

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Hortência Maciel de Castro Oliveira

**A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE TOLL 4 NOS
HEPATÓCITOS, E NÃO NO SISTEMA IMUNE, É A PRINCIPAL
VIA PARA ALTERAÇÕES METABÓLICAS HEPÁTICAS
DURANTE A ENDOTOXEMIA**

Belo Horizonte
2022

Hortência Maciel de Castro Oliveira

**A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE TOLL 4 NOS
HEPATÓCITOS, E NÃO NO SISTEMA IMUNE, É A PRINCIPAL
VIA PARA ALTERAÇÕES METABÓLICAS HEPÁTICAS
DURANTE A ENDOTOXEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte
2022

043

Oliveira, Hortência Maciel de Castro.

A sinalização do Receptor de Toll 4 nos hepatócitos, e não no sistema imune, é a principal via para alterações metabólicas hepáticas durante a endotoxemia [manuscrito] / Hortência Maciel de Castro Oliveira. – 2022.
60 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Macrófagos do Fígado. 3. Hepatócitos. 4. Lipopolissacarídeos. 5. Resposta imune. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE HORTÊNCIA MACIEL DE CASTRO OLIVEIRA. Aos vinte e dois dias do mês de agosto de 2022 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “*on line*” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “A sinalização do receptor de Toll 4 nos hepatócitos, e não no sistema imune, é a principal via para alterações metabólicas hepáticas durante a endotoxemia”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Gustavo Batista de Menezes, da Universidade Federal de Minas Gerais, 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 do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. André Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira (Universidade Estadual de Campinas), aprovada; Dr. Gustavo Batista de Menezes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de agosto de 2022.

André Gustavo de Oliveira

Dr. André Oliveira (UFMG)

Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira

Dr. Pedro Manoel Mendes de Moraes Vieira (Universidade Estadual de Campinas)

Gustavo Batista de Menezes
 Dr. Gustavo Batista de Menezes - Orientador (UFMG)

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer àqueles que me ajudam desde quando me entendo por gente: a minha família. Gostaria de agradecer ao meu pai, David, pelo apoio incondicional desde o início da minha vida acadêmica e por estar no meu coração e pensamentos todos os dias, me dando amor e força pra vencer cada etapa da minha vida. Também gostaria de agradecer à minha mãe, Lúcia, por ser o exemplo de força e perseverança que eu tenho em minha vida e por cuidar tão bem de mim todos os dias, sem exceção. Ainda, gostaria de agradecer à minha irmã, Stefânia, por ser meu porto seguro e por ser minha primeira melhor amiga na vida. Eu amo MUITO e devo a minha vida a todos vocês.

Também gostaria de agradecer ao André Gustavo, pessoa que eu conheci e me fiz amiga no primeiro período da graduação e que, com toda atenção do mundo, fez a ponte entre mim e o CGB, meu atual laboratório de pesquisa. Muito obrigada por isso André! Foi a melhor decisão tomada em minha vida.

E, claro, jamais deixaria de agradecer ao meu orientador, Gustavo Menezes. Você apareceu em minha vida no meu maior momento de dor. Teve toda paciência, carinho e cuidado do mundo comigo, e vem conduzindo minha carreira de forma IMPECÁVEL. Desejo a todos os acadêmicos um orientador como você. Serei eternamente grata por tudo, e tenho certeza que nosso caminho juntos está só começando. Obrigada por, além disso tudo, ainda ser um grande amigo!! Conte sempre comigo.

Estendo minha gratidão a todos os meus amigos do CGB. Pessoas que passaram pela minha vida ao longo desses 6 anos no laboratório e que me ensinaram tanto... não só sobre ciência, mas sobre a vida em sociedade. Vocês foram o meu primeiro contato profissional, e com certeza contribuíram e muito para a minha formação como um indivíduo nesse mundão em que vivemos. Obrigada por todos os experimentos, risadas, festas, discussões e companheirismo vivido ao longo dos anos.

Apreendi muito e foi um enorme prazer dividir a minha vida científica com vocês.

Aos meus amigos da vida, que entraram em distintos momentos nela, mas que espero levar pra sempre juntinho de mim. Obrigada por estarem sempre comigo e por trazerem mais leveza e felicidade à minha vida. Sem vocês, eu não sei se daria conta do batido. Não vou citar todos os nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém, mas não posso deixar de mencionar: Thais, Tamyres, Isabela, Laura, Diego, Bruna, Mariana, André, Bárbara, Gabriela, Lucas e Raphael. Eu amo muito vocês!

Obrigada também ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia e todos os professores que o integram, inclusive a banca.

E às agências CAPES, FAPEMIG, CNPq, Nikon, Maxilofacialtips e CDTN, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ser pesquisador no Brasil é um trabalho árduo, mas saibam que a caminhada vale a pena quando cada um de vocês faz parte da jornada. Por isso, muito obrigada por existirem. Amo Vocês!

“Tudo deve ter um início; e esse início deve estar ligado a algo que já existiu antes.”

- *Mary Shelley, Frankenstein*

RESUMO

O fígado é o principal órgão metabólico do corpo, e os hepatócitos – unidades funcionais responsáveis pelo metabolismo hepático de carboidratos, lipídios, xenobióticos, etc – constituem cerca de 80% da população celular presente no órgão. Contudo, o fígado também abriga uma vasta população de células imunes que estão em constante atividade, e que tem como principal componente os macrófagos residentes hepáticos: as células de Kupffer. As células de Kupffer são macrófagos presentes em grande número nos sinusóides hepáticos, onde desempenham funções como a “filtragem” do sangue que passa pelo órgão e que pode conter, ou não, a presença de antígenos. Um desses antígenos que pode estar presente é o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que quando circulante nos sinusóides, pode desencadear uma resposta inflamatória a partir da ativação do TLR4 na membrana das células de Kupffer. Entretanto, outra célula hepática, não considerada originalmente como uma célula imune, também pode ter o TLR4 ativado em sua membrana na presença de LPS, desencadeando assim uma resposta imune: os hepatócitos. Dessa forma, sabendo que há a presença de um receptor comum aos compartimentos imune e metabólico hepáticos, e que estes podem ser ativados com consequente geração de uma resposta imunológica no órgão por ambas as partes, buscamos entender por meio desse trabalho se há, como se dá e quais são as consequências metabólicas geradas pela interação entre esses compartimentos hepáticos após um insulto por LPS.

PALAVRAS-CHAVE: hepatócitos, TLR4, LPS, lipídios.

ABSTRACT

The liver is the main metabolic organ in the body, and hepatocytes – functional units responsible for the hepatic metabolism of carbohydrates, lipids, xenobiotics, etc. – constitute about 80% of the cell population present in this organ. However, the liver also houses a vast population of immune cells that are in constant activity, whose main component is the hepatic resident macrophages: Kupffer cells. Kupffer cells are macrophages present in large numbers in the hepatic sinusoids, where they perform functions such as “filtering” the blood that passes through the liver, which may contain antigens. One of these antigens that may be present is bacterial lipopolysaccharide (LPS), which, when circulating in the sinusoids, can trigger an inflammatory response from TLR4 membrane activation in Kupffer cells. However, another liver cell, not originally considered as an immune cell, can also have TLR4 activated on its membrane in the presence of LPS, thus triggering an immune response: the hepatocytes. Therefore, knowing that there is a presence of a common receptor to the hepatic immune and metabolic compartments, and that these can be activated with consequent generation of an immune response in the organ by both parties, we seek to understand through this project if happens, how it works and what are the metabolic consequences generated by the interaction between these hepatic compartments after an LPS insult.

KEY WORDS: hepatocytes, TLR4, LPS, lipids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Ilustração 1 - Arquitetura do lóbulo hepático	16
Ilustração 2 - Sinalização via TLR4	18
Tabela 1 - Descrição gênica para RT-qPCR em tempo real	26-29
Tabela 2 - Grupos de camundongos quimerizados	43
Figura 1 - Resposta inflamatória hepática ao LPS	35
Figura 2 - Resposta parenquimal hepática ao LPS	36
Figura 3 - Resposta metabólica hepática ao LPS	38
Figura 4 - Resposta metabólica lipídica hepática ao LPS	39
Figura 5 - O insulto por LPS gera um acúmulo lipídico hepático	41
Figura 6 - O LPS gera um quadro de hipertrigliceridemia hepática	42
Figura 7 - Resposta metabólica lipídica hepática dos camundongos quimerizados	44

LISTA DE ABREVIações

ALT - Alanina Aminotransferase

CD14 - Cluster de Diferenciação 14

cDNA - DNA complementar

DMSO - Dimetil sulfóxido

Gy - Gray

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HE - Hematoxilina-eosina

IL-1 - Receptor de IL-1

i.v - Endovenoso

LBP - Proteína ligante do LPS

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LPS - Lipopolissacarídeo

MD-2 - Fator de diferenciação mielóide 2

mg - Miligrama

MIV - Microscopia Intravital

MPO - Mieloperoxidase

MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão Fosfato-salino

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

RNA - Ácido ribonucleico

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa quantitativa

TIR - Domínio dos receptores tipo Toll/IL-1

TIRAP - Proteína adaptadora contendo domínio T

TLR - Receptor do tipo Toll

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4

TLR4^{-/-} - Receptor do tipo Toll 4 nocaute

TMB - Solução cromogênica de tetrametilbenzidina

TRAM - Molécula adaptadora relacionada à TRIF

TRIF - Adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

WT - Tipo selvagem

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.JUSTIFICATIVA	22
3.OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4.MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais experimentais	24
4.2 Indução de resposta inflamatória sistêmica via LPS	24
4.3 Análises Histológicas.....	24
4.4 Ensaio da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) de Neutrófilos	25
4.5 Ensaio de Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT)	25
4.6 Isolamento de hepatócitos.....	26
4.7 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT-qPCR em tempo real).....	26
4.8 Microscopia Intravital (MIV).....	32
4.9 Análise de imagens	32
4.10 Método de Folch	33
4.11 Dosagem de Triglicerídeos e Colesterol	33
4.12 Geração de Camundongos Quimerizados.....	34
4.13 Análises Estatísticas	35
5.RESULTADOS	36
5.1 Padronização do modelo experimental	36
5.2 A inflamação por LPS gera uma redução da expressão de genes metabólicos lipídicos hepáticos	39
5.3 O insulto por LPS gera um acúmulo lipídico hepático.....	43
5.4 O insulto por LPS gera um quadro de hipertrigliceridemia hepática	45
5.5 A alteração metabólica hepática sob influência de LPS é coordenada pelo parênquima hepático.....	46
6.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO	49
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1.INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão localizado na cavidade abdominal, situado entre as circulações portal e sistêmica, que se destaca por suas funções vitais que auxiliam na sustentação da homeostase no organismo, sendo assim necessário para atividades metabólicas, de desintoxicação, de armazenamento de nutrientes e vitaminas, imunológicas, entre outras (BAIKIE, 1958). Essa complexidade funcional é espelhada pela heterogeneidade celular que compõe o fígado. De fato, o fígado é composto por vários tipos celulares, que incluem as células endoteliais sinusoidais hepáticas, os hepatócitos, as células de Kupffer, os colangiócitos e as células de Ito (BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013). Todas essas células estão organizadas para formar a unidade funcional hepática: o lóbulo do fígado (**Ilustração 1**). Essa estrutura consiste principalmente em cordões de hepatócitos organizados de forma hexagonal, que circundam uma veia central e são separados por unidades circulatórias chamadas sinusóides hepáticos, vasculatura essa que é responsável pela perfeita função hepática. Isso, pois, é por meio da vascularização hepática que se tem o transporte de todos os elementos necessários para as diferentes funções desempenhadas por esse órgão. Essa vasculatura hepática é composta por um sistema de vasos dividido em diferentes partes: a tríade portal, os sinusóides e a veia central (SASSE; SPORNITZ; MALY, 1992).

Nos vértices dos lóbulos do fígado situa-se a tríade portal, que possui três componentes: a veia porta, a artéria hepática e os ductos biliares. O sangue entra no fígado através da artéria hepática e da veia porta que, então, forma os sinusóides hepáticos (**Ilustração 1**). Por esta razão, o sangue arterial e venoso se mistura nos sinusóides hepáticos e flui em direção à veia central. Dessa

forma, a artéria hepática fornece sangue oxigenado para o fígado e é responsável por aproximadamente 25% do suprimento sanguíneo hepático; e a veia porta é rica em nutrientes e antígenos (tanto da microbiota alimentar quanto do intestino), drenando o sangue do sistema gastrointestinal e sendo responsável por, aproximadamente, 75% do suprimento sanguíneo do fígado (GREENWAY; STARK, 1971).

A distribuição do sangue dentro dos sinusóides ocorre com diferentes pressões e gradientes, que são determinantes e característicos de cada zona hepática. Levando em consideração o fluxo sanguíneo dentro do lóbulo hepático, iniciando na tríade portal e fluindo em direção à veia central, o lóbulo hepático é dividido em três zonas (**Ilustração 1**). Cada uma dessas zonas possui tipos celulares característicos, cujas diferentes funções são influenciadas pela pressão sanguínea e gradientes de nutrientes e oxigênio (GREENWAY; STARK, 1971). Contudo, nessa complexidade funcional e estrutural hepática, dois tipos celulares se destacam no órgão por sua representatividade e função: os hepatócitos e as células de Kupffer.

Os hepatócitos compõem o parênquima hepático, representando cerca de 80% das células totais do fígado, e desempenham a principal função desse órgão: o metabolismo hepático. Essas células fornecem, reciclam e eliminam elementos do nosso organismo através de vias metabólicas importantes, como a de metabolismo de carboidratos, de lipídios, de ferro e de xenobióticos (BAIKIE, 1958). Isso só é possível pois os hepatócitos, organizados em cordões hexagonais e entremeados pelos sinusóides hepáticos (**Ilustração 1**), estão em contato direto com os elementos que necessitam ser processados

metabolicamente, como carboidratos, lipídios, xenobióticos, etc (SASSE; SPORNITZ; MALY, 1992).

No entanto, outro elemento residente nesses sinusóides, e que desempenha importantes funções hepáticas, são as células de Kupffer. Essas células fazem parte da rede de macrófagos teciduais residentes, sendo, por sua vez, os macrófagos residentes no fígado. Eles representam aproximadamente mais de 50% dos macrófagos residentes no corpo e 15% da população de células no fígado, e são responsáveis pelo processo de fagocitose no fígado. Estas são células sésseis, localizadas no lúmen da vasculatura hepática, e sua localização é o que torna mais eficaz o desempenho da sua função como uma célula fagocítica, pois estão localizadas em sua maioria nas regiões periportais hepáticas (**Ilustração 1**), o que é considerado estratégico por ser a região hepática que recebe maior suprimento sanguíneo (SASSE; SPORNITZ; MALY, 1992). Sendo assim, via fluxo sanguíneo, quando encontram moléculas que são consideradas potencialmente patógenas ao nosso organismo, as células de Kupffer são capazes de fagocitar esses antígenos e digerí-los em vesículas endocíticas chamadas fagossomas, que ficam dentro da célula, contribuindo ainda mais para a defesa do nosso organismo e funcionando como um “filtro” no fluxo sanguíneo (NAITO et al., 2004).

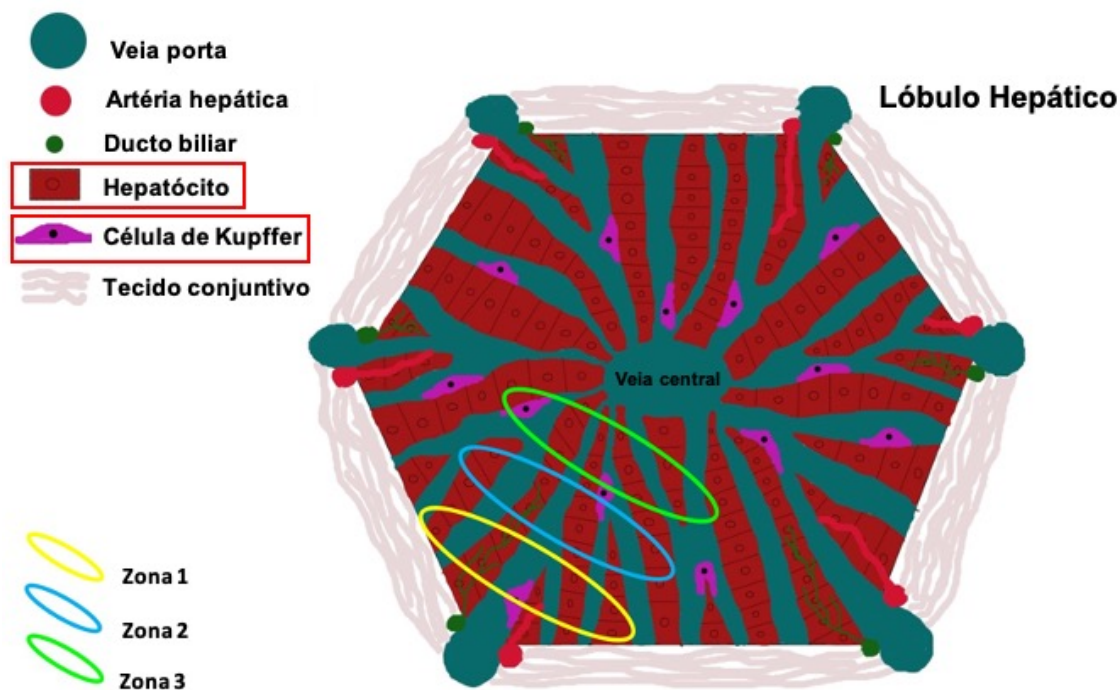


Ilustração 1: Arquitetura do lóbulo hepático. Composição e localização das estruturas que compõem o lóbulo hepático, a unidade funcional hepática.

Contudo, o que seriam esses antígenos possivelmente patógenos ao nosso organismo, e que podem chegar ao fígado via circulação portal? Um deles é o lipopolissacarídeo (LPS), produto bacteriano que se encontra na parede celular de bactérias Gram-negativas (PARK; LEE, 2013). Este produto bacteriano inicialmente se encontra como uma endotoxina, ou seja, uma toxina que está presente internamente nas bactérias Gram-negativas. No entanto, quando esse tipo bacteriano tem a sua membrana rompida devido a alguma perturbação externa, como a presença de antibióticos ou o combate por parte de células de defesa do nosso organismo, há então a liberação de LPS nos vasos sanguíneos, o que caracteriza o quadro de endotoxemia (DANNER et al., [s.d.]). Esse quadro, por sua vez, também gera mais uma resposta advinda do nosso sistema imune inato caracterizada principalmente pela produção de citocinas

pró-inflamatórias que vão participar e coordenar a resolução daquele cenário patogênico no nosso organismo (MENEZES et al., 2009a; XUE et al., 2017).

Todos esses processos imunológicos descritos acima só podem ocorrer pois as células imunes do nosso organismo têm a capacidade de reconhecer o LPS via receptor de membrana e desencadear uma resposta inflamatória, receptor esse que no caso do reconhecimento de LPS se trata do Receptor do tipo Toll 4 (TLR4). Esse receptor pertence a uma família de receptores do sistema imune inato chamada de Receptores do tipo Toll (TLR), que compõem a categoria de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) do nosso organismo responsável pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que nesse caso é o LPS (TRIANATAFILOU; TRIANATAFILOU, 2002).

Curiosamente, esses receptores foram originalmente descritos na espécie de mosca *Drosophila* como uma proteína crucial para o desenvolvimento dorso-ventral de embriões dessa mosca, mas, posteriormente, com o avanço dos estudos, foi demonstrado que a ativação desses receptores também dá início a uma resposta imunológica (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002). Dentre os componentes da família de TLR, o TLR4 é um tipo de receptor transmembrana, que contém um domínio extracelular com repetições ricas em leucina que se associam a um complexo de proteínas extracelulares para se ligar ao LPS (proteínas LBP, CD14 e MD-2), e um domínio intracelular de proteínas do tipo TIR (domínios de receptores do tipo Toll/IL-1 - MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) (**Ilustração 2**) que, quando ativado, dá início a uma cascata imunológica com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias sintetizadas intracelularmente (ZHOU; XU; GAO, 2016).

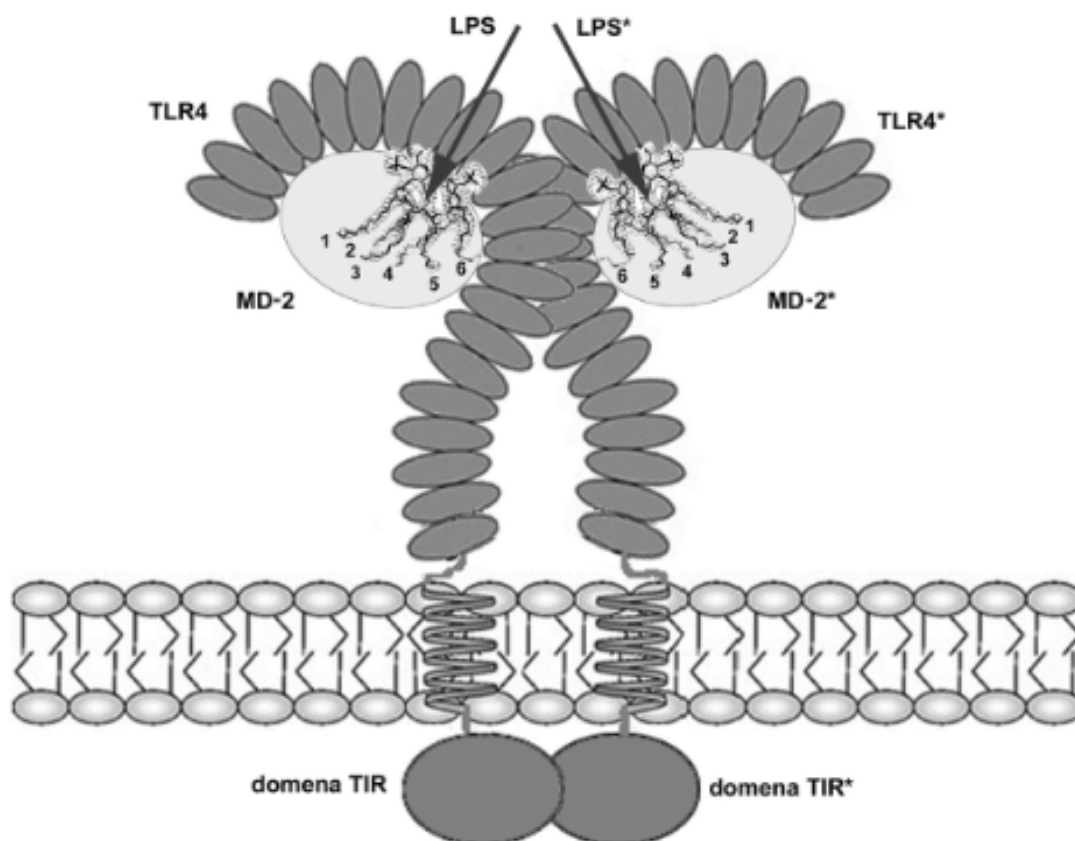


Ilustração 2: Sinalização via TLR4. Complexo formado após detecção de LPS circulante, com a formação dos domínios extra e intracelulares do TLR4 (CZERKIES; KWIATKOWSKA; PŁYTYCZ, 2014).

Dessa forma, é natural que um dos tipos celulares do nosso sistema imune que expressa o TLR4 sejam as células de Kupffer, especialmente devido a sua localização, já que este tipo celular está em contato direto com o suprimento sanguíneo hepático. E isso é um fato. As células de Kupffer são, portanto, capazes de reconhecer LPS caso ele esteja presente no microambiente hepático, e gerar uma resposta imunológica contra essa toxina, exercendo assim seu papel no sistema imune inato e protegendo o fígado (TOSHCHAKOV et al., 2002).

Porém, um outro tipo celular, até então não reconhecido como componente do corpo celular imune, também pode expressar TLR4 em sua

membrana: os hepatócitos (JIA et al., 2018). Essa célula, conhecidamente metabólica, também pode ter papel essencial na resposta imunológica do nosso organismo, reconhecendo o LPS que chega pelos sinusóides hepáticos e sintetizando citocinas pró-inflamatórias para o combate dessa toxina. E essa é apenas uma das possibilidades que podem ser verdadeiras no campo da biologia hepática. Recentes estudos vêm apontando o hepatócito, até então conhecido por seu exclusivo potencial metabólico, como célula promissora no campo da imunologia (CRISPE, 2016; ZHOU; XU; GAO, 2016). Dentre as várias funções imunes destacadas nesses estudos, que são desempenhadas pelos hepatócitos, temos: síntese de proteínas do sistema complemento; síntese de proteína C-reativa; síntese das proteínas que compõem o complexo de ativação do TLR4 (LBP, CD14 e MD-2); e síntese das proteínas relacionadas ao metabolismo de ferro (transferrina, lipocalina-2, hemopexina e hepcidina) (CRISPE, 2016; ZHOU; XU; GAO, 2016).

2.JUSTIFICATIVA

Como descrito acima, já se sabe na literatura que o TLR4 está presente tanto na membrana celular das células de Kupffer (compartimento imune hepático), quanto na membrana celular dos hepatócitos (compartimento metabólico hepático), podendo, dessa forma, ser ativado ou não no fígado. Tomando em conjunto as informações de que a ativação de TLR4 por meio de LPS desencadeia uma resposta inflamatória, e que este receptor está presente nos dois compartimentos hepáticos, infere-se que em algum momento durante essa resposta imunológica há uma comunicação entre os macrófagos hepáticos e a “face” metabólica do fígado: os hepatócitos.

Portanto, o presente trabalho busca entender melhor e caracterizar se há uma interação entre os compartimentos hepáticos durante um quadro inflamatório no órgão e como essa possível interação pode se desdobrar no fígado, gerando ou não consequências metabólicas para aquele microambiente.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar o impacto do estímulo do TLR4 pelo LPS no metabolismo hepático.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir uma resposta inflamatória sistêmica via LPS e caracterizar o microambiente hepático quanto ao processo inflamatório gerado e quanto à manutenção ou não da arquitetura parenquimal hepática.
- Avaliar a função metabólica hepática após a indução de uma resposta inflamatória sistêmica via LPS.
- Visualizar o fígado por meio de Microscopia Confocal e analisar o principal desdobramento fenotípico gerado após a indução de uma resposta inflamatória sistêmica via LPS.
- Desagregar os dois compartimentos hepáticos via modelo de quimerização de camundongos e avaliar a função metabólica hepática após a indução de uma resposta inflamatória sistêmica via LPS.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (WT), entre 14 e 16 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG), e camundongos geneticamente modificados *Tlr4* nocaute total (TLR4^{-/-}), provenientes do The Jackson Laboratory. Esses animais experimentais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (NUVILAB) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA 392/2016).

4.2 Indução de resposta inflamatória sistêmica via LPS

O modelo de inflamação sistêmica via LPS executado neste trabalho consiste no seguinte protocolo: os camundongos em experimentação foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS). Estes, receberam uma dose endovenosa (i.v) de LPS (LPS de *Escherichia coli*; 0111:B4; Calbiochem) na concentração de 1mg/kg (VALENTINE et al., 2018), em 100 µl de cloreto de sódio 0,9%. Os animais do grupo Controle passaram pelo mesmo procedimento de dose endovenosa, porém o conteúdo dessa dose foi de apenas 100 µl de cloreto de sódio 0,9%.

4.3 Análises Histológicas

O fígado foi coletado e fixado em formaldeído a 4% em solução salina de tampão fosfato, pH 7,4 (PBS), desidratado em álcool e incluído em parafina. Em

seguida, cortes de 4 μm de espessura foram feitos em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina (HE). A lâmina hepática foi analisada utilizando um microscópio Olympus BX40 através de objetivas de 10x e 20x. Os núcleos de células imunes foram contados por cada campo analisado e a anatomia do parênquima hepático foi avaliada.

4.4 Ensaio da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) de Neutrófilos

O ensaio de MPO foi realizado adicionando 25 μL de sobrenadante de tecido processado em 25 μL de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, Alemanha) a uma concentração final de 1,6 mM. Após 5 min a 37 °C, 100 μL de PBS suplementado com 6,6 mM de H₂O₂ foram adicionados seguidos por uma nova incubação a 37 °C por 5 min. A reação foi interrompida com 100 μL de H₂SO₄ 1M e quantificada em espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a 450 nm.

4.5 Ensaio de Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT)

Uma possível lesão hepática foi investigada, de forma indireta, por meio dos níveis séricos da enzima Alanina Aminotransferase. Para isso foi realizado um teste cinético (Bioclin). Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 15.000 RPM por 10 minutos para coleta do soro. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços sem a necessidade de diluições, junto com o substrato (Tampão Tris pH 7,8. LDH, L-alanina, NaCl e azida sódica) e coenzimas (alfacetoglutarato, NADH e azida sódica), ambos fornecidos pelo fabricante. A placa contendo as amostras foi mantida a 37 °C por 50 segundos e, então, foi

lida num espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA - 340nm) a 37 °C em intervalos de um minuto durante quatro minutos.

4.6 Isolamento de hepatócitos

Após 24 horas da injeção de LPS, os hepatócitos dos camundongos quimerizados foram isolados conforme o seguinte protocolo: para a purificação de hepatócitos, camundongos foram anestesiados com injeção intradérmica (i.d.) de ketamina (80 mg / kg; Syntec) e xilazina (15 mg / kg; Syntec) e submetidos a laparotomia para exposição do fígado e dos vasos sanguíneos. A porção inferior da veia cava foi canulada com cateter 16G e o fígado perfundido com as soluções-tampão Hanks A e Hanks B, contendo Colagenase tipo VIII (800 mg / L; Sigma-Aldrich). O fígado foi então removido e dissociado em meio de cultura Williams E (Sigma-Aldrich) em condição asséptica. A suspensão resultante foi filtrada uma vez em membrana de nylon de 40 µM e centrifugada a 60 x g, 4°C, por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram aliqüotadas em tubos à densidade de 2×10^6 , sendo então novamente centrifugadas a 60 x g, 4°C, por 2 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi armazenado em freezer -80 para posterior análise de expressão gênica.

4.7 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT-qPCR em tempo real)

O RNA total foi obtido a partir dos hepatócitos anteriormente isolados (2×10^6 células). Já o RNA total obtido a partir do fígado total foi retirado de 20mg do tecido. A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo

ReliaPrepTM RNA TissueMiniprep System (Promega). Ao final da extração, a concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm. Dessa forma, foram utilizados 1000 ng de RNA para a síntese de cDNA, utilizando para isso o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A reação foi submetida a 25 °C por 5 minutos, 50 °C por 90 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA produzido foi diluído em 1:10 e armazenado a -20 °C .

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, foi determinado um controle endógeno, que foi útil como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes em estudo. Dentre os genes testados (*Gapdh*, *18s* e *Actb*), e utilizando-se da análise estatística feita pelo programa NormFinder, o melhor normalizador escolhido para este estudo foi B-Actina (*Actb*).

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

As sequências dos iniciadores selecionados foram:

Gene	Sequência gênica	Via metabólica
<i>Acaca</i> (Acetil-CoA Carboxilase)	F- 5' GATGAACCATCTCCGTTGGC 3' R- 5' GACCCAATTATGAATCGGGAGTG 3'	Biossíntese de Ácidos Graxo
<i>Acat1</i> (Acetil-CoA Acetiltransferase 1)	F- 5' CAGGAAGTAAGATGCCTGGAAC 3' R- 5' TTCACCCCTTGGATGACATT 3'	B-Oxidação
<i>Acat2</i> (Acetil-CoA Acetiltransferase 2)	F- 5' CCCGTGGTCATCGTCTCAG 3' R- 5' GGACAGGGCACCATTGAAGG 3'	B-Oxidação
<i>Acox1</i> (Acil-CoA Oxidase 1)	F- 5' TAACTTCCTCACTCGAAGCCA 3' R- 5' AGTTCCATGACCCATCTCTGTC 3'	B-Oxidação
<i>Actb</i> (B-Actina)	F- 5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3' R- 5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'	Proteína Citoplasmática (gene referência)
<i>Apoa1</i> (Apolipoproteína A1)	F- 5' GGCACGTATGGCAGCAAGAT 3' R- 5' CCAAGGAGGAGGATTCAAAGT 3'	Síntese de HDL
<i>Apob</i> (Apolipoproteína B)	F- 5' AAGCACCTCCGAAAGTACGTG 3' R- 5' CTCCAGCTCTACCTTACAGTTGA 3'	Síntese de VLDL/LDL e Quilomícron
<i>Cpt1a</i> (Carnitina palmitoiltransferase 1A)	F- 5' CTCCGCCTGAGCCATGAAG 3' R- 5' CACCAGTGATGATGCCATTCT 3'	B-Oxidação

<i>Dgat2</i> (Diacilglicerol Aciltransferase 2)	F- 5' GCGCTACTTCCGAGACTACTT 3' R- 5' GGGCCTTATGCCAGGAACT 3'	Esterificação (Triglicerídeos)
<i>Fabp1</i> (Proteína Ligante de Ácido Graxo 1)	F- 5' ATGAACTTCTCCGGCAAGTACC 3' R- 5' CTGACACCCCTTGATGTCC 3'	Proteína transportadora de Ácidos Graxo
<i>Fasn</i> (Ácido Graxo Sintase)	F- 5' GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT 3' R- 5' TGGTAATCCATAGAGCCCAG 3'	Biossíntese de Ácidos Graxo
<i>G6pc</i> (Glicose-6-fosfatase)	F- 5' CGACTCGCTATCTCCAAGTGA 3' R- 5' GTTGAACCAGTCTCCGACCA 5'	Gliconeogênese
<i>Gck</i> (Glicoquinase)	F- 5' TGAGCCGGATGCAGAAGGA 3' R- 5' GCAACATCTTTACTGGCCT 3'	Glicólise
<i>Gpd1</i> (Glicerol-3-fosfato Desidrogenase)	F- 5' ATGGCTGGCAAGAAAGTCTG 3' R- 5' CGTGCTGAGTGTGATGATCT 3'	Síntese de Ácidos Graxo via Metabolismo de Glicose
<i>Gstp1</i> (Glutathiona-S- transferase P1)	F- 5' ATGCCACCATACACCATTGTC 3' R- 5' GGGAGCTGCCCATACAGAC 3'	Metabolismo de Xenobióticos
<i>Hamp</i> (Hepcidina)	F- 5' AAGCAGGGCAGACATTGCGAT 3' R- 5' CAGGATGTGGCTCTAGGCTATGT 3'	Metabolismo de Ferro
<i>IL-1b</i> (Interleucina 1 Beta)	F- 5' GCAACTGTTCTGAACTCAACT 3' R- 5' ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT 3'	Citocina Pró- inflamatória
<i>IL-6</i> (Interleucina 6)	F- 5' TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC 3' R- 5' TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC 3'	Citocina Pró- inflamatória

<i>IL-10</i> (Interleucina 10)	F- 5' GCTCTTACTGACTGGCATGAG 3' R- 5' CGCAGCTCTAGGAGCATGTG 3'	Citocina Anti-inflamatória
<i>Lipc</i> (Lipase Hepática)	F- 5' ATGGGAAATCCCCTCCAAATC 3' R- 5' GTGCTGAGGTCTGAGACGA 3'	Catabolismo de Triglicerídeos
<i>Pck1</i> (Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase 1)	F- 5' CTGCATAACGGTCTGGACTTC 3' R- 5' CAGCAACTGCCCGTACTCC 3'	Gliconeogênese
<i>Pklr</i> (Piruvato Quinase)	F- 5' TCAAGGCAGGGATGAACATTG 3' R- 5' CACGGGTCTGTAGCTGAGTG 3'	Glicólise
<i>Scd1</i> (Estearoil-CoA Dessaturase 1)	F- 5' TTCTTGGGATACTCTGGTGC 3' R- 5' CGGGATTGAATGTTCTTGTCTG 3'	Biossíntese de Ácidos Graxo
<i>Slc25a1</i> (Membro 1 da Família 25 de Carreadores de Solute)	F- 5'GAGGCATCGAAATCTGCATCA 3' R- 5'GGATGGAGCCGTAGAGCAA 3'	Biossíntese de Ácidos Graxo
<i>Tfr1</i> (Receptor de Transferrina 1)	F- 5' AGCCAGATCAGCATTCTCTAACT 3' R- 5' GCCTTCATGTTATTGTCTGGCAT 3'	Metabolismo de Ferro
<i>Tfr2</i> (Receptor de Transferrina 2)	F- 5' TTGGGGTCTACTTCGGAGAGT 3' R- 5' GACAGGAGCCTAAGTGCTCAG 3'	Metabolismo de Ferro
<i>Tnf-α</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)	F- 5' CCTTCCTCTCCTCAGATGTTTC 3' R- 5' ACGGGTCAGTCACCAAATC 3'	Citocina Pró-inflamatória

<p><i>Ugt1a1</i> (UDP- Glucuronosiltransferase 1A1)</p>	<p>F- 5' GCTTCTTCGGTACCTTCTGTTG 3' R- 5' GCTGCTGAATAACTCCAAGCAT 3'</p>	<p>Metabolismo de Xenobióticos</p>
<p><i>Ugt1a6</i> (UDP- Glucuronosiltransferase 1A6)</p>	<p>F- 5' GTTTCTCTTCCTAGTGCTTTGGG 3' R- 5' CCTCGTTCAGTACTGAGATGTTCTAC 3'</p>	<p>Metabolismo de Xenobióticos</p>

Tabela 1: Descrição gênica para RT-qPCR em tempo real. Tabela com dados referentes aos iniciadores utilizados para RT-qPCR em tempo real e suas respectivas sequências gênicas e vias metabólicas.

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (*threshold cycle*) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (*Actb*) para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de Δ Ct, calculou-se o $\Delta\Delta$ Ct, que corresponde ao Δ Ct amostra – Δ Ct do calibrador. Neste estudo, o calibrador utilizado foi o tecido que não recebeu o tratamento com LPS. A relação da expressão gênica entre a amostra e o calibrador foi calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram obtidos no Rotor-Gene Q Series Software e analisados no Prism 8.0. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “Curva de *Melting*”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

4.8 Microscopia Intravital (MIV)

Os procedimentos para a execução da microscopia intravital foram padronizados e detalhados previamente em nosso laboratório (MARQUES et al., 2015). Em suma, com relação às particularidades desse método, os animais receberam, por via endovenosa, uma injeção a 2,5% de Azul de Evans (proporção solução salina e Azul de Evans), com emissão a 680 nanômetros para marcação fluorescente do fluxo sanguíneo hepático. Após 5 minutos, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil; 60mg/Kg e 15mg/Kg, respectivamente) e laparatomizados na linha média para exposição e retirada do fígado (*ex vivo*). Feito isso, uma solução de Bodipy (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boron, 1mg/ml, diluído em DMSO) foi depositada diretamente sob o fígado (1µg/por animal) para marcação fluorescente de gotículas lipídicas neutras. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1R equipado com detector espectral (Nikon Shinagawa, Tokyo, Japan).

4.9 Análise de imagens

As imagens foram analisadas de forma semiautomática utilizando o algoritmo do software NIS Elements 5.1 (Nikon). A área de gordura foi calculada em relação a área total da imagem. A análise morfológica das gotículas incluiu a área individual de cada objeto considerado que, ao final, foi convertida na porcentagem de área total de fluorescência das gotículas compreendida na imagem analisada. Essa análise foi realizada digitalmente pelo algoritmo do software NIS Elements 5.1 (Nikon).

4.10 Método de Folch

Para a extração de lipídios do fígado utilizamos esse método, que tem como princípio a solubilização dos lipídios via metanol e clorofórmio, seguida da precipitação destes para sua extração. O protocolo consistiu na coleta de 200 mg de fígado, seguida de solubilização em uma Solução de Extração (Clorofórmio + Metanol 2:1), e filtragem e centrifugação do líquido restante após adição de uma solução salina (Cloreto de Sódio 0,9%). Ao final, os lipídios extraídos e solubilizados em uma fase no tubo Falcon foram retirados e transferidos para um tubo Eppendorf de 2 ml. Dessa forma, foram deixados em uma Capela de Exaustão para evaporação da fase líquida dessa solução e, assim, ao final desse processo, os lipídios se encontram precipitados no fundo do tubo Eppendorf. Finalmente, os lipídeos foram pesados (levando em consideração o peso do tubo Eppendorf vazio) e seguiram para as posteriores análises.

4.11 Dosagem de Triglicerídeos e Colesterol

A dosagem de Triglicérides e Colesterol foi feita tanto do fígado quanto do soro dos camundongos, com a finalidade de avaliar os níveis desses compostos durante o percurso da inflamação via LPS. Para essas medições, foram utilizados testes cinéticos (Bioclin). As amostras de fígado foram coletadas e processadas conforme método de Folch. Já as amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 7000G por 10 minutos para coleta do soro. O ensaio consiste na degradação de triglicerídeos e colesterol na presença de um reagente enzimático próprio (fornecido no kit). Este, foi realizado em uma

microplaca de 96 poços sem a necessidade de diluições e lida em um espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, EUA - 500nm) a 37 °C em intervalos de cinco minutos até a completa reação da amostra padrão (fornecida no kit).

4.12 Geração de Camundongos Quimerizados

A análise da correlação entre os compartimentos imune e metabólico hepáticos foi executada a partir da geração de camundongos quimerizados, método já bem estabelecido em nosso laboratório (ANTUNES et al., 2018). Para retirada de medula óssea, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures e tíbias foram extraídos. Os músculos adjacentes foram retirados e as extremidades dos ossos removidas para que 2 mL de meio de cultura RPMI (Cultilab) fossem injetados no canal medular. A suspensão foi coletada, filtrada em membrana de 70 µm, centrifugada e ressuspendida em RPMI. O *pellet* resultante foi ressuspendido em meio RPMI e as células contadas.

Os animais que receberam medula óssea foram tratados com antibiótico (Ciprofloxacino, 2mg/ml) durante 3 dias antes da transferência, quando então passaram por duas sessões de radiação gama (Fonte de Cobalto 60, CDTN-UFMG). Na primeira sessão, os animais foram submetidos a 5 Gy de radiação absorvida. Duas horas após a primeira sessão, os animais foram submetidos a nova sessão de radiação, dessa vez a 4 Gy (total de 9 Gy de radiação gama). Imediatamente após à segunda dose, foi realizada transferência de medula óssea total através de injeção endovenosa de 1×10^7 células por camundongo. Os animais foram tratados com antibiótico (Ciprofloxacino, 2mg/ml), após a transferência, por ainda 12 dias (totalizando 15 dias de tratamento). Oito

semanas após o transplante, as células circulantes totais foram contadas para garantir que houve repovoamento total de células, e só então os camundongos foram direcionados para os experimentos seguintes.

4.13 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados, bem como a criação dos gráficos, foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad software, Inc). Os valores foram expressos como Média \pm EPM (erro padrão da média), e dois grupos foram considerados estatisticamente significativos quando $P \leq 0,05$. O teste estatístico utilizado neste estudo foi o Teste T de Student.

5.RESULTADOS

5.1 Padronização do modelo experimental

Neste trabalho, selecionamos como ferramenta para avaliação da interação imune-metabólica hepática um insulto inflamatório via LPS. Dessa forma, alguns parâmetros foram avaliados para certificação de que o insulto via LPS ocorreu, com consequente geração de uma resposta imune hepática, e que esse processo inflamatório gerado não comprometeu o parênquima hepático, já que este foi o compartimento alvo das análises realizadas no presente trabalho por ser sede do principal agente metabólico do tecido: os hepatócitos.

O primeiro parâmetro avaliado foi a eficácia da dose de LPS injetada nos camundongos. A dose de 1mg/kg de LPS escolhida foi retirada da literatura pelos indicativos de funcionalidade dos quais ela já tinha (VALENTINE et al., 2018), e foi dada aos camundongos WT para realização do ensaio da atividade de mieloperoxidase de neutrófilos, RT-qPCR em tempo real de fígado total e histologia após 24 horas do insulto via LPS. O primeiro resultado visto foi o aumento da quantidade de MPO intra-hepático após 24 horas de insulto por LPS (**Figura 1. A**), indicativo de que houve uma migração de neutrófilos para aquela região durante o insulto (CARSWELL et al., 1075). Além disso, o possível processo inflamatório foi avaliado via RT-qPCR em tempo real de fígado total, por qual foi analisada a expressão genica hepática de *IL-1b*, *IL-6*, *IL-10* e *Tnf*. Dessa forma, foi detectado o aumento da expressão de *Tnf* hepático após 24 horas de insulto por LPS (**Figura 1. B**), indicativo da presença de um processo inflamatório no fígado nesse momento (CARSWELL et al., 1075). Ainda, um infiltrado leucocitário após 24 horas de insulto por LPS foi quantificado nas análises das lâminas histológicas feitas, confirmando novamente a resposta

inflamatória gerada com êxito pelo nosso modelo de inflamação. Foi possível observar também uma maior presença de hemácias no tecido após 24 horas de insulto por LPS, e os hepatócitos, nesse período, aparentam estar maiores e mais arredondados, chegando a comprimir os espaços destinados aos sinusóides que os rodeiam (**Figura 2. A,B,C**).

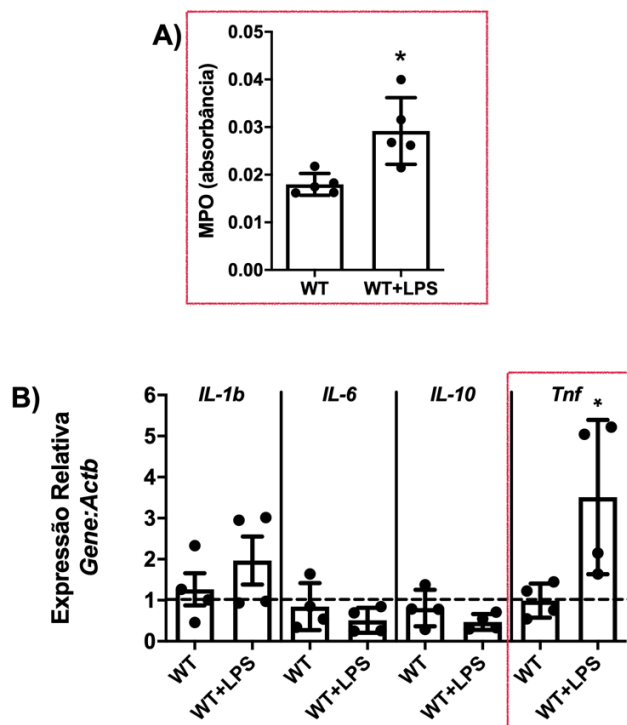


Figura 1: Resposta inflamatória hepática ao LPS. (A) Quantificação da liberação de MPO no fígado após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). **(B)** Análise da expressão gênica hepática de citocinas pró-inflamatórias após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

Por outro lado, um segundo parâmetro foi avaliado: a estrