis de insulina plasmática, induzindo a resistência à insulina podendo afetar a função mitocondrial (FEROLLA; FERRARI; LIMA; REIS *et al.*, 2013; TESSARI; CORACINA; COSMA; TIENGO, 2009; YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018). O consumo excessivo de gorduras também é citado como um dos principais fatores capazes de causar o fenótipo denominado “*Lean NAFLD*” onde os pacientes não apresentam obesidade, têm o peso corporal normal, porém desenvolvem diversos estágios da NAFLD. Estima-se que casos com este padrão já atinjam cerca de 10 a 20% de americanos e europeus (YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018). E de forma ainda mais preocupante, pelo menos 10% das crianças já estão desenvolvendo esteatose (CHALASANI; YOUNOSSI; LAVINE; CHARLTON *et al.*, 2018); portanto, além de ações educativas voltadas para a nutrição adequada, é de grande interesse e importância ampliar o conhecimento sobre a patogênese da NAFLD, principalmente nos estágios iniciais.

É bem aceito que o padrão ouro para o diagnóstico de NAFLD continua

sendo uma biópsia hepática. Apesar dos avanços tecnológicos na busca por marcadores moleculares sanguíneos e por técnicas de imagem em alta definição, ainda não encontra-se disponível um teste para detecção de NAFLD na população em geral, especialmente em estágios iniciais da doença (FRIEDMAN; NEUSCHWANDER-TETRI; RINELLA; SANYAL, 2018; SINGH; ALLEN; WANG; PROKOP *et al.*, 2015). Devido a essa relativa falta de marcadores confiáveis, a maioria dos pacientes com NAFLD pode ser considerada assintomática. Nesse cenário, milhões de pacientes evoluem para cirrose antes de serem diagnosticados, com uma carga econômica anual estimada em 200 bilhões de euros na Europa (YOUNOSSI; BLISSETT; BLISSETT; HENRY *et al.*, 2016) e mais de U\$ 100 bilhões nos Estados Unidos (YOUNOSSI; ANSTEE; MARIETTI; HARDY *et al.*, 2018).

Desenvolver um modelo animal capaz de mimetizar o espectro de NAFLD exibido em humanos pode ser extremamente desafiador. Atualmente os protocolos mais utilizados para o este tipo de estudo são aqueles onde os animais são expostos a longos períodos (30 semanas) de consumo de dietas desequilibradas em macro e/ou micronutrientes (LYNCH; KINZENBAW; CHEN; ZHAN *et al.*, 2013; TSUCHIDA; LEE; FUJIWARA; YBANEZ *et al.*, 2018). No entanto, esses protocolos induzem as formas mais graves e estágios mais avançados da NAFLD, impedindo a avaliação dos eventos iniciais desencadeados pela dieta que, por sua vez, podem representar a maioria dos pacientes assintomáticos.

Estágios iniciais da doença merecem especial atenção. Ao medirmos a expressão gênica de diferentes vias inflamatórias em biopsias hepáticas de pacientes diagnosticados com estágios iniciais de NAFLD encontramos várias alterações nos genes envolvidos na resposta imune incluindo uma alta expressão de mRNA para o receptor Toll-like 4 (TLR4). Dessa forma investimos no desenvolvimento de um novo modelo animal utilizando um protocolo de exposição em curto prazo a um dieta *high fat* (2-9 semanas), o que nos permitiu obter fases iniciais da NAFLD em camundongos possibilitando uma extensa caracterização das alterações imunológicas e metabólicas iniciais no fígado.

Com isso, mostramos que camundongos nos primeiros estágios da NAFLD apresentam resposta inflamatória exacerbada a uma lesão hepática aguda induzida por droga, resultando em uma taxa de mortalidade de 100% nas primeiras 24 horas após o insulto. Além disso, camundongos com NAFLD em estágio inicial apresentaram maior suscetibilidade a infecções bacterianas, o que pode ser explicado pelas profundas alterações observadas no número e na função dos macrófagos hepáticos. Juntos, esses dados revelaram uma janela de suscetibilidade a danos hepáticos e infecções bacterianas, anteriormente não identificadas nos estágios iniciais da NAFLD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Identificar alterações na resposta imune e metabólica hepática nas fases iniciais da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), capazes de descrever a cronologia das modificações hepáticas encontradas na NAFLD.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar alterações gênicas em pacientes diagnosticados com estágios iniciais de NAFLD e que não apresentem sintomatologia clássica de doença hepática;
- Desenvolver um modelo animal capaz de mimetizar as fases iniciais da NAFLD semelhante ao encontrado em humanos;
- Identificar alterações na frequência e no perfil das células imunes hepáticas nas fases iniciais da NAFLD;
- Identificar a contribuição de cada um dos compartimentos hepáticos (imune e metabólico) na patogênese da NAFLD;
- Desenvolver e/ou investigar métodos capazes de auxiliar no diagnóstico precoce da NAFLD.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação e protocolo experimental

Foram utilizados camundongos C57BL/6 *wild type* (WT) e TLR4^{-/-} machos, com idade entre 12 e 14 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia em gaiolas de plástico contendo até cinco animais, e em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), com água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram alimentados com dieta padrão (*standard diet* – SD – D12450J – 10% das calorias provenientes de gordura) ou dieta hiperlipídica (*high fat diet* – HF – D12492 – 60% das calorias provenientes de gordura) por 2, 4, 6 ou 9 semanas. A composição completa das dietas encontra-se no Anexo 1, tabela 1. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (CEUA 392/2016).

3.2 Avaliação do peso corporal e índice de adiposidade

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período experimental. Os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram coletados, pesados e utilizados para determinar o índice de adiposidade [(soma do peso do tecido epididimal, retroperitoneal e mesentérico (g)) ÷ peso corporal x 100].

3.3 Teste oral de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

Para teste oral de tolerância à glicose, os camundongos foram submetidos a jejum por 6 horas e, em seguida, receberam por via oral uma solução de D-glicose (2 g / kg) por gavagem. A glicemia capilar foi medida através do sangue da veia caudal aos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da glicose, utilizando um glicosímetro (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). Para o teste de tolerância à insulina, os camundongos receberam uma solução de insulina (0,75 UL / kg / i.p. Humulin® - Lilly) e a glicemia foi medida 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção. O teste foi realizado no estado alimentado (NAGY; EINWALLNER, 2018).

3.4 Ensaios bioquímicos

A atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) foi determinada utilizando-se um teste cinético (Bioclin), adaptado conforme instruções do fabricante. Adipocinas foram dosadas por kits de ELISA e as amostras processadas segundo protocolo do fabricante (R&D Systems). Glicose, triglicérides e colesterol séricos foram dosados com o kit KATAL. Para ácidos graxos livres sérico utilizou-se o kit WAKO (Pure Chemical Industries, Japan).

3.5 Teste de função hepática

O verde de indocianina (ICG; Sigma-Aldrich) foi medido conforme descrito anteriormente (DAVID; REZENDE; ANTUNES; SANTOS *et al.*, 2016). Resumidamente, os camundongos receberam 20 mg / kg, via intravenosa (i.v.), do corante ICG e após 20 minutos o sangue foi coletado pela veia cava inferior. O plasma diluído foi plaqueado em placa de poliestireno de 96 poços (Nunc, Dinamarca) e a absorvância medida a 800 nm usando um leitor de microplacas (Versa Max).

3.6 Técnicas histológicas

O tecido adiposo epididimal e fragmentos de fígado foram coletados para análises histológicas e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens digitais foram obtidas usando objetiva de 10x ou 20x em um microscópio óptico (Olympus, Center Valley, PA e Nikon Eclipse Ti). As lâminas humanas de H&E foram coletadas no Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas - UFMG. Os procedimentos com amostras humanas estão de acordo com os padrões éticos do COEP-UFMG (número de registro: CAAE 56184716.3.0000.5149) e o consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos.

3.7 Microscopia confocal intravital

As imagens de microscopia confocal intravital foram realizadas conforme descrito (MARQUES; ANTUNES; DAVID; PEREIRA *et al.*, 2015). Em resumo, os

camundongos foram anestesiados com injeção subcutânea (s.c.) de ketamina (60 mg por kg, Syntec) e xilazina (15 mg por kg, Syntec). Uma laparotomia foi realizada para expor o fígado para aquisição das imagens. Antes da cirurgia, os animais receberam uma dose única dos seguintes anticorpos ou sondas fluorescentes diluídas em solução salina estéril: anti-F4/80 Alexa Fluor 647 (2 µg / mouse, clone T45-2342, BD); anti-Ly6G PE (2 µg / camundongo, clone 1A8, BD); anti-CD31 BV-421 (3 µg / camundongo, clone 390, BD). Para visualizar as gotículas lipídicas *in vivo*, o corante Bodipy (1,5 µg / camundongo diluído em metanol) foi colocado diretamente no fígado após a cirurgia. As imagens foram obtidas usando microscópio Nikon Eclipse Ti acoplado a cabeça confocal A1R equipado com quatro lasers (excitação em quatro comprimentos de onda: 405, 488, 546 e 647 nm) e filtros de emissão em 450/50, 515/30, 584/50 e 663 / 738 nm. Objetiva 20x Plan Apo. A quantificação digital foi feita utilizando os softwares Volocity (6.3) (Perkin Elmer, Waltham, MA) e NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., EUA).

3.8 Isolamento de hepatócitos primários murinos

A purificação primária de hepatócitos foi realizada conforme descrito anteriormente (DAVID; RUBINO; MOREIRA; FREITAS-LOPES *et al.*, 2017). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados e submetidos à perfusão hepática com colagenase (*Collagenase from Clostridium histolyticum, Type VIII*. Sigma-Aldrich, C2139) através da veia porta. Após a perfusão, a cápsula hepática foi dissociada em meio de cultura Williams. A suspensão celular foi filtrada em malha de nylon estéril de 40 µm e as células foram diferencialmente separadas por centrifugação. Após centrifugação, a viabilidade celular foi determinada por corante azul de tripan.

3.9 Isolamentos de células não-parênquimais hepáticas (LNPCs)

As células não parenquimais do fígado (LNPCs) de camundongos foram isoladas como descrito anteriormente (ANTUNES; ARAÚJO; DINIZ; PEREIRA *et al.*, 2018). Em resumo, o fígado foi removido e digerido usando uma solução de

RPMI com colagenase tipo VIII (1 mg por mL; Sigma, cat. N° C2139). O fígado foi cortado em pedaços pequenos e incubado por 30 min a 37°C sob agitação constante. O homogenato de tecido passou por centrifugações diferenciais (1°: 300 × g; 5 min; 4 ° C. 2° e 3°: 60 × g, 3 min, 4 ° C). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em *cell strainer* (70 µm) seguido de nova centrifugação (300 × g; 5 min; 4 ° C) filtrado e centrifugado (300 × g; 5 min; 4 ° C). Os eritrócitos foram lisados com solução ACK 1x seguida de centrifugação (300 × g; 5 min; 4 ° C). O *pellet* com LNPCs foi reconstituído em solução de BSA para posterior análise (FACS e RT-PCR). Para citometria de fluxo, 2 x 10⁵ células foram incubadas com FcBlock (BD, USA. Clone 2-4G2) e em seguida marcadas com os anticorpos monoclonais anti-NK1.1 conjugado a PE (ImmunoTools, GER), anti-CD11c conjugado a PE (eBioscience, EUA. Clone N418), anti-CD3 conjugado a PeCy5 (BD, USA. Clone 145-2C11), anti-F4/80 conjugado a APC (BioLegend, EUA. Clone BM8), anti-CD19 conjugado a APC H7 (BD, USA. Clone 1D3) e anti-Ly6G conjugado a APC H7 (BD, USA. Clone 1A8) e incubadas por 30 minutos. Os eventos foram adquiridos usando o citômetro de fluxo Accuri C6 (BD biosciences, EUA) e analisados usando o *software* FlowJo (FlowJo, EUA).

3.10 Isolamento de células de Kupffer (KCs)

Após realizado o isolamento de células não-parenquimais hepáticas, como descrito anteriormente, as células de Kupffer foram isoladas por meio de separação magnética. Resumidamente, após o isolamento das LNPCs, todas as células adquiridas foram incubadas com anti-F4/80 conjugado com PE por 30 min a 4°C (Invitrogen, EUA. Clone BM8) e, em seguida, incubadas com anticorpo anti-PE conjugado com esferas magnéticas por 30 min a 4°C (clone E31-1459, BD Biosciences, EUA). As amostras foram então colocadas em um magneto (iMag, BD Biosciences, EUA) por 15 min. A pureza e eficácia da extração foram confirmadas por citometria de fluxo (Accuri C6, BD biosciences, EUA) e analisadas por FlowJo (FlowJo, EUA). As células de Kupffer isoladas foram rapidamente congeladas e armazenadas a -80°C para posterior realização de RT-PCR.

3.11 Injeção sistêmica de *Escherichia coli*

Escherichia coli GFP (ATCC 25922GFP) foram cultivadas em meio caldo Luria (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Para os experimentos de citometria de fluxo, os camundongos receberam 5×10^6 GFP-*E. coli* para cada 20 g (peso corporal) por via intravenosa (i.v.). Cinco minutos após a injeção de bactérias, 10 μ L de sangue foram imediatamente retirados da veia cava inferior e diluídos em solução salina tamponada com fosfato (1:40) e lidos no citômetro de fluxo Accuri C6. A porcentagem de todos os eventos positivos para GFP adquiridos foi usada para estimar o número de *E. coli* livre na circulação sistêmica. Para obtenção dos vídeos e imagens da captura de *E. coli in vivo*, os camundongos receberam 5×10^7 GFP-*E. coli* por via intravenosa e foram filmados em microscópio confocal por 10 minutos. A quantidade de bactérias injetadas foi ajustada de acordo com o peso do camundongo (5×10^7 *E. coli* / 20g de peso do camundongo).

3.12 Carga bacteriana no fígado (Colony Forming Unit - CFU)

Para estimativa da quantidade de unidades formadoras de colônias (CFU), os camundongos receberam por via intravenosa 5×10^6 GFP-*E. coli* por 20 g (peso corporal). 24 horas após a injeção, o fígado foi removido e alíquotas em diferentes diluições foram cultivadas em placas de Petri contendo meio ágar com ampicilina a 37° C por aproximadamente 16 horas.

3.13 Modelo de lesão hepática aguda induzida por droga

Para indução de lesão hepática aguda os camundongos foram submetidos a jejum de 12 a 15 horas antes da administração oral de paracetamol (acetaminophen-APAP) (400 mg / kg) ou veículo (solução salina 0,9% aquecida). O paracetamol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em uma solução salina 0,9% aquecida a uma concentração de 50 mg/mL. Os animais receberam essa solução através de gavagem.

3.14 Expressão gênica por PCR em tempo real

Para análises de expressão gênica amostras de RNA total foram obtidas do fígado total, hepatócitos, LNPCs e células Kupffer de camundongos e do fígado total de humanos (número de registro: CAAE 67583317.3.0000.5149) usando o ReliaPrep™ RNA TissueMiniprep System® (Promega), o RNA obtido foi quantificado em NanoDrop®. A transcrição reversa do RNA foi realizada usando o iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). Os cDNAs resultantes foram amplificados por reação de qPCR com a iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) utilizando Rotor-Gene Q (Qiagen). O *fold increase* de cada amostra foi calculado através do $\Delta\Delta Ct$, usando como normalizador: *Gapdh* para fígado total e hepatócitos de camundongos; *18S* para LNPCs e células de Kupffer de camundongos; e *ACTB* para fígado total humano. Os *primers* utilizados estão relacionados no Anexo 1 tabela 2.

3.15 Geração de quimeras

As quimeras de medula óssea foram realizadas conforme descrito anteriormente (ANTUNES; ARAÚJO; DINIZ; PEREIRA *et al.*, 2018). Resumidamente, os camundongos foram tratados com antibiótico (Ciprofloxacino – 24mg/L) por 3 dias antes da transferência de células, passando por duas sessões de radiação gama (5 Gy + 4 Gy. Cobalt Source 60. CDTN- UFMG), seguidos de 12 dias de antibiótico após irradiação. Os camundongos irradiados do tipo WT ou TLR4^{-/-} receberam 1×10^7 células de medula óssea por via intravenosa de camundongos WT ou TLR4^{-/-}, gerando os seguintes grupos: WT > WT; WT > TLR4^{-/-} ; TLR4^{-/-} > TLR4^{-/-} e TLR4^{-/-} > WT. Os camundongos passaram por um período de recuperação de 8 semanas antes da realização dos experimentos, tempo necessário para repovoamento celular.

3.16 Análise Estatística

Inicialmente as amostras foram submetidas ao teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Quando paramétricas, foi utilizado o teste *One-way ANOVA* com *post test* de Tukey. Em caso de variáveis não-paramétricas, as amostras foram

submetidas ao teste *T Student*. Todos os dados foram apresentados com a média \pm SEM. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os gráficos e as análises estatísticas foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1 Alterações no meio imunológico hepático são encontradas desde as fases iniciais da doença gordurosa do fígado não alcoólica (NAFLD)

Classicamente a esteatose simples é caracterizada por acúmulo de gordura nos hepatócitos na ausência de inflamação, porém esse armazenamento não convencional de lipídeos pode ser considerado como um insulto para o fígado. Levando em consideração que o fígado abriga uma vasta população de células imunes, nos propusemos a investigar o comportamento do microambiente hepático diante deste insulto em suas fases iniciais. Para tal, inicialmente avaliamos a expressão de genes inflamatórios de pacientes em estágios iniciais de NAFLD. O grau de esteatose desses pacientes foi definido utilizando-se o escore histopatológico NAS (NAFLD *Activity Score*) (KLEINER; BRUNT; VAN NATTA; BEHLING *et al.*, 2005) e os pacientes incluídos nas análises apresentaram pouca ou nenhuma alteração nos níveis séricos de enzimas hepáticas e foram classificados como sobrepeso ou com obesidade de baixo grau (tabela 1). Através das análises por RT-PCR foi possível identificar que pacientes em estágios iniciais de esteatose (NAS 2 e 3), mesmo sem grandes alterações em exames bioquímicos, possuem mudanças na expressão hepática de genes inflamatórios como *TNF*, *IL1B*, *IL6* e *IL10*, que em sua maioria mostram-se aumentados no NAS 2 e reduzidos em NAS 3. Apesar dessa flutuação de expressão entre os escores 2 e 3, ao avaliarmos a expressão de receptores do tipo Toll (TLR) encontramos um consistente e progressivo aumento na expressão de *TLR4* (Figura 1B). Esse resultados sugerem que a resposta imunológica hepática frente a esteatose ocorre de maneira precoce e pode ser significativa mesmo em estágios iniciais da NAFLD, gerando assim um alerta para a necessidade de investigação de tais alterações em estágios iniciais da doença e para criação de uma possível ferramenta diagnóstica adicional para fases iniciais de NAFLD.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com NAFLD incluídos no estudo

Identificação do Paciente	Sexo	Idade (anos)	NAS	IMC (kg/m²)	ALT (U/L)	AST (U/L)
1	Feminino	30	3	37,41	63	48
2	Feminino	59	2	31,5	41	22
3	Feminino	48	2	27,9	144	121
4	Feminino	55	3	33,33	53	33
5	Masculino	58	3	26,23	73	50
6	Feminino	59	3	32	241	73
7	Feminino	65	2	36,05	63	45
8	Masculino	54	2	29,64	42	40
9	Feminino	39	3	38,9	23	18
10	Feminino	63	2	30,7	40	23

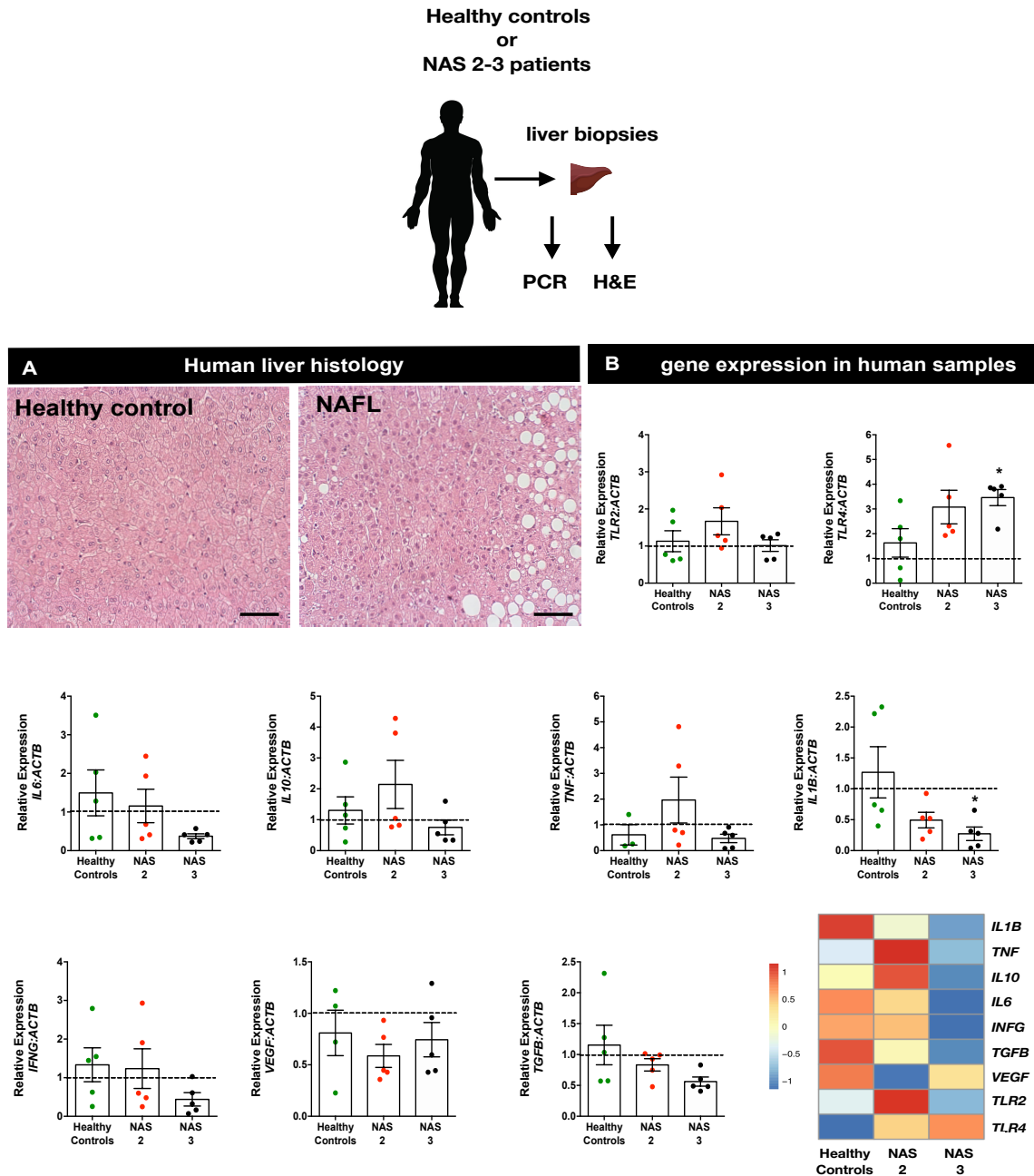


Figura 1: Expressão de genes inflamatórios em biópsias hepáticas humanas. Expressão de diferentes genes relacionados ao sistema imunológico em amostras de pacientes em estágio inicial de NAFLD e em pacientes saudáveis. (A) Histopatologia selecionada de um doador saudável (achados normais) e paciente com NAS 2 mostrando esteatose inicial. Todas as biópsias foram analisadas por um patologista experiente antes de ensaios de expressão gênica. (B) Expressão gênica avaliada por PCR em tempo real e representação gráfica no formato *Heat map*. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando-se o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados em amostras de pacientes saudáveis. Barra = 50 μm . * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle de pacientes saudáveis.

4.2 Consumo de *High Fat Diet* por curtos períodos de tempo gera alterações corporais subclínicas e causa um expressivo acúmulo de gordura nos hepatócitos

Sabe-se que o consumo excessivo de gordura é capaz de causar alterações sistêmicas e disfunções metabólicas. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura utilizam modelos animais de longa duração (superiores a 16 semanas de desafio nutricional) e tem como foco estudar os efeitos crônicos do desbalanço alimentar e as fases tardias da NAFLD. Porém, ao identificarmos alterações gênicas em pacientes com mínimas alterações clínicas e com esteatose em estágio inicial, visamos desenvolver um modelo animal capaz de mimetizar as fases iniciais da NAFLD. Para tal, desenvolvemos um protocolo onde camundongos foram alimentados com *standard diet* (SD - 10% de gordura) ou *high fat diet* (HF - 60% de gordura) por 2,4, 6 e 9 semanas. Ao final dos períodos estabelecidos foi possível observar que os animais que consumiram dieta *high fat* – independente do tempo de consumo – não apresentaram alterações no ganho de peso, e nos níveis de triglicérides e ácidos graxos livres séricos, quando comparados com animais que consumiram dieta controle (SD) (Figura 2 A-D). Alterações nos níveis séricos de glicose, na tolerância a glicose e na resistência a insulina só foram encontradas após 4 semanas de consumo de HF (Figura 2 F-H). O único parâmetro clínico avaliado que mostrou-se alterado desde a segunda semana de consumo foi o nível sérico de colesterol (Figura 2 E). Apesar de não encontrarmos mudanças no peso corporal, o índice de adiposidade encontra-se aumentado a partir da sexta semana pós consumo de HF, e ao avaliarmos histologicamente o tecido adiposo epididimal, encontramos uma aumento progressivo na área de adipócitos após 4 semanas de ingestão de HF (Figura 2 I-K). Embora tenhamos observado um aumento no índice de adiposidade e na área dos adipócitos, ao dosarmos os níveis séricos de adiponectina não encontramos alterações em nenhum dos tempos estudados (Figura 2 L). É importante ressaltar que os níveis séricos de adiponectina estão diretamente relacionados com graus mais graves de

obesidade e ao aparecimento de disfunções metabólicas. Ainda buscando identificar parâmetros clínicos detectáveis em curtos tempos de ingestão de HF, avaliamos os níveis séricos de ALT (alanina aminotransferase) e não encontramos nenhuma alteração – nem nos tempos mais tardios estudados (HF 9 semanas) – ressaltando que a dosagem sérica de ALT é comumente utilizada na clínica para detecção de lesões e/ou doenças hepáticas. Considerando que os níveis séricos de ALT indicam não haver uma lesão hepática, investigamos a capacidade funcional do fígado através do teste de verde de indocianina (ICG) e os resultados encontrados mostram que a capacidade depurativa do fígado encontra-se preservada durante todo o protocolo experimental (Figura 2 N). Histologicamente, através de cortes corados em H&E (também utilizados rotineiramente para diagnóstico de doenças hepáticas), foi possível visualizar discretas alterações como a presença de gotículas lipídicas (indicadas pelas setas pretas) apenas após 6 e 9 semanas de consumo de HF (Figura 2 M), sugerindo que tal método não se mostra eficaz para detecção de mudanças teciduais em tempos iniciais de NAFLD. A combinação destes resultados sugere que o consumo de HF por curtos períodos de tempo não é capaz de alterar diversos parâmetros clínicos que são utilizados frequentemente como marcadores/indicadores de doença hepática.

Buscando avaliar de forma mais eficaz e em alta definição as alterações hepáticas causadas pelo consumo de *high fat* por curtos períodos, desenvolvemos um método capaz de visualizar gotículas lipídicas *in vivo*. Utilizando o corante *Bodipy* submetemos os animais a microscopia confocal intravital e através das imagens obtidas foi possível identificar a presença de gotículas lipídicas desde os tempos iniciais (2 semanas) de consumo de HF e ainda quantificar esse acúmulo. A quantificação nos mostra que ocorre um aumento progressivo no número e área das gotículas lipídicas, sendo que esse aumento é proporcional ao tempo de ingestão de dieta rica em gordura (Figura 3). Para certificar qual a localização destas gotículas lipídicas fizemos imagens em 3D *in vivo* corando simultaneamente os sinusoides hepáticos e as gotículas lipídicas, que nos permitiram identificar que estas encontram-se no espaço inter-

sinusoidal, confirmando que estão armazenadas dentro de hepatócitos (Figura 3 B). A união desses resultados sugere que mesmo com discretas alterações em parâmetros clínicos o consumo de dieta *high fat* gera um acúmulo de gordura no fígado desde os tempos iniciais (2 semanas) e que só é possível identificar tal condição através de métodos de imagem de alta definição, o que nos permite dizer que geramos um modelo de NAFLD silenciosa.

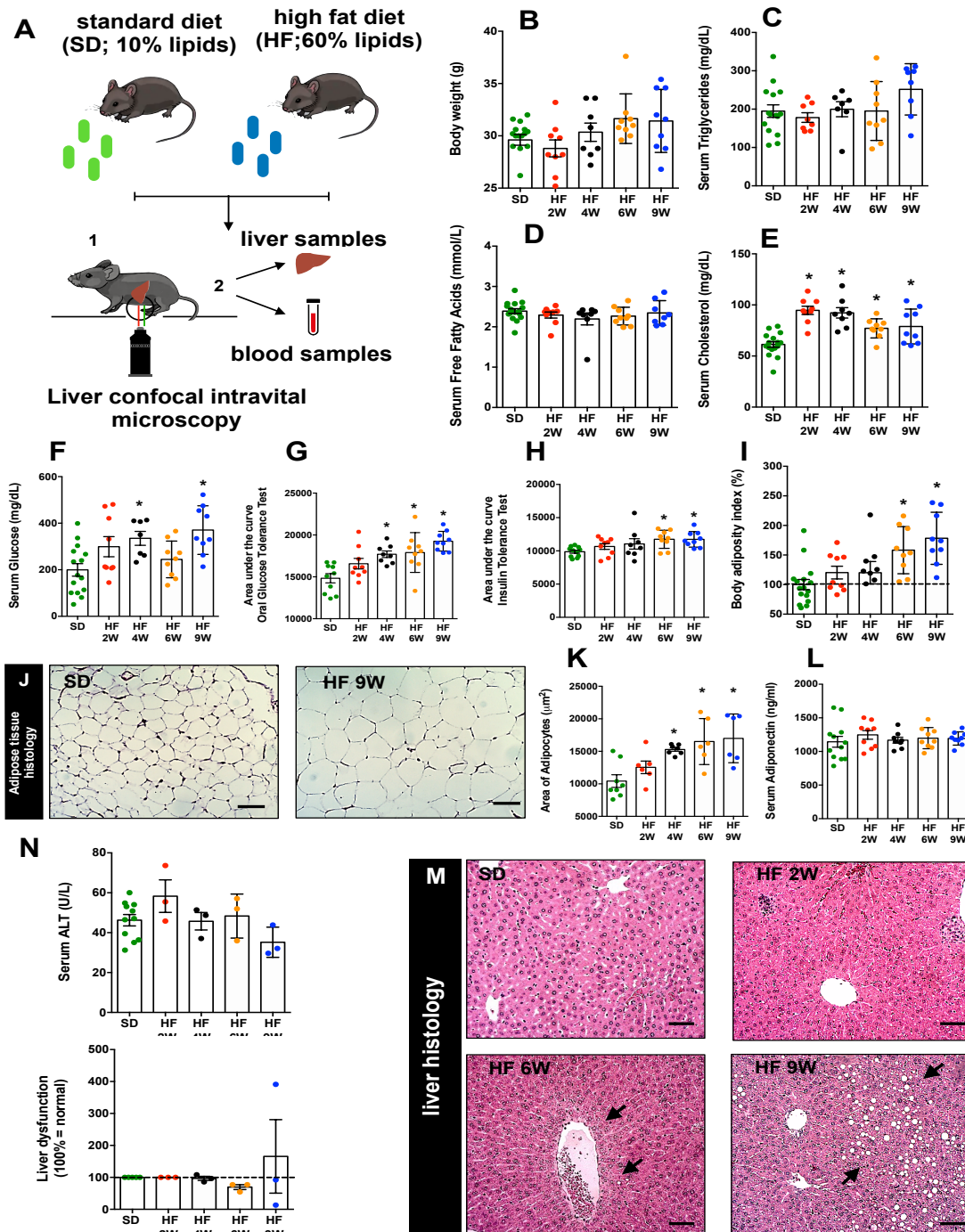


Figura 2: Desenvolvimento do modelo de esteatose em estágio inicial em camundongos através do consumo de dieta *high fat* por curto prazo. (A) Protocolo experimental de dieta *high fat* em curto prazo. (B) Peso corporal de camundongos durante o período experimental. (C-F) Níveis séricos de diferentes parâmetros clínicos. (G-H) Avaliação da tolerância à glicose e resistência a insulina em diferentes grupos. (I) Alterações no índice de adiposidade corporal durante o desafio alimentar. (J-L) Quantificação histológica e digital da morfologia do tecido adiposo. (M-N) Histologia hepática, níveis séricos de ALT e avaliação da função hepática utilizando o teste de depuração do verde de indocianina. Barras = 50 µm em J e M. *p < 0,05 comparado ao grupo SD.

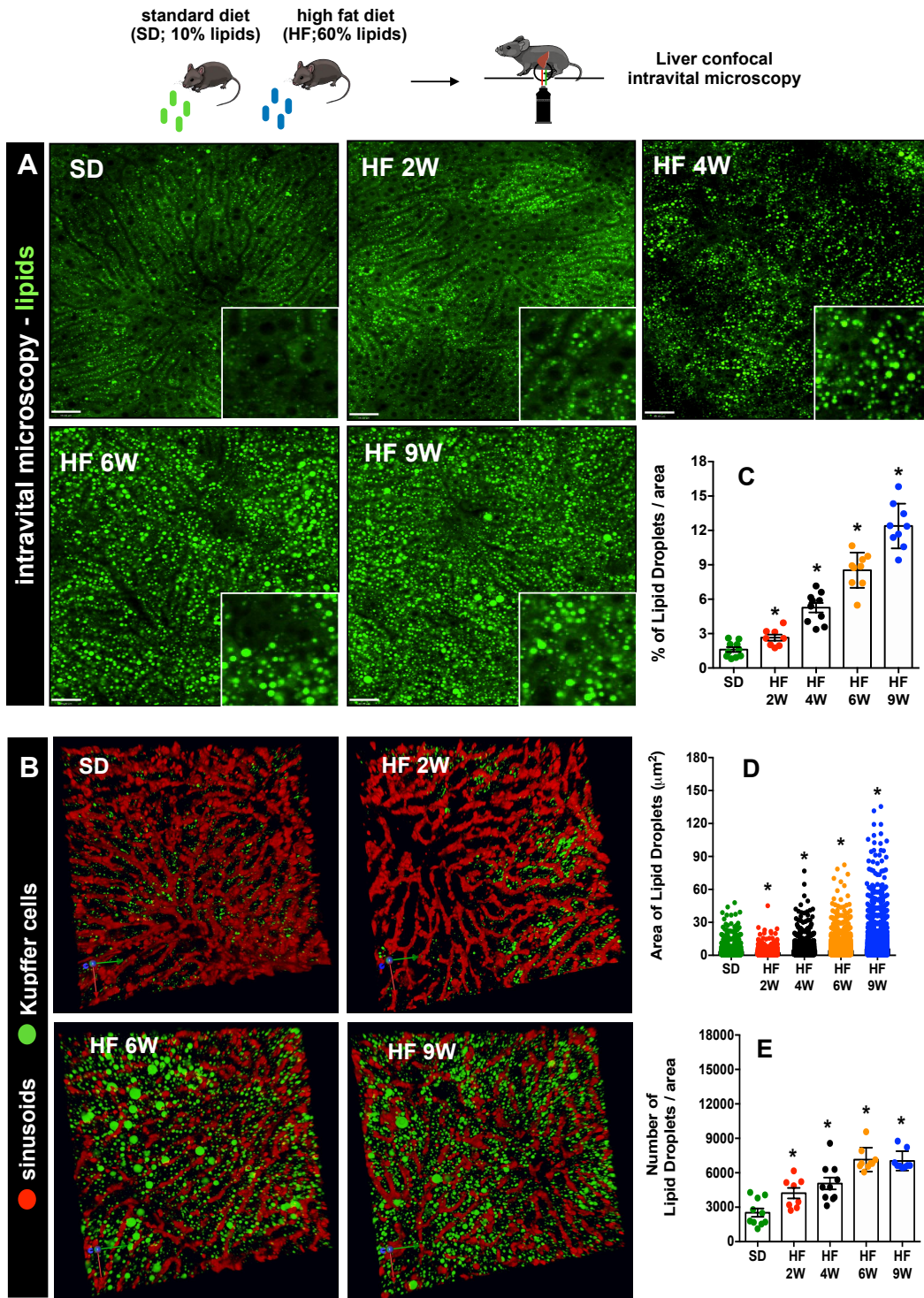


Figura 3: Visualização do acúmulo de gordura hepática *in vivo* para confirmação do estágio inicial da NAFLD. (A-B) Avaliação por microscopia intravital da deposição de gotículas lipídicas e quantificação digital (C-E). Barras = 28 μm (zoom digital de 4x na inserção). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

4.3 O ambiente imunológico hepático sofre grandes alterações nas fases iniciais da esteatose hepática

As funções metabólicas do fígado são muito bem descritas, porém o fígado é também um órgão imune e cada vez mais evidências têm reforçado este conceito. Sendo assim, sabe-se que o fígado abriga uma vasta população de células imunes e que estas exercem papéis fundamentais para a manutenção da homeostase do organismo (JENNE; KUBES, 2013). Levando em consideração essa diversidade de populações imunes que habitam o fígado, verificamos se o acúmulo de gordura hepático causado por curtos períodos de ingestão de dieta *high fat* é capaz de modificar a dinâmica dessas populações. Para tal, realizamos uma imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo onde caracterizamos as populações linfóides (linfócitos T totais, linfócitos B totais, células NKT e células NK) e mielóides (células dendríticas (DCs), células de Kupffer (Kcs) e neutrófilos) hepáticas. Foi possível observar que após duas semanas de consumo ocorre um aumento expressivo no número de células T com concomitante redução de células dendríticas. A elevação de células T é revertida a níveis semelhantes ao controle quando a ingestão de HF é continuada (4, 6 e 9 semanas). Já as DCs retornam a normalidade na 4^a semana de consumo porém quando mantido o desafio dietético (6 e 9 semanas) elas apresentam-se novamente reduzidas. Além das células dendríticas, os animais expostos ao consumo de HF por um período prolongado (6 e 9 semanas) apresentam uma drástica redução das células de kupffer que é acompanhada de uma diminuição nas células NKT. No tempo mais tardio (HF 9 semanas) ainda é possível notar um expressivo aumento na população de neutrófilos (Figura 4 A-H).

Para confirmar os resultados encontrados na citometria de fluxo, que nos mostra uma alteração na dinâmica das populações imunes durante curtos períodos de consumo de dieta *high fat*, e verificar se tais mudanças são também encontradas *in vivo* realizamos uma microscopia confocal intravital. Para visualizar simultaneamente sinusoides e neutrófilos os animais foram injetados

com anti-CD31 (em vermelho) e anti-Ly6G (em branco). Ao quantificarmos as imagens encontramos um infiltrado de neutrófilos após 9 semanas de HF, assim como observamos pela citometria de fluxo (Figura 5). As células de kupffer foram marcadas com anti-F4/80 (em verde) e a quantificação confirmou, mais uma vez, o resultado apresentado anteriormente onde vimos uma drástica redução da população de Kcs nos tempos tardios de 6 e 9 semanas de consumo de *high fat* (Figura 6 A-B). Para melhor visualizar a localização dessa população as imagens foram reconstruídas em 3D e através delas confirmamos que estas células (KCs) apresentam localização intravascular, e identificamos que as células de kupffer não se alteram apenas em número mas também em morfologia. Para confirmarmos tal observação realizamos uma análise digital do volume individual das Kcs que nos mostrou que ocorre uma redução do volume celular a partir da 4^a semana de consumo de HF acompanhada de uma alteração morfológica com redução de tamanho, e de seus prolongamentos (Figura 6 C).

A junção desses resultados nos permitiu identificar que tempos curtos de consumo de dieta *high fat* geram uma importante alteração no ambiente imune hepático com drástica depleção de fagócitos hepáticos (KCs e DCs) e considerável infiltrado de neutrófilos.

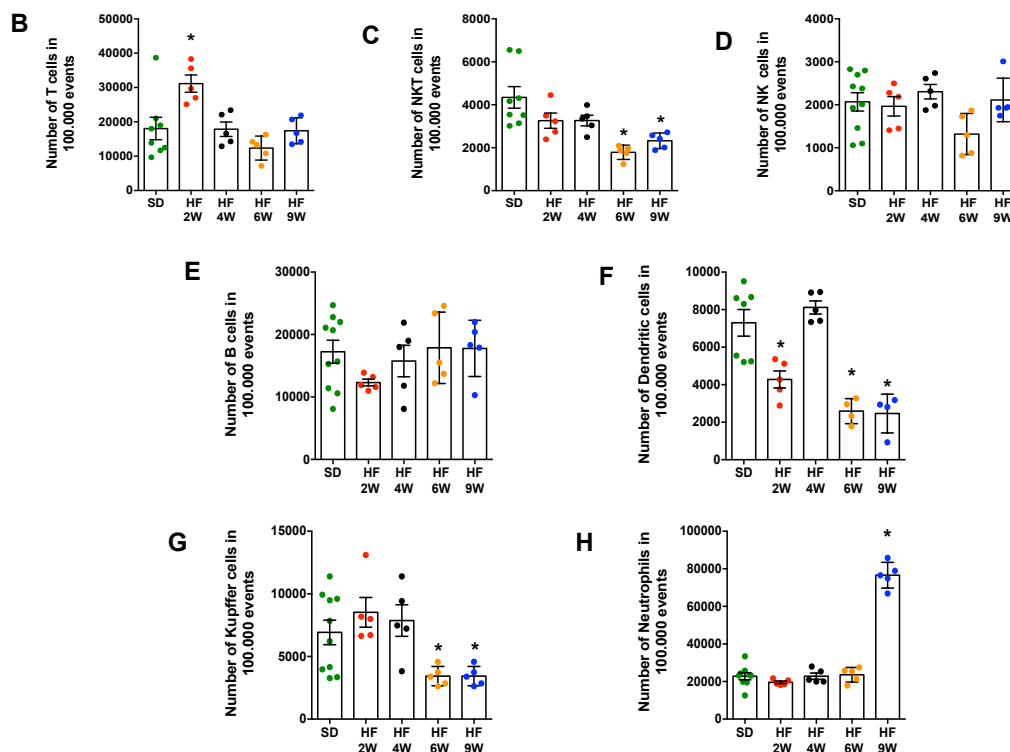
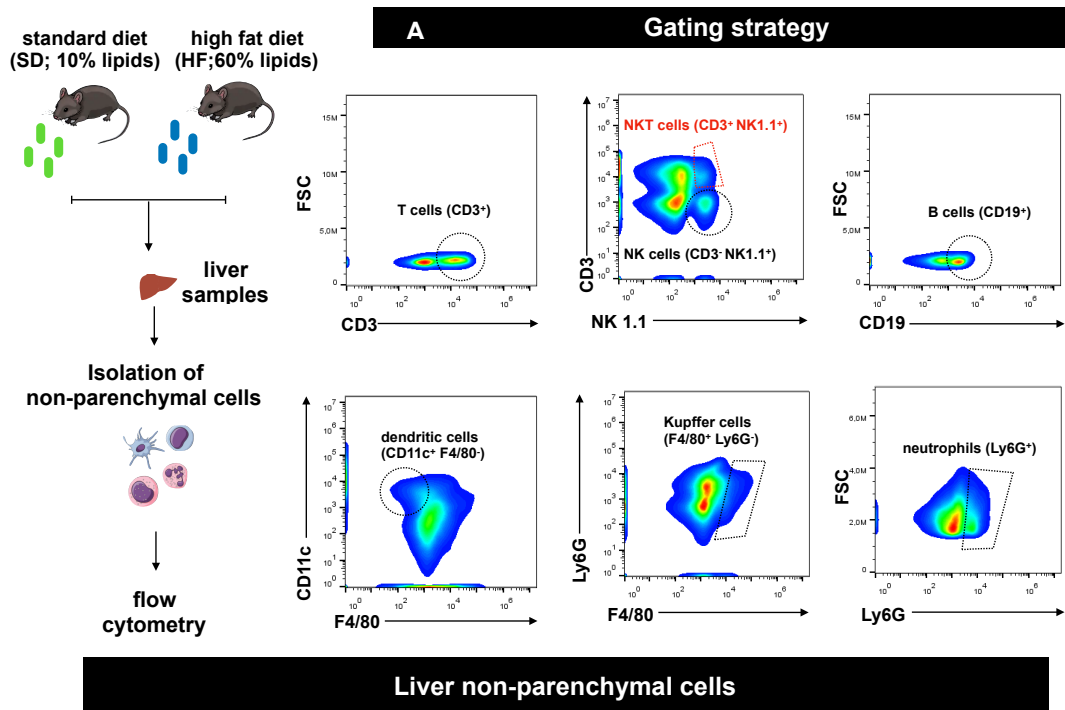


Figura 4: Imunofenotipagem por citometria de fluxo das fases iniciais da NAFLD. (A) Estratégia de gates utilizados na citometria de fluxo para imunofenotipagem das células não-parenquimais hepáticas. (B-H) Número dos diferentes leucócitos hepáticos durante o consumo de dieta high fat. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

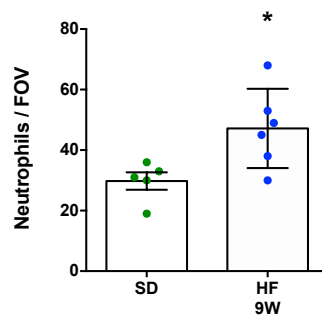
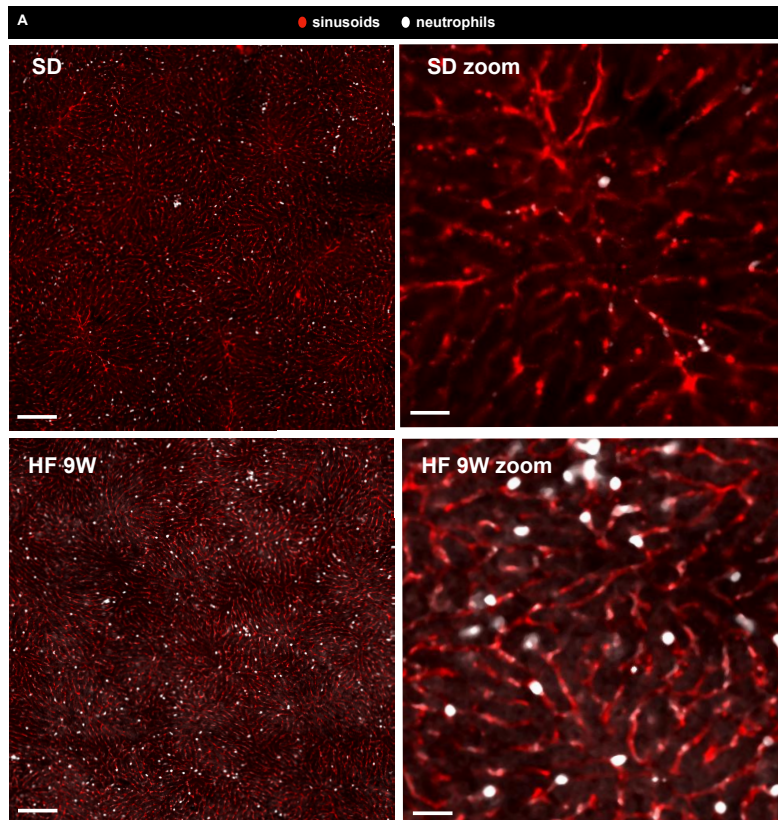
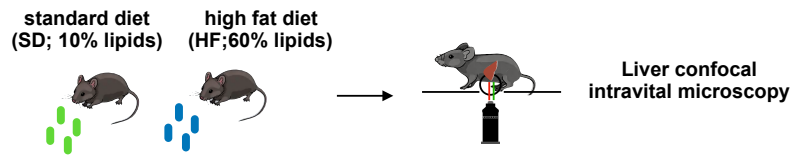


Figura 5: Visualização dos neutrófilos hepáticos *in vivo* nas fases iniciais da NAFLD. (A) Microscopia confocal intravital do fígado de camundongos mostrando acúmulo de neutrófilos (células Ly6G+; em branco) na microcirculação hepática (anti-CD31, em vermelho). Cada imagem é formada pela junção de imagens adquiridas individualmente de 24 campos distintos e unidas automaticamente pelo software. Barras = 50 μ m (zoom digital 4x na inserção).

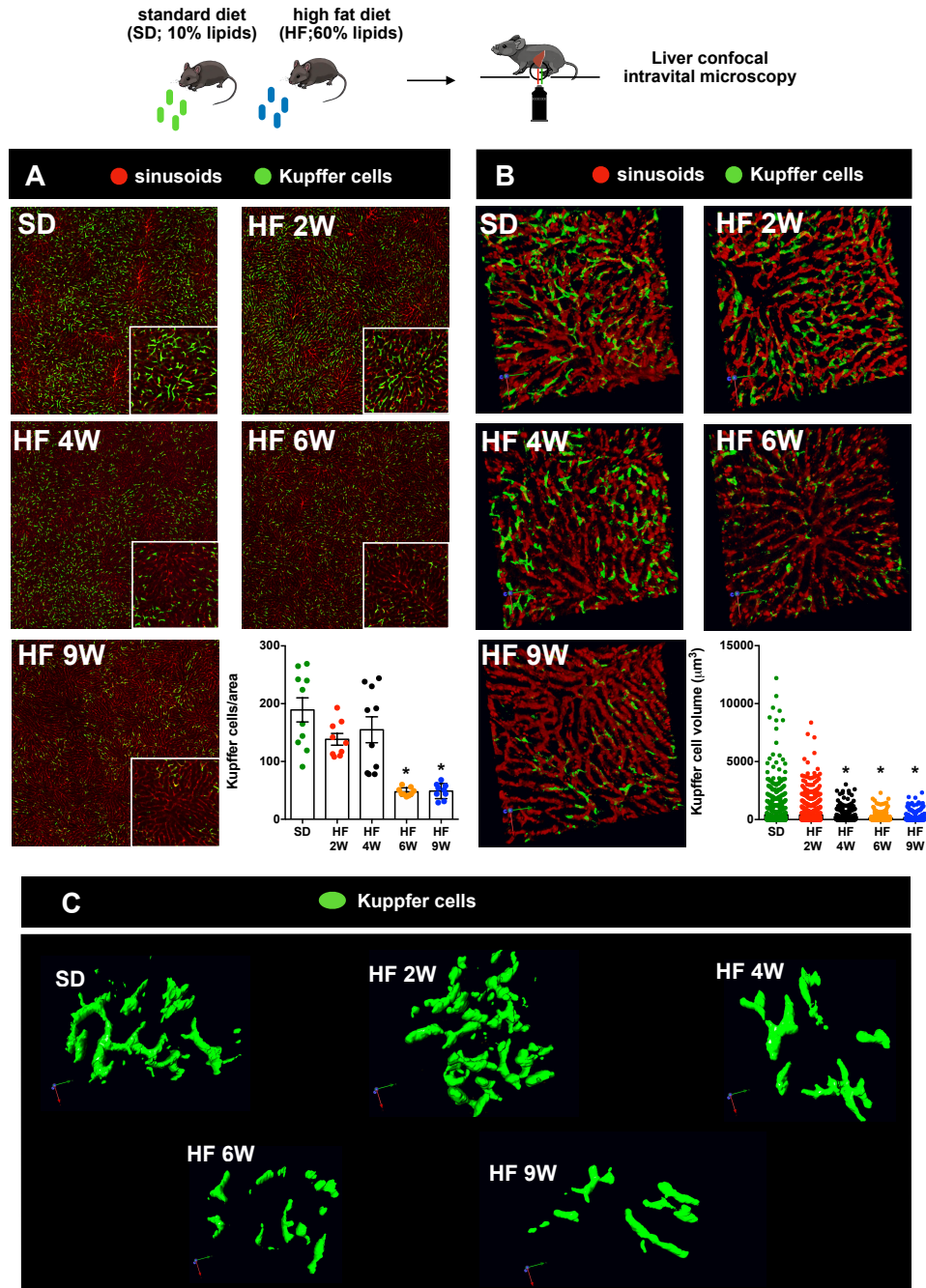


Figura 6: Visualização das células de Kupffer *in vivo* nas fases iniciais da NAFLD. (A) Microscopia confocal intravital do fígado de camundongos mostrando a depleção de células de Kupffer (anti-F4/80; em verde) após 6 e 9 semanas de consumo de high fat. Cada imagem é formada pela junção de imagens adquiridas individualmente de 6 campos distintos e unidas automaticamente pelo software. Barra = 30 μm (zoom 4x na inserção). (B) Reconstrução tridimensional de células de Kupffer (anti-F4/80; em verde) sob microscopia confocal intravital, mostrando sua localização intravascular (sinusoides - anti-CD31; em vermelho) e a redução significativa no volume das células após a ingestão de HF. (C) Reconstrução tridimensional individual das células de Kupffer (anti-F4/80; em verde) mostrando grandes alterações na morfologia celular devido ao desafio com high fat. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

4.4 Alterações nas células de Kupffer geradas pelo consumo de high fat diet predispõe a infecções

O fígado é um órgão conhecido por atuar como um filtro no organismo e por ajudar no combate a infecções impedindo que essas se tornem sistêmicas, e os macrófagos hepáticos (células de kupffer) são as principais células envolvidas neste processo (DAVID; REZENDE; ANTUNES; SANTOS *et al.*, 2016; ZENG; SUREWAARD; WONG; GEOGHEGAN *et al.*, 2016). Dentro deste contexto, e baseado nos resultados anteriores em que há redução no número de KCs e modificações em sua morfologia, hipotetizamos se essas alterações - provocadas pelo consumo de HF - poderiam causar mudanças na capacidade do fígado em combater infecções bacterianas nas fases iniciais de NAFLD. Para estudar a resposta aguda a infecção e a capacidade hepática de retirar essas bactérias da circulação sanguínea desafiamos os animais com *E. coli* após o consumo de *high fat*, e realizamos o ensaio de *clearance* bacteriano por citometria de fluxo (Figura 7 – esquema). Observamos que aqueles animais que consumiram dieta HF por duas semanas parecem ter uma maior capacidade de remover as bactérias do sangue. Porém, quando o consumo é mantido por até nove semanas esta capacidade torna-se inferior à capacidade dos animais que consomem dieta SD (Figura 7 B). Para visualizarmos *in vivo* a capacidade das células de Kupffer de capturar bactérias realizamos uma microscopia confocal intravital, onde animais que consumiram HF ou SD receberam uma injeção i.v. de *E. coli* – GFP (em verde) para realização de um vídeo de captura de bactérias por células de Kupffer (marcados com anti-F4/80, em vermelho) em tempo real. Esse ensaio nos mostrou que após duas semanas de consumo de HF o número de células de Kupffer que captura bactérias é semelhante ao do grupo controle, e após 9 semanas de consumo esse número reduz significativamente, o que justifica as quantidades de bactérias encontradas na corrente sanguínea (Figura 7 D-E). Apesar de identificar que o consumo de HF gera alterações na captura de bactérias, ao realizarmos um *tracking* digital de cada uma das *E.coli* presentes no campo não encontramos diferenças na

velocidade, distância e no trajeto percorrido pelas bactérias (Figura 7 F-H), sugerindo a existência de mecanismos alternativos atuando na captura de bactérias durante a infecção. Para identificar a capacidade hepática de matar as bactérias capturadas realizamos o ensaio de CFU, onde a carga bacteriana hepática foi avaliada 24 horas após infecção. Apesar de mantida a capacidade de captura de bactérias após duas semanas de HF, a capacidade de eliminar essas bactérias do fígado parece estar prejudicada assim como ocorre após 9 semanas de consumo, ou seja, encontramos um maior número de CFU nos animais que consumiram dieta HF em ambos os tempos (2 e 9 semanas) do que naqueles que receberam dieta SD (Figura 7 C). Vale ressaltar que no grupo que consumiu *high fat* por 9 semanas houve uma alta taxa de mortalidade, de forma que a contagem de CFU foi realizada em um único animal sobrevivente (Figura 7 A). Diante da análise conjunta desses resultados nos deparamos com dois diferentes panoramas: 1- um *priming* inicial das células de Kupffer após duas semanas de HF, que permitem uma melhor capacidade de retirar bactérias da circulação sanguínea, mas com reduzida capacidade de matar as bactérias capturadas; 2- uma drástica alteração da população de células de Kupffer em número e morfologia após 9 semanas de HF, que reflete diretamente na capacidade de capturar e eliminar bactérias, reduzindo essas funções.

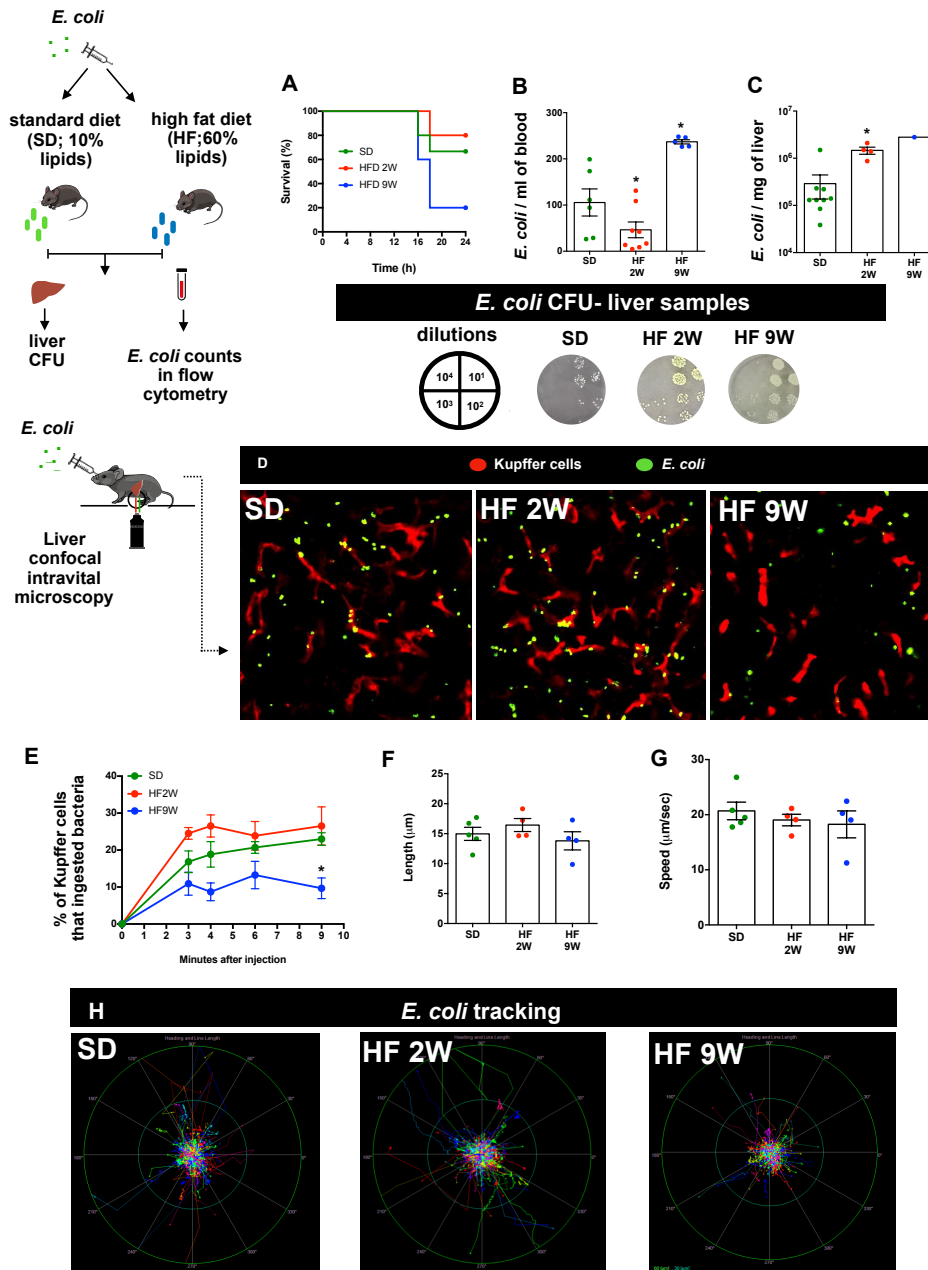


Figura 7: O consumo de dieta *high fat* por curtos períodos leva à redução da capacidade de combater infecções bacterianas. (A) Curva de sobrevivência durante o desafio com *E.coli*. (B) Número de *E. coli* na circulação de camundongos submetidos às dietas SD ou HF avaliado por citometria de fluxo. (C) Número de unidades formadoras de colônias de *E. coli* em amostras de fígado de camundongos submetidos ao protocolo SD ou HF, juntamente com imagens representativas de placas de ágar sob diferentes diluições. Observa-se que dos camundongos alimentados com HF por 9 semanas, apenas um sobreviveu após infecção bacteriana. (D) Microscopia intravital confocal do fígado mostrando células Kupffer (KC) em vermelho (anti-F4/80) e *E. coli* GFP (em verde), onde foi possível observar que a maioria das KCs no grupo SD é capaz de capturar bactérias, enquanto menos células dos animais HF 9W são positivas para GFP. (E-G) Quantificação digital da capacidade fagocítica das células de Kupffer. (G) Rastreamento digital do deslocamento (comprimento) e velocidade de *E. coli* nos sinusoides hepáticos avaliados por microscopia intravital confocal. *p < 0,05 comparado ao grupo SD.

4.5 Alterações gênicas causadas pelas fases iniciais de NAFLD são diferentes nos compartimentos imune e metabólico hepático

Sabendo que o fígado é composto por dois importantes compartimentos – imune e metabólico – e que ambos podem ser afetados pelo consumo excessivo de gordura, nos propusemos a investigar a resposta gênica de cada um desses compartimentos após curtos períodos de ingestão de dieta rica em gordura. Realizamos então o isolamento de células não-parenquimais hepáticas (LNPCs) e de hepatócitos (as células funcionais do parênquima hepático), tornando possível avaliar a expressão gênica de cada um dos compartimentos separadamente (Figura 8). Ao avaliarmos a expressão gênica em LNPCs (Figura 8 A) identificamos que animais que consumiram HF por 2 semanas apresentam supressão na maioria dos genes, incluindo genes inflamatórios e ainda aqueles ligados ao reconhecimento e fagocitose de patógenos, sendo os principais *Tnf*, *Il10*, *Il1b*, *Cxcl2*, *Marco* e *Nr1h3*, sendo que os demais genes avaliados não exibiram grandes alterações neste tempo de ingestão de HF. Porém a partir da 4ª semana de dieta *high fat* a maioria dos genes estudados tiveram um aumento progressivo em sua expressão. De maneira interessante, os genes ligados a fagocitose e reconhecimento de patógenos alcançam sua maior expressão no tempo mais tardio de *high fat* (9 semanas). Dessa forma, foi possível observar que a expressão gênica apresenta uma alteração dinâmica no compartimento imune, sendo diretamente influenciada pelo tempo de consumo de HF uma vez que mostra-se diferente em cada um dos tempos estudados. Sendo a população de células de Kupffer a que apresentou as maiores alterações em frequência, morfologia e funcionalidade, resolvemos então isolar essas células de animais alimentados com *high fat* e SD nos momentos onde as células não-parenquimais exibiram mudanças mais expressivas na expressão gênica (2 e 9 semanas), na tentativa de verificar se seriam as KCs as responsáveis por tais modificações gênicas (Figura 9). Através dessas análises identificamos que o consumo de *high fat* por duas semanas induz um aumento da expressão da maioria dos genes avaliados, tanto inflamatórios quanto ligados a fagocitose nas células de

Kupffer, sendo este aumento ainda mais expressivo após 9 semanas de HF. Em conjunto, esses dados sugerem que a perda do perfil tolerogênico das células não-parenquimais, especialmente das células de Kupffer, é uma das consequências do consumo de *high fat* por curtos períodos de tempo.

Para conhecermos a resposta do compartimento metabólico hepático ao consumo de *high fat* avaliamos o perfil gênico dos hepatócitos isolados (Figura 8 B). Foram selecionados genes ligados ao metabolismo de xenobióticos, especialmente da via do citocromo P450, e genes inflamatórios. Encontramos reduções pontuais na síntese de albumina (*Alb*) e de glutathione transferase P1 (*Gsp1*) e na expressão de *Il1b*, e os demais genes e vias analisadas não apresentaram alterações significativas em todos os tempos estudados. Porém, após 9 semanas de HF identificamos um aumento na expressão média de quase todos os genes analisados, o que pode indicar que este tempo de consumo representa um momento de transição entre a ingestão em curto e longo prazo de dieta *high fat*.

Esses resultados indicam que o consumo de dieta *high fat* por curtos períodos de tempo altera minimamente o compartimento metabólico hepático e que o compartimento imune sofre as maiores mudanças, sugerindo que a resposta imune hepática pode ser alterada nas fases iniciais da NAFLD.

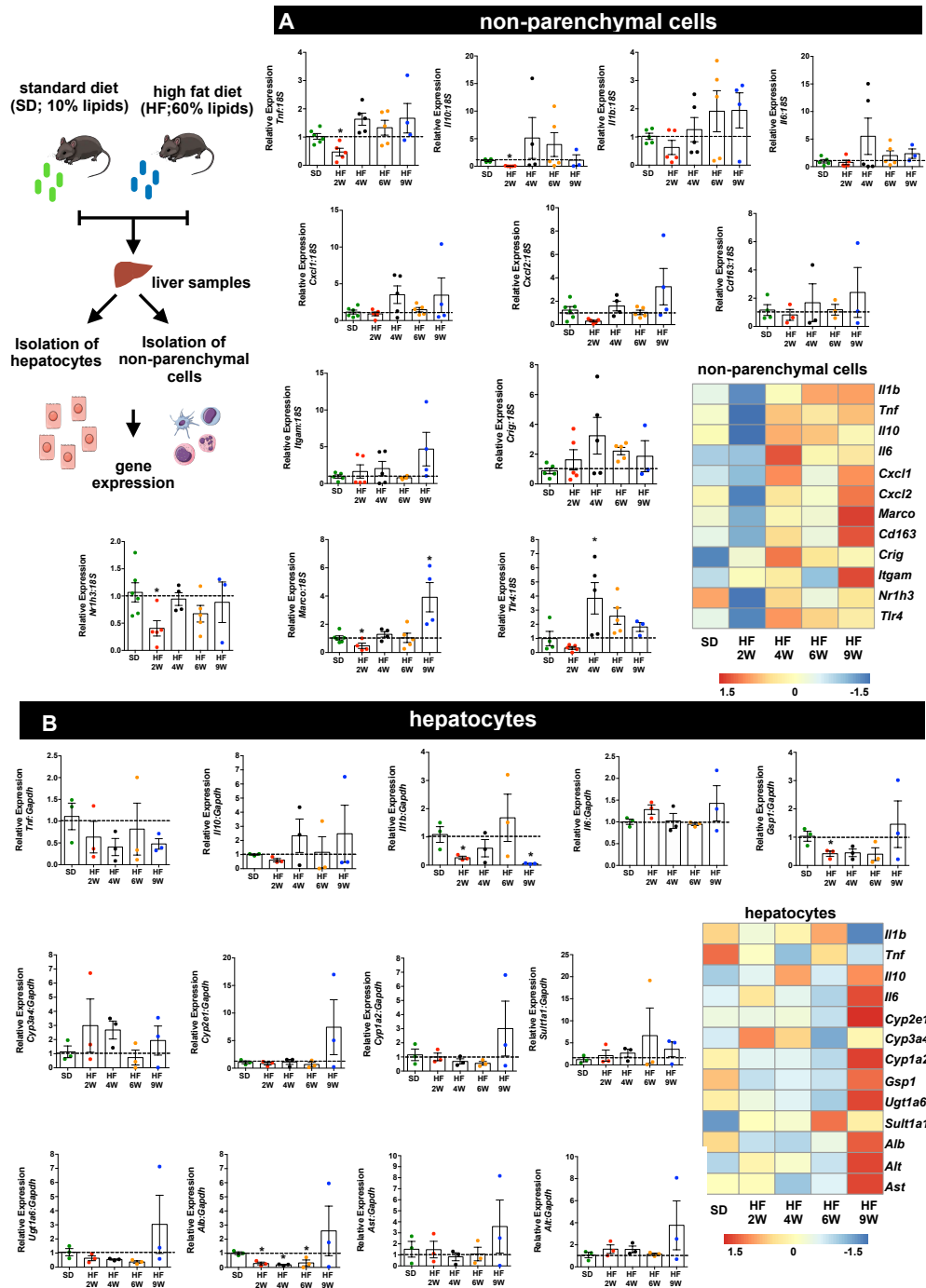


Figura 8: Expressão gênica de diferentes vias imunológicas e metabólicas em células não-parenquimais do fígado e hepatócitos. Os camundongos foram alimentados com SD ou HF (2 a 9 semanas). As células não-parenquimais do fígado (A) e os hepatócitos (B) foram purificados e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados no grupo SD. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

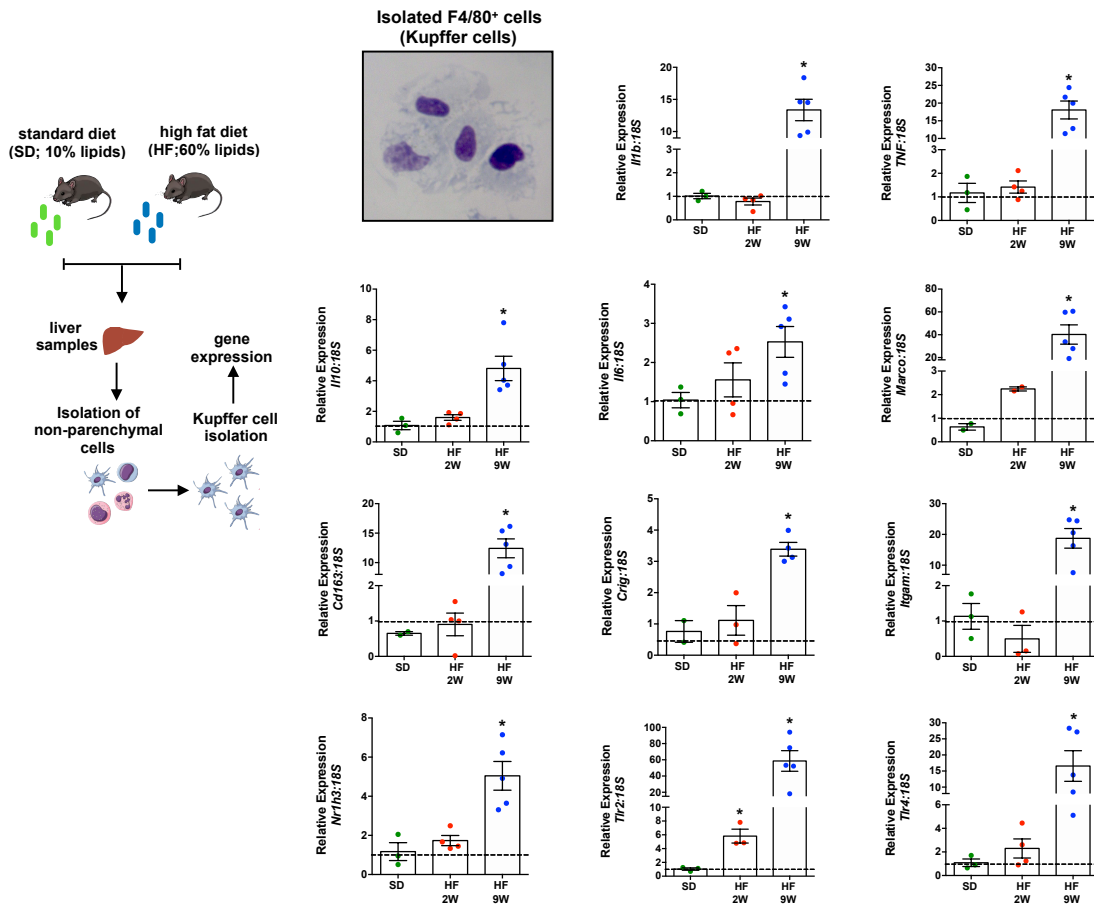


Figura 9: Expressão gênica de diferentes vias do sistema imunológico em células Kupffer. As células de Kupffer foram isoladas de camundongos alimentados com SD ou HF por 2 e 9 semanas. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados no grupo SD. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

4.6 O consumo de dieta *high fat* por curtos períodos agrava a lesão hepática aguda induzida por droga, levando a um aumento nas taxas de mortalidade

Os dados apresentados até o momento sugerem que as fases iniciais da NAFLD cursam com grandes alterações no meio imune hepático e com menores mudanças no compartimento metabólico. Para entender se tais modificações são capazes de alterar a resposta do fígado a um insulto agudo, geramos um modelo de lesão hepática aguda por sobredose de paracetamol (APAP) (400 mg/kg). Verificamos que em animais que consomem dieta controle esta dose de APAP é capaz de causar extensas áreas de lesão hepática com concomitante aumento dos níveis séricos de ALT (Figura 10 A e C). Apesar de intenso dano tecidual todos os animais sobrevivem até 24 horas após receberem a droga. Porém, ao desafiarmos os animais que consumiram dieta *high fat* por 2 semanas, encontramos um taxa de mortalidade de 10%, e nos tempos mais tardios (6 e 9 semanas) esses níveis se tornam ainda mais drásticos atingindo 100% de mortalidade após 16 horas do desafio com APAP (Figura 10 B). Sendo assim, optamos por avaliar os impactos da lesão aguda causada por paracetamol 12 horas após o desafio com APAP. Vale ressaltar que os níveis séricos de ALT dos animais em dieta HF são mais baixos que do grupo SD, sendo contrários à histopatologia e ao pior prognóstico encontrado, indicando que a dosagem de ALT não é o melhor método para avaliar o grau de lesão hepática neste caso. Para avaliarmos a capacidade funcional do fígado desses animais utilizamos o teste de verde de indocianina, que nos mostrou uma capacidade de *clearance* reduzido após a intoxicação por paracetamol, que foi ainda menor quando associado os estágios iniciais de NAFLD, indicando que a associação entre NAFLD e sobredose medicamentosa gera uma maior disfunção hepática (Figura 10 D). Apesar do pior prognóstico e da grave disfunção hepática, as populações imunes não apresentaram grandes alterações entre os animais que consumiram dieta HF e SD que foram submetidos ao desafio com APAP, com apenas um aumento pontual dos

linfócitos B após 6 semanas de consumo de *high fat* (Figura 10 E). Mesmo não encontrando alterações detectáveis no número das populações imune hepáticas, avaliamos se o perfil inflamatório das células não-parenquimais hepáticas é alterado quando associamos dieta HF com overdose de paracetamol, e se o mesmo aconteceria também com os hepatócitos. Para tal isolamos as LNPs e os hepatócitos de animais alimentados com dieta controle e *high fat*, desafiados ou não com APAP, e analisamos a expressão de diversos genes em cada um dos tipos celulares (Figura 11). Em células não-parenquimais encontramos um aumento da expressão de diversos genes tanto inflamatórios (*Il6*, *Tnf* e *Cxcl1*) quanto aqueles relacionados ao reconhecimento de patógenos e ativação celular (*Itgam*, *Marco*, *Nr1h3* e *Crig*), especialmente no tempo de 9 semanas (Figura 11 A). Em hepatócitos, apesar da reduzida expressão de *Cyp3a4* e *Sult1a1* (ambos envolvidos no metabolismo de xenobióticos), os demais genes não apresentaram alterações significativas (Figuras 11 B), indicando que no contexto das fases iniciais de NAFLD associadas à sobredose de paracetamol as alterações gênicas se restringem ao compartimento imune hepático.

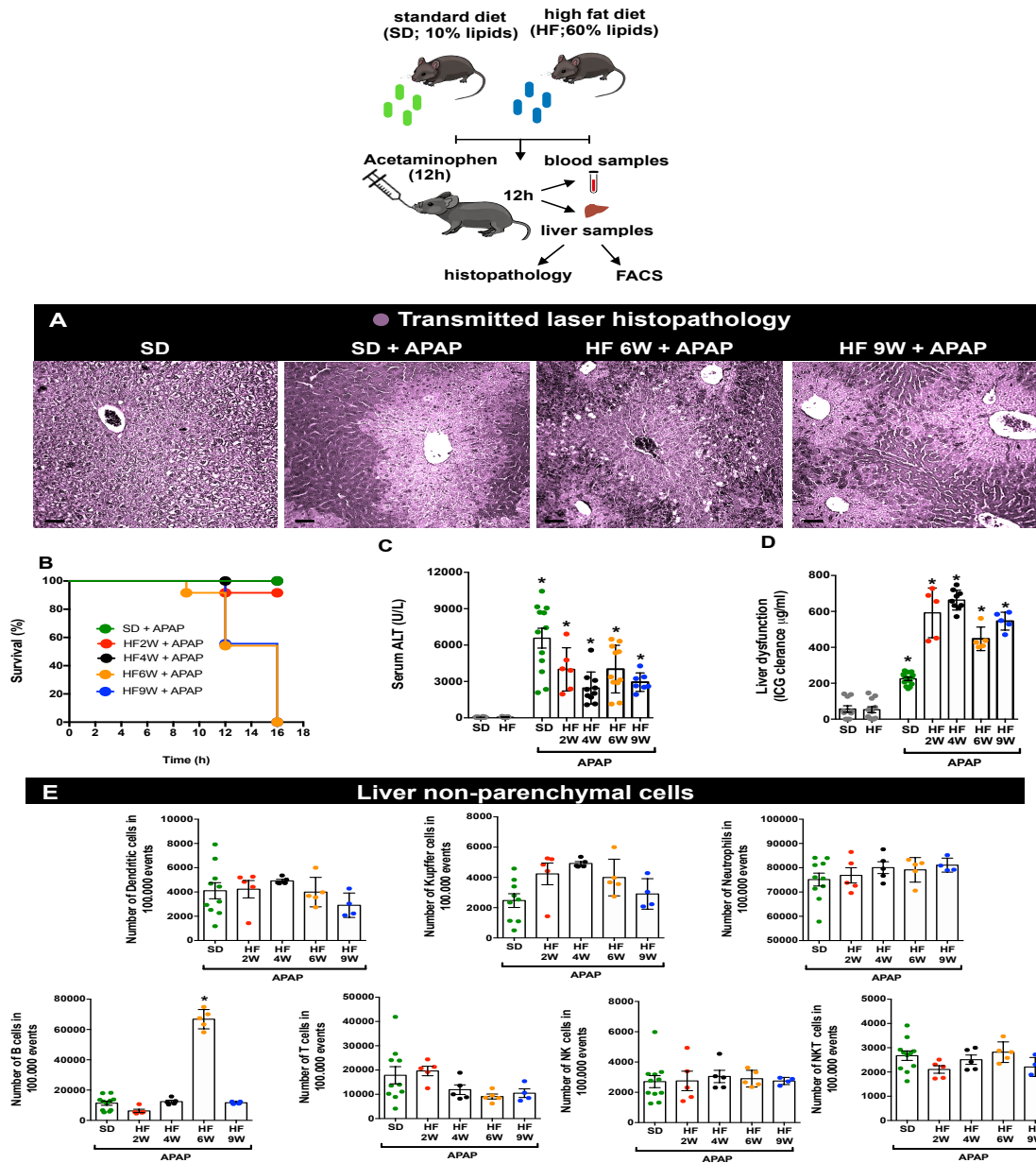


Figura 10: Hiper-responsividade à sobredose de paracetamol (APAP) exibida por camundongos alimentados com dieta *high fat* por curtos períodos. (A) Histopatologia hepática (adquirida usando luz transmitida em microscópio confocal) de camundongos desafiados com APAP, que foram previamente alimentados com SD ou HF (6 e 9 semanas). As amostras foram coletadas 12h após gavagem com APAP. Barra = 50 μm . (B) Curva de sobrevivência de camundongos submetidos a dieta SD e HF e desafiados com APAP. (C) Níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) nos diferentes grupos. (D) Avaliação in vivo da função hepática avaliada pela capacidade hepática de remover da circulação o corante verde de indocianina. (E) Imunofenotipagem de células não-parenquimais hepáticas por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SD.

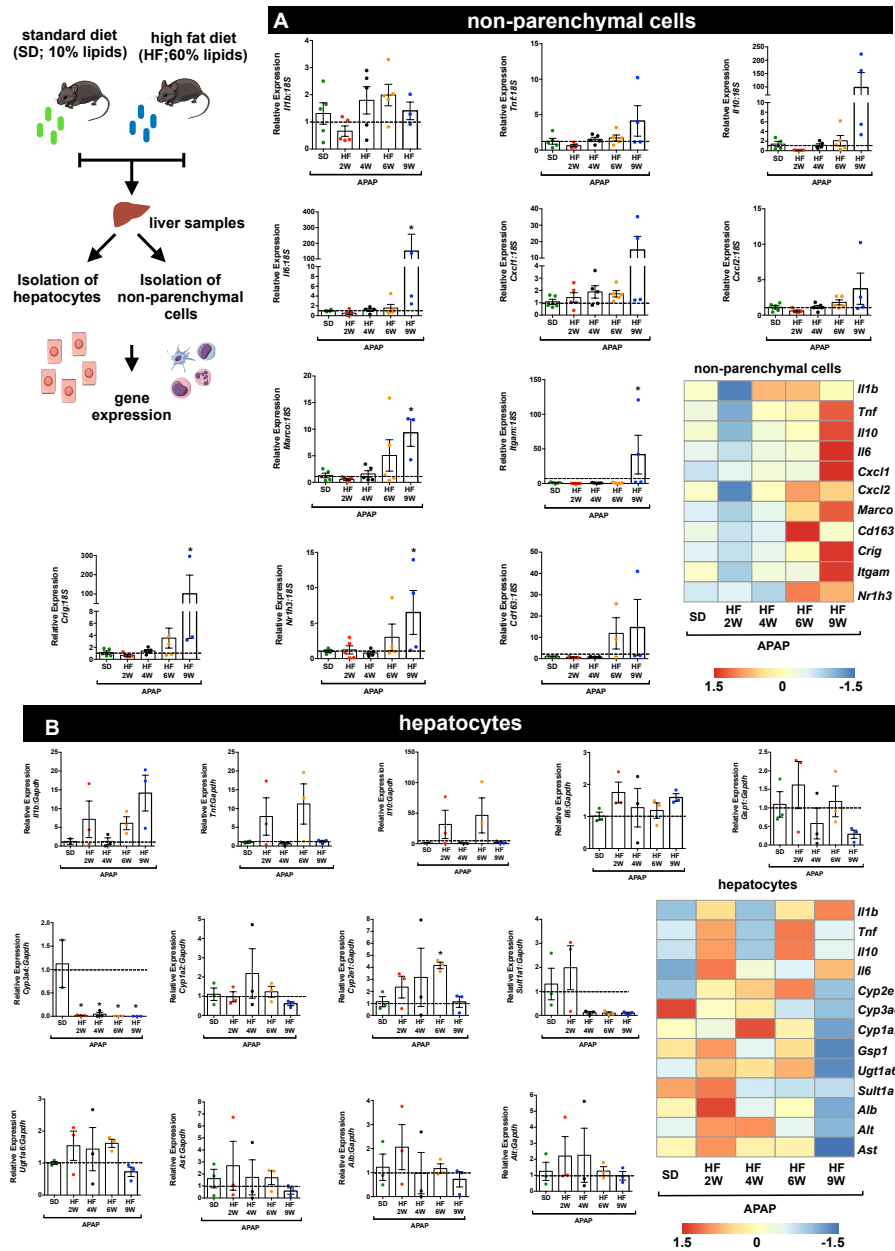


Figura 11: Expressão gênica de diferentes vias imunológicas e metabólicas em células não-parenquimais do fígado e hepatócitos em camundongos desafiados com paracetamol (APAP). Os camundongos foram alimentados com SD ou HF (2-9 semanas) e desafiados com APAP. As células não parenquimais do fígado (A) e os hepatócitos (B) foram isolados após 12h de gavagem de APAP. As células foram purificadas e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados no grupo SD. *p < 0,05 comparado ao grupo SD.

4.7 Sinalização via Toll-like Receptor 4 (TLR4) é essencial para tolerância das células de Kupffer nas fases iniciais da NAFLD

Evidências presentes na literatura indicam que a constante exposição a baixos níveis de endotoxina derivada do intestino pode ser um fator importante para o desenvolvimento e progressão da NAFLD, levando ao estabelecimento de uma resposta inflamatória hepática via TLR4 (MENCIN; KLUWE; SCHWABE, 2009; SCHWABE; SEKI; BRENNER, 2006), sendo que níveis elevados de endotoxina parecem ser de fato um fator agravante das doenças hepáticas. No entanto, o sistema imune inato é capaz de desencadear uma tolerância imunológica que pode ser vista como um mecanismo anti-inflamatório capaz de minimizar o dano tecidual durante infecções. Além disso, polimorfismos do TLR4 em humanos parecem ser capazes de aumentar as complicações durante doenças metabólicas (BALISTRERI; BONFIGLI; BOEMI; OLIVIERI *et al.*, 2014). De acordo com os dados apresentados no presente trabalho, a expressão de TLR4 mostrou-se elevada tanto em humanos quanto em camundongos nas fases iniciais de NAFLD, sugerindo que a via de TLR4 pode atuar tanto aumentando a resposta inflamatória, e conseqüentemente levando a um pior prognóstico da doença gordurosa do fígado, quanto limitando o dano tecidual causado pelo consumo de dieta *high fat*. Além disso, ao avaliarmos a expressão de TLR4 em camundongos nos diferentes compartimentos hepáticos, observamos uma maior expressão nas células de Kupffer quando comparado a hepatócitos isolados (Figura 12 A), o que nos levou a avaliar mais detalhadamente as células de Kupffer. Para investigarmos esse duplo papel da sinalização de TLR4 durante fase iniciais de esteatose hepática, inicialmente alimentamos camundongos *wild type* e *knockout* para o receptor TLR4 (TLR4^{-/-}) com dieta SD ou HF por curtos períodos. Após esse tempo, avaliamos a resposta desses animais à exposição às diferentes dietas, além de avaliarmos a expressão de diversos genes inflamatórios nas células de Kupffer. Diferentemente do que encontramos em animais *wild type*, os camundongos TLR4^{-/-} apresentaram ganho de peso após consumirem dieta *high fat* já em

tempos iniciais (2 semanas) e quando mantida a ingestão até tempos mais tardios (9 semanas) esse aumento de peso corporal foi próximo a 50% quando comparado aos animais que consumiram dieta SD (Figura 12 B). A análise de expressão gênica em células de Kupffer revelou que a deleção do receptor TLR4 é capaz de alterar todos os genes avaliados, incluindo *Il1b*, *Il6*, *Tnf* e *Il10*, independente da dieta ofertada (SD ou HF) (Figura 12 C). Ao compararmos os efeitos da ingestão de SD e HF em camundongos TLR4 *knockout* encontramos grandes mudanças na expressão de vários genes inflamatórios, sugerindo que a ausência de TLR4 alterou a resposta hepática à dieta, impactando diretamente no ganho de peso corporal e na expressão gênica em KCs (Figura 12 D).

Para dissociar a contribuição específica da ausência da sinalização de TLR4 nos diferentes compartimentos hepático, irradiamos camundongos WT ou TLR4^{-/-} com uma dose letal de raios gama e então transferimos precursores hematopoiéticos de medula óssea de animais WT e TLR4^{-/-}. Após um período de recuperação para repovoamento celular (8 semanas) camundongos que receberam células de medula óssea foram então alimentados com dieta HF ou SD por 2 semanas e em seguida desafiados com APAP para que pudéssemos avaliar a resposta hepática ao insulto agudo e dietético (Figura 13). Foi demonstrado previamente que neste protocolo de irradiação seguido de transferência de células de medula óssea, após o período de recuperação quase 100% das células imunes hepáticas do receptor são derivadas do doador (DAVID; REZENDE; ANTUNES; SANTOS *et al.*, 2016). Levando isso em consideração, e analisando os resultados obtidos, observamos que as amostras de fígado total dos animais que possuíam ausência de TLR4^{-/-} nas células imunes (TLR4^{-/-} > WT) e em hepatócitos (WT > TLR4^{-/-}) tiveram um aumento expressivo das quimiocinas relacionadas a neutrófilos CXCL1 e CXCL2 após associarmos HF e APAP (Figura 13). As outras vias inflamatórias analisadas não foram alteradas na ausência de TLR4, sugerindo que a produção de quimiocinas - por macrófagos ou hepatócitos - pode ser fortemente regulada pela sinalização de TLR4 durante a inflamação hepática, o que pode explicar o intenso infiltrado de neutrófilos nas fases mais tardias da NAFLD. Dessa forma, podemos sugerir

que a sinalização de TLR4 pode levar a uma tolerância na resposta imune e também a um controle metabólico nas fases iniciais da NAFLD, uma vez que a ausência de TLR4 promoveu alterações na dinâmica de ganho de peso e elevou a expressão de diferentes genes inflamatórios.

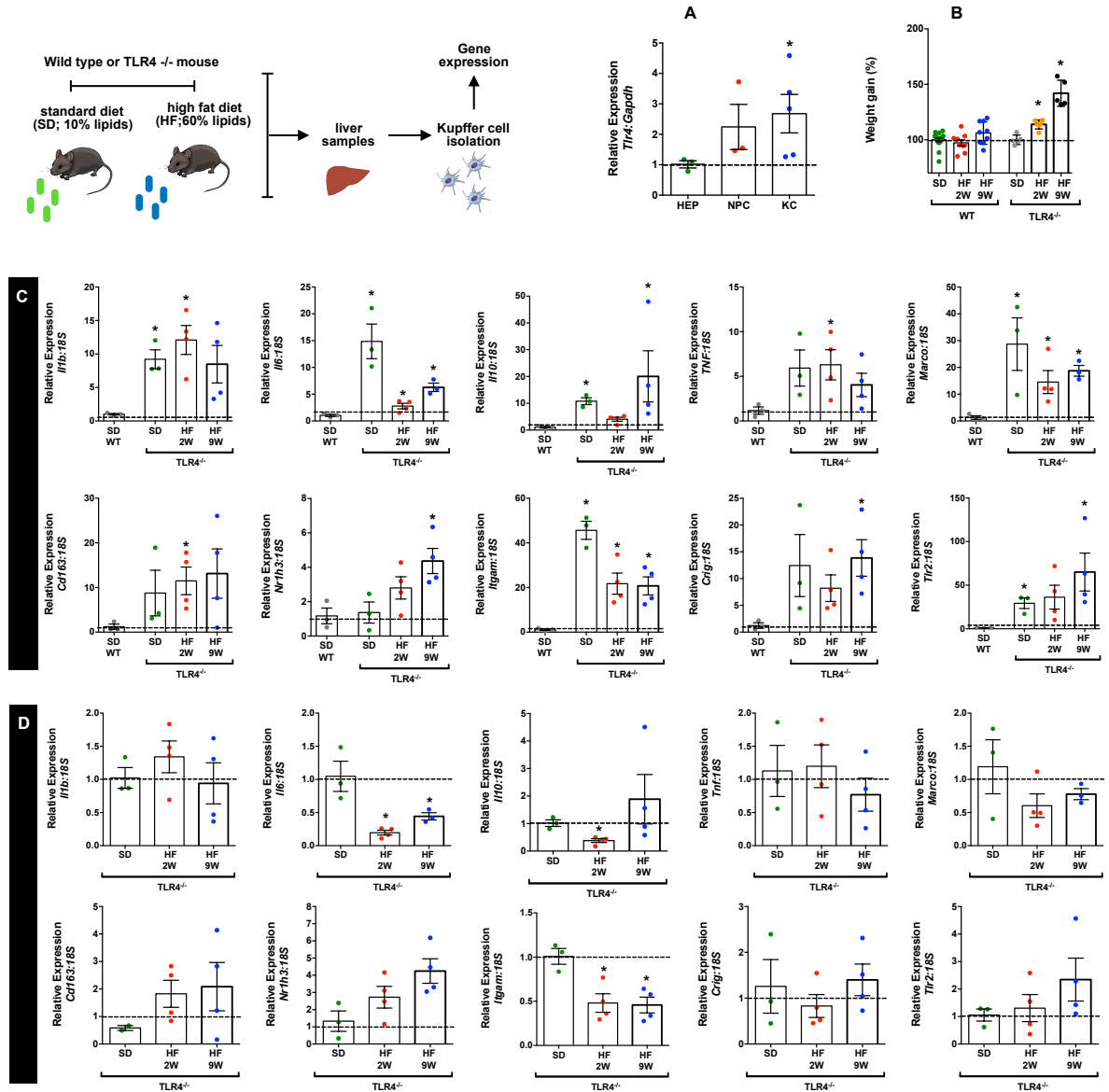


Figura 12: Efeitos da sinalização do receptor *Toll-like 4* (TLR4) nos momentos iniciais da patogênese da NAFLD. (A) Expressão de TLR4 nos diferentes compartimentos hepáticos. (B) Dinâmica de ganho de peso de camundongos *knockout* para TLR4 e animais WT após o desafio HF. (C-D) Expressão gênica de diferentes vias do sistema imunológico em células Kupffer isoladas. Os camundongos foram alimentados com SD ou HF (2 e 9 semanas). As células foram purificadas e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados nos camundongos WT alimentados com dieta SD (C). (D) Foi utilizado o mesmo protocolo que em (B), mas a normalização das amostras foi feita pelos valores encontrados nos camundongos TLR4^{-/-} alimentados com SD.

Bone-marrow chimeras

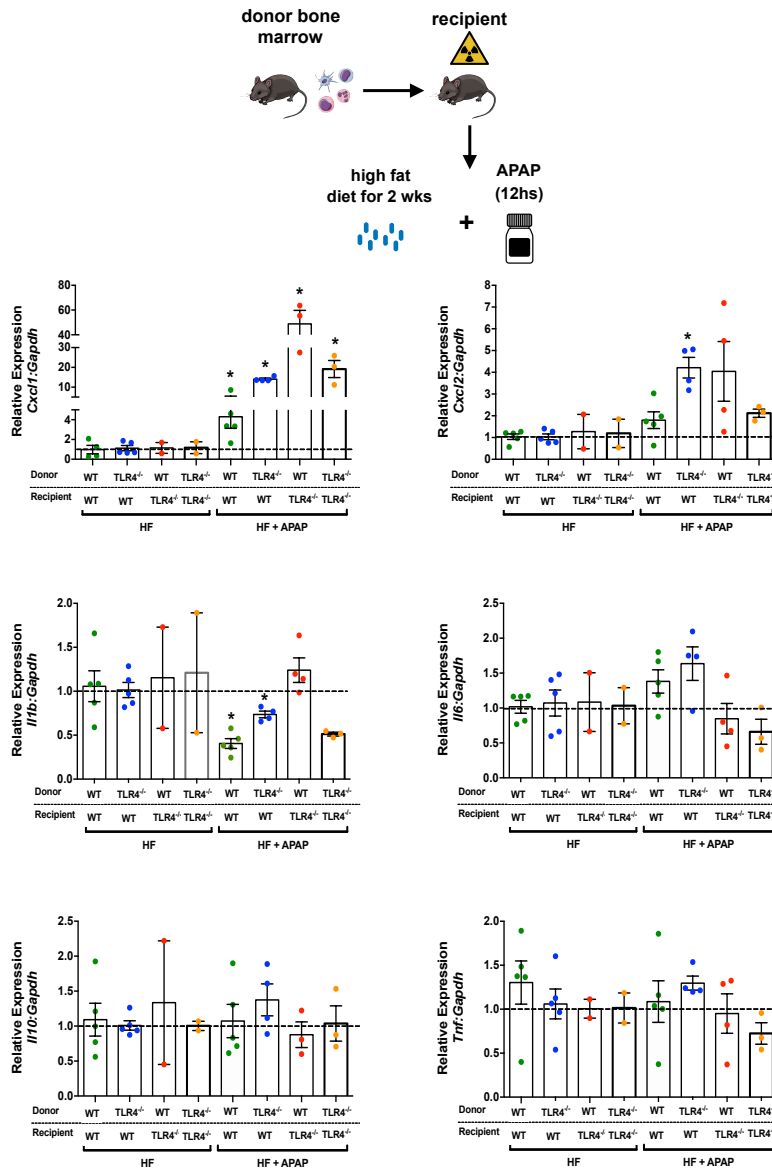


Figura 13: Efeitos da sinalização do receptor *Toll-like* 4 (TLR4) nos diferentes compartimentos hepáticos em momentos iniciais da NAFLD após desafio com paracetamol (APAP). Expressão gênica de diferentes vias do sistema imunológico em amostras de fígado coletadas de quimeras da medula óssea. Camundongos do tipo *wild-type* (WT) ou *knockout* para *Toll-like* receptor 4 (TLR4^{-/-}) foram irradiados com raios gama e receberam precursores hematopoiéticos da medula óssea de camundongos WT ou TLR4^{-/-} (WT>WT; WT>TLR4^{-/-}; TLR4^{-/-}>TLR4^{-/-}; TLR4^{-/-}>WT). Após o período de recuperação (8 semanas após a irradiação), os camundongos foram alimentados com SD ou HF (2 semanas) e desafiados com APAP. As amostras foram coletadas após 12h de gavagem de APAP. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. O *fold increase* de cada amostra foi calculado utilizando o $\Delta\Delta Ct$ e normalizado pelos valores encontrados nos respectivos quimeras que consumiram HF por 2 semanas e não foram desafiados com APAP. *p < 0,05 comparado aos respectivos quimeras.

5. DISCUSSÃO

Utilizando abordagens inovadoras de imagens *in vivo* de alta definição, combinadas a técnicas já extremamente bem estabelecidas e à expressão gênica em diferentes compartimentos hepáticos, demonstramos que a resposta imune hepática é prematuramente alterada nas fases iniciais do desenvolvimento de NAFLD. Isso sugere que, mesmo nos casos em que apenas a esteatose é observada, a resposta imune hepática já pode ter sido ativada, diferentemente do conceito atual de que a inflamação hepática é um processo que ocorre geralmente nos estágios finais da NAFLD e que as fases iniciais caracterizam-se apenas pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos (NASSIR; RECTOR; HAMMOUD; IBDAH, 2015; YEH; BRUNT, 2014). Os dados obtidos tanto em humanos quanto camundongos apresentaram alterações significativas na expressão de diferentes genes relacionados à inflamação nos primeiros momentos da NAFLD, período em que uma grande porcentagem de indivíduos pode ser assintomática ou não apresentar alterações nos exames rotineiramente utilizados na prática clínica para diagnóstico de doença hepática. Em camundongos, mesmo antes de qualquer alteração significativa de peso ou metabólica, a ingestão de dieta *high fat* levou a uma resposta inflamatória aumentada ao insulto induzido por drogas, além de uma relativa incapacidade de combater infecções bacterianas. Nossos resultados mostram ainda que o sistema imunológico hepático parece ser o principal e o mais precoce compartimento hepático a sentir as alterações causadas pelo aumento do conteúdo lipídico do fígado e, apesar da supressão inicial da resposta imune, quando a exposição à dieta *high fat* foi mantida pelo período mais longo aqui estudado (9 semanas), os camundongos evoluíram com um aumento na expressão de quase todos os genes relacionados à inflamação avaliados. Sendo assim, conseguimos identificar que mesmo antes de manifestações clínicas claras, os indivíduos com NAFLD podem apresentar uma resposta imune hepática inadequada, podendo explicar tanto as chances aumentadas de insuficiência hepática grave no caso de insultos agudos, como também uma capacidade reduzida de retirar bactérias do sangue em um quadro infeccioso.

Isso pode explicar, em parte, por que uma maior porcentagem de pacientes com doenças hepáticas evolui para sepse e choque séptico (NESSELER; LAUNEY; ANINAT; WHITE *et al.*, 2016; YAN; LI, 2014), destacando o papel essencial do sistema imunológico do fígado na defesa sistêmica (JENNE; KUBES, 2013; KUBES; JENNE, 2018).

O fígado tem um dos ambientes imunológicos mais complexos do corpo, abrigando diversas subpopulações de leucócitos mesmo sob homeostase (KUBES; MEHAL, 2012). No entanto, essas populações podem alterar rapidamente sua frequência e fenótipo mediante insultos, como por exemplo após uma lesão hepática induzida por droga, em que ocorre um acúmulo de neutrófilos no fígado (MARQUES; AMARAL; PIRES; NOGUEIRA *et al.*, 2012), além de uma depleção de células de Kupffer (DAVID; REZENDE; ANTUNES; SANTOS *et al.*, 2016; NAKAGAKI; MAFRA; DE CARVALHO; LOPES *et al.*, 2018). De acordo com a literatura, as células imunes hepáticas desempenham diversas funções na progressão da NAFLD e nas doenças crônicas. Neste contexto as células dendríticas são apontadas como imunorreguladoras pois sua depleção exacerba a inflamação, o dano hepático e a fibrose (HENNING; GRAFFEO; REHMAN; FALLON *et al.*, 2013; HEYMANN; TACKE, 2016; TACKE; YONEYAMA, 2013). Os macrófagos teriam um papel crítico na inflamação e na resistência a insulina, e em pacientes com fibrose estes são encontrados em números elevados. As células de Kupffer são capazes de propagar a inflamação via TNF e, segundo Zeng *et al* 2015, sua depleção atenua a inflamação hepática, porém Wan e colaboradores mostram que tais células podem ter um efeito protetor hepático na NAFLD ao expressarem IL-10 (HEYMANN; TACKE, 2016; TOMITA; TAMIYA; ANDO; OHSUMI *et al.*, 2006; WAN; BENKDANE; TEIXEIRA-CLERC; BONNAFOUS *et al.*, 2014; ZENG; LIU; ZHOU; PAN *et al.*, 2015). O papel dos neutrófilos nas doenças hepáticas crônicas ainda não é bem estabelecido, porém é comum observar um infiltrado neutrofílico nos quadros de NASH (HEYMANN; TACKE, 2016; LIANG; LINDEMAN; MENKE; KOONEN *et al.*, 2014; XU; HUANG; ZHANG; WANG, 2014). Os linfócitos T, tanto TCD4⁺ como TCD8⁺, mostram-se elevados na NASH e parecem ser ativados

promovendo inflamação e progressão da doença (HEYMANN; TACKE, 2016; WOLF; ADILI; PIOTROWITZ; ABDULLAH *et al.*, 2014). As células NKT levam ao aumento da inflamação e da fibrose hepática contribuindo para progressão da patologia, além de serem capazes de promover a esteatose via aumento da captação lipídica pelos hepatócitos (HEYMANN; TACKE, 2016; SYN; OO; PEREIRA; KARACA *et al.*, 2010; WOLF; ADILI; PIOTROWITZ; ABDULLAH *et al.*, 2014). De maneira geral, a maioria das células imune hepáticas parecem estar envolvidas na progressão e/ou desenvolvimento da NAFLD e NASH. Porém, atualmente na literatura não são encontrados trabalhos que mostrem o comportamento dessas populações hepáticas em momentos iniciais da esteatose e no consumo agudo de dieta rica em lipídeos. No presente trabalho mostramos que o meio imunológico hepático é dramaticamente alterado durante a esteatose precoce. De fato, os leucócitos hepáticos exibiram uma dinâmica complexa durante o estabelecimento da esteatose, pois encontramos uma depleção maciça de células dendríticas (CD) e de Kupffer (KC), além de distúrbios na morfofuncionalidade das KCs, com concomitante infiltrado de neutrófilos em momentos posteriores (9 semanas), que já foi anteriormente descrito como um fator-chave para aumento do dano colateral hepático em casos de insultos (ALVARENGA; MATTOS; LOPES; MARCHESI *et al.*, 2018; ANTUNES; ARAÚJO; DINIZ; PEREIRA *et al.*, 2018; HUEBENER; PRADERE; HERNANDEZ; GWAK *et al.*, 2015; MARQUES; AMARAL; PIRES; NOGUEIRA *et al.*, 2012; MARQUES; OLIVEIRA; PEREIRA; DAVID *et al.*, 2015), sugerindo que as alterações precoces nessas subpopulações podem ser uma característica na evolução da esteatose simples para a NASH. Dessa forma, nossos dados demonstraram que as modificações precoces de frequência e no fenótipo das populações imune hepáticas, causadas pelo acúmulo de gordura no fígado, podem ser consideradas um marcador do desenvolvimento de estágios iniciais de NAFLD.

Devido à sua localização estratégica entre o intestino e a circulação sistêmica, o fígado é constantemente exposto a quantidades relativamente grandes de PAMPs derivados do intestino, tanto em condições saudáveis quanto

em doenças (BALMER; SLACK; DE GOTTARDI; LAWSON *et al.*, 2014). Nesse contexto, já é bem estabelecido que, em condições patológicas, os TLRs ativam vias de sinalização inflamatórias no fígado e que estão ativamente envolvidos na fisiopatologia de um grande número de doenças hepáticas. No entanto, os TLRs desempenham um papel importante na fisiologia hepática, regulando negativamente as respostas celulares induzidas por TLR (HEYMANN; PEUSQUENS; LUDWIG-PORTUGALL; KOHLHEPP *et al.*, 2015; MENCIN; KLUWE; SCHWABE, 2009). Nossos dados tanto em humanos quanto em camundongos revelaram um comportamento bifásico nos genes relacionados à resposta imune, exibindo uma supressão inicial de vários genes, juntamente com um aumento da expressão de TLR4 durante o curso da esteatose precoce. Apesar do fato de que isso pode ser interpretado como um marcador da ativação do sistema imunológico, foi interessante observar que camundongos *knockout* para TLR4 tiveram várias alterações em resposta ao consumo de dieta *high fat*. Os camundongos TLR4^{-/-} ganharam significativamente mais peso com a dieta HF em comparação com camundongos WT e, mesmo durante o consumo de dieta SD, observamos mudanças na expressão de diferentes genes envolvidos na resposta imune. De fato, as células de Kupffer ausentes de TLR4 apresentaram um fenótipo pró-inflamatório independente do tipo de dieta ingerida. Além disso, quando substituímos as células imunes do fígado em camundongos *wild type* por progenitores hematopoiéticos *knockout* para TLR4, a resposta imune hepática aos insultos foi completamente alterada, Especialmente as quimiocinas envolvidas no recrutamento e ativação de neutrófilos no fígado, que potencialmente aumentam os danos hepatocelulares durante a inflamação, foram significativamente aumentadas em camundongos *knockout* para TLR4 apenas nas células imunes hepáticas. Isso sugere que a sinalização via TLR4 nas células imunológicas do fígado pode ter destinos opostos, dependendo da duração do insulto, atuando como vias reguladoras nas fases iniciais da esteatose e, posteriormente, como sinais pró-inflamatórios se mantida a exposição à dieta *high fat*.

6. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados podemos dizer que fomos capazes de mimetizar as fases iniciais da doença gordurosa do fígado não alcoólica em um modelo animal com consumo de dieta *high fat* por curtos períodos.

A geração desse modelo nos permite concluir que pequenas alterações no conteúdo lipídico hepático induzido pela ingestão de dieta *high fat* por curtos períodos são suficientes para modificar as populações imunes hepáticas em frequência, morfologia e expressão gênica, e que tais mudanças interferem diretamente na resposta imune hepática, desencadeando uma resposta inflamatória exacerbada frente a diferentes insultos, levando à maior suscetibilidade a infecções bacterianas e a um pior prognóstico em lesões hepáticas agudas.

Nossos dados destacam ainda que o diagnóstico de NAFLD - particularmente em pacientes em estágio inicial - pode ser significativamente melhorado por uma investigação mais profunda, focada nas mudanças imunológicas hepáticas e que tal investigação pode ser feita com amostras semelhantes às aquelas usualmente coletadas na clínica para definição de diagnóstico. Assim, é possível melhorar as orientações e intervenções nutricionais e terapêuticas personalizadas em pacientes pertencentes a diferentes estágios do espectro da NAFLD.

7. REFERÊNCIAS

ABDELMALEK, M. F. NAFLD: The clinical and economic burden of NAFLD: time to turn the tide. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 12, p. 685-686, Dec 2016.

ALVARENGA, D. M.; MATTOS, M. S.; LOPES, M. E.; MARCHESI, S. C. *et al.* Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. **Cells**, 7, n. 12, Dec 2018.

ANTUNES, M. M.; ARAÚJO, A. M.; DINIZ, A. B.; PEREIRA, R. V. S. *et al.* IL-33 signalling in liver immune cells enhances drug-induced liver injury and inflammation. **Inflamm Res**, 67, n. 1, p. 77-88, Jan 2018.

BALISTRERI, C. R.; BONFIGLI, A. R.; BOEMI, M.; OLIVIERI, F. *et al.* Evidences of +896 A/G TLR4 polymorphism as an indicative of prevalence of complications in T2DM patients. **Mediators Inflamm**, 2014, p. 973139, 2014.

BALMER, M. L.; SLACK, E.; DE GOTTARDI, A.; LAWSON, M. A. *et al.* The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. **Sci Transl Med**, 6, n. 237, p. 237ra266, May 2014.

BELLENTANI, S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Int**, 37 Suppl 1, p. 81-84, 01 2017.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **J Hepatol**, 62, n. 1 Suppl, p. S47-64, Apr 2015.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, 67, n. 1, p. 328-357, 01 2018.

COTRIM, H. P.; PARISE, E. R.; OLIVEIRA, C. P.; LEITE, N. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, 10, n. 1, p. 33-37, 2011 Jan-Mar 2011.

DAVID, B. A.; REZENDE, R. M.; ANTUNES, M. M.; SANTOS, M. M. *et al.* Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, 151, n. 6, p. 1176-1191, 12 2016.

DAVID, B. A.; RUBINO, S.; MOREIRA, T. G.; FREITAS-LOPES, M. A. *et al.* Isolation and high-dimensional phenotyping of gastrointestinal immune cells. **Immunology**, 151, n. 1, p. 56-70, 05 2017.

- FEROLLA, S. M.; FERRARI, T. C.; LIMA, M. L.; REIS, T. O. *et al.* Dietary patterns in Brazilian patients with nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. **Clinics (Sao Paulo)**, 68, n. 1, p. 11-17, 01 2013.
- FRIEDMAN, S. L.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; RINELLA, M.; SANYAL, A. J. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nat Med**, 24, n. 7, p. 908-922, 07 2018.
- HENNING, J. R.; GRAFFEO, C. S.; REHMAN, A.; FALLON, N. C. *et al.* Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Hepatology**, 58, n. 2, p. 589-602, Aug 2013.
- HEYMANN, F.; PEUSQUENS, J.; LUDWIG-PORTUGALL, I.; KOHLHEPP, M. *et al.* Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. **Hepatology**, 62, n. 1, p. 279-291, Jul 2015.
- HEYMANN, F.; TACKE, F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 2, p. 88-110, Feb 2016.
- HUEBENER, P.; PRADERE, J. P.; HERNANDEZ, C.; GWAK, G. Y. *et al.* The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. **J Clin Invest**, 125, n. 2, p. 539-550, 02 2015.
- ITAGAKI, H.; SHIMIZU, K.; MORIKAWA, S.; OGAWA, K. *et al.* Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice **Int J Clin Exp Pathol**, v.6, n. 12, p. 2683-2696.
- JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nat Immunol**, 14, n. 10, p. 996-1006, Oct 2013.
- KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 41, n. 6, p. 1313-1321, Jun 2005.
- KUBES, P.; JENNE, C. Immune Responses in the Liver. **Annu Rev Immunol**, 36, p. 247-277, 04 2018.
- KUBES, P.; MEHAL, W. Z. Sterile inflammation in the liver. **Gastroenterology**, 143, n. 5, p. 1158-1172, Nov 2012.
- LIANG, W.; LINDEMAN, J. H.; MENKE, A. L.; KOONEN, D. P. *et al.* Metabolically induced liver inflammation leads to NASH and differs from LPS- or IL-1 β -induced chronic inflammation. **Lab Invest**, 94, n. 5, p. 491-502, May 2014.

LYNCH, C. M.; KINZENBAW, D. A.; CHEN, X.; ZHAN, S. *et al.* Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced obesity. **Stroke**, 44, n. 11, p. 3195-3201, Nov 2013.

MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; NOGUEIRA, L. L. *et al.* Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, 56, n. 5, p. 1971-1982, Nov 2012.

MARQUES, P. E.; ANTUNES, M. M.; DAVID, B. A.; PEREIRA, R. V. *et al.* Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nat Protoc**, 10, n. 2, p. 258-268, Feb 2015.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A. G.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A. *et al.* Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, 61, n. 1, p. 348-360, Jan 2015.

MENCIN, A.; KLUWE, J.; SCHWABE, R. F. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. **Gut**, 58, n. 5, p. 704-720, May 2009.

MICHAUT, A.; MOREAU, C.; ROBIN, M.-A.; FROMENTY, B. Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease **Liver International**, v.34, p. 171-179, DOI: 10.1111/liv.12514.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) **Progress in Lipid Research**, v.48, p. 1-26, DOI: 10.1016/j.plipres.2008.08.001.

NAGY, C.; EINWALLNER, E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). **J Vis Exp**, n. 131, 01 2018.

NAKAGAKI, B. N.; MAFRA, K.; DE CARVALHO, É.; LOPES, M. E. *et al.* Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **J Hepatol**, 69, n. 6, p. 1294-1307, 12 2018.

NASSIR, F.; RECTOR, R. S.; HAMMOUD, G. M.; IBDAH, J. A. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, 11, n. 3, p. 167-175, Mar 2015.

NESSELER, N.; LAUNEY, Y.; ANINAT, C.; WHITE, J. *et al.* Liver Dysfunction Is Associated with Long-Term Mortality in Septic Shock. **Am J Respir Crit Care Med**, 193, n. 3, p. 335-337, Feb 2016.

SCHWABE, R. F.; SEKI, E.; BRENNER, D. A. Toll-like receptor signaling in the liver. **Gastroenterology**, 130, n. 6, p. 1886-1900, May 2006.

- SINGH, S.; ALLEN, A. M.; WANG, Z.; PROKOP, L. J. *et al.* Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 13, n. 4, p. 643-654.e641-649; quiz e639-640, Apr 2015.
- SYN, W. K.; OO, Y. H.; PEREIRA, T. A.; KARACA, G. F. *et al.* Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 51, n. 6, p. 1998-2007, Jun 2010.
- TACKE, F.; YONEYAMA, H. From NAFLD to NASH to fibrosis to HCC: role of dendritic cell populations in the liver. **Hepatology**, 58, n. 2, p. 494-496, Aug 2013.
- TESSARI, P.; CORACINA, A.; COSMA, A.; TIENGO, A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.19, p. 291 - 302, DOI: 10.1016/j.numecd.2008.12.015.
- TOMITA, K.; TAMIYA, G.; ANDO, S.; OHSUMI, K. *et al.* Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. **Gut**, 55, n. 3, p. 415-424, Mar 2006.
- TSUCHIDA, T.; LEE, Y. A.; FUJIWARA, N.; YBANEZ, M. *et al.* A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. **J Hepatol**, 69, n. 2, p. 385-395, 08 2018.
- WAN, J.; BENKDANE, M.; TEIXEIRA-CLERC, F.; BONNAFOUS, S. *et al.* M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 59, n. 1, p. 130-142, Jan 2014.
- WOLF, M. J.; ADILI, A.; PIOTROWITZ, K.; ABDULLAH, Z. *et al.* Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. **Cancer Cell**, 26, n. 4, p. 549-564, Oct 2014.
- XU, R.; HUANG, H.; ZHANG, Z.; WANG, F. S. The role of neutrophils in the development of liver diseases. **Cell Mol Immunol**, 11, n. 3, p. 224-231, May 2014.
- YAN, J.; LI, S. The role of the liver in sepsis. **Int Rev Immunol**, 33, n. 6, p. 498-510, 2014 Nov-Dec 2014.
- YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathological features of fatty liver disease. **Gastroenterology**, 147, n. 4, p. 754-764, Oct 2014.
- YOUNOSSI, Z.; ANSTEE, Q. M.; MARIETTI, M.; HARDY, T. *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 15, n. 1, p. 11-20, Jan 2018.

YOUNOSSI, Z. M.; BLISSETT, D.; BLISSETT, R.; HENRY, L. *et al.* The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. **Hepatology**, 64, n. 5, p. 1577-1586, 11 2016.

YOUNOSSI, Z. M.; STEPANOVA, M.; RAFIQ, N.; MAKHLOUF, H. *et al.* Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. **Hepatology**, 53, n. 6, p. 1874-1882, Jun 2011.

ZENG, T. S.; LIU, F. M.; ZHOU, J.; PAN, S. X. *et al.* Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice. **Endocr J**, 62, n. 7, p. 615-626, 2015.

ZENG, Z.; SUREWAARD, B. G.; WONG, C. H.; GEOGHEGAN, J. A. *et al.* CR1g Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria. **Cell Host Microbe**, 20, n. 1, p. 99-106, Jul 2016.

ANEXO 1

Tabela 1 – Composição das dietas utilizadas

Product	D12450J		D12492	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	19.2	20.0	26	20
Carbohydrate	67.3	70.0	26	20
Fat	4.3	10.0	35	60
Total		100.0		100
kcal/gm	3.85		5.24	
Ingredient	gm	kcal	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch	506.2	2024.8	0	0
Maltodextrin 10	125	500	125	500
Sucrose	68.8	275.2	68.8	275
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Lard	20	180	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
FD&C Red Dye #5	0.04	0	0	0
FD&C Red Dye #40	0	0	0	0
FD&C Red Dye #1	0.01	0	0.05	0
Total	1055.55	4057	773.85	4057

ANEXO 2

Tabela 1 – *Primers* utilizados para análise de expressão genica

Name	Sequence	Supplier	
ACTB - actin beta	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT	IDT	Human
IL1B - interleukin 1 beta	F: ACGAATCTCCGACCACCACT R: CCATGGCCACAACAACACTGAC	IDT	Human
IL6 -interleukin 6	F: GACCCAACCACAAATGCCA R: GTCATGTCCTGCAGCCACTG	IDT	Human
IL10 - interleukin 10	F: GGTGATGCCCAAGCTGA R: TCCCCAGGGAGTTTACACA	IDT	Human
IFNG - interferon gamma	F: CCAACGCAAAGCAATACATGA R: CGCTTCCCTGTTTTAGCTGC	IDT	Human
TGFB - transforming growth factor beta 1	F: TATCGACATGGAGCTGGTGAAG R: CAGCTTGGACAGGATCTGGC	IDT	Human
TLR2 - toll like receptor 2	F: TGACCTGTCCAACAACAGGA R: TTCCCACTCTCAGGATTTGC	IDT	Human
TLR4 - toll like receptor 4	F: CTGCAATGGATCAAGGACCA R: TCCCACTCCAGGTAAGTGTT	IDT	Human
TNF - tumor necrosis factor	F: GGTGCTTGTTCCCTCAGCCTC R: CAGGCAGAAGAGCGTGTTG	IDT	Human
VEGF - vascular endothelial growth factor	F: GCACCCATGGCAGAAGG R: CTCGATTGGATGGCAGTAGCT	IDT	Human
18S - 18S ribosomal RNA	F: CGTTCCACCAACTAAGAACG R: CTCAACACGGGAAACCTCAC	IDT	Mouse
Alb - Albumin	F: TGCTTTTTCCAGGGGTGTGTT R: TTACTTCTGCACTAATTTGGCA	IDT	Mouse
CD163 - CD163 antigen	F: ATGGGTGGACACAGAATGGTT R: CAGGAGCGTTAGTGACAGCAG	IDT	Mouse
CR1g (Vsig4) - V-set and immunoglobulin domain containing 4	F: AGCTCAAGCTTGCCACCATGGAGATCTCATCAGGCTTGC R: GCCCGGGATCCCGGCAGGCAGGAATAGACATTGTTG	IDT	Mouse
Cxcl1- C-X-C motif chemokine ligand 1	F: CTGGGATTCACCTCAAGAACATC R: CAGGGTCAAGGCAAGCCTC	IDT	Mouse
Cxcl2 - C-X-C motif chemokine ligand 2	F: CCAACCAGGCTACAGG R: GCGTCACACTCAAGCTCTG	IDT	Mouse
Cyp2e1- cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	F: CGTTGCCTTGCTTGTCTGGA R: AAGAAAGGAATTGGGAAAGGTCC	IDT	Mouse
Cyp3a4 -	F: AAAGCCGCCTCGATTCTAAGC	IDT	Mouse

cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	R: ACTACATCCCGTGGTACAACC		
Cyp1a2 - cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2	F: AGTACATCTCCTTAGCCCCAG R: GGTCCGGGTGGATTCTTCAG	IDT	Mouse
Gapdh - glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	IDT	Mouse
Got1(AST) - glutamic-oxaloacetic transaminase 1	F: GCGCCTCCATCAGTCTTTG R: ATTCATCTGTGCGGTACGCTC	IDT	Mouse
Gpt2 (ALT) – glutamic pyruvate transaminase (alanineaminotransferase) 2	F: AACCATTCACTGAGGTAATCCGA R: GGGCTGTTTAGTAGGTTTGGGTA	IDT	Mouse
Gstp1 - Glutathione S-Transferase P1	F: ATGCCACCATACACCATTGTC R: GGGAGCTGCCCATACAGAC	IDT	Mouse
IL1B - interleukin 1 beta	F: GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT R: ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	IDT	Mouse
IL6 -interleukin 6	F: TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	IDT	Mouse
IL10 - interleukin 10	F: GCTCTTACTGACTGGCATGAG R: CGCAGCTCTAGGAGCATGTG	IDT	Mouse
Itgam - integrin alpha M	F: ATGGACGCTGATGGCAATACC R: TCCCCATTACGTCTCCCA	IDT	Mouse
Marco - macrophage receptor with collagenous structure	F: ACAGAGCCGATTTTGACCAAG R: CAGCAGTGCAGTACCTGCC	IDT	Mouse
Nr1h3 (LXRα) - nuclear receptor subfamily 1,group H, member 3	F: CTCAATGCCTGATGTTTCTCCT R: TCCAACCCTATCCCTAAAGCAA	IDT	Mouse
Sult1a1 - sulfotransferase family 1A member 1	F: CAACATGGAGCCCTTGCGTAA R: ATGAGCACATCATCAGGCCAG	IDT	Mouse
TLR2 - toll like receptor 2	F: GCAAACGCTGTTCTGCTCAG R: AGGCGTCTCCCTCTATTGTATT	IDT	Mouse
TLR4 - toll like receptor 4	F: ATGGCATGGCTTACACCACC R: GAGGCCAATTTTGTCTCCACA	IDT	Mouse
TNF - tumor necrosis factor	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT R: GCTACGACGTGGGCTACAG	IDT	Mouse

Ugt1a6 - UDP-Glucuronosyltransferase 1A6	F: GTTTCTCTTCCTAGTGCTTTGGG R: CCTCGTTCACTGAGATGTTCTAC	IDT	Mouse
--	--	-----	-------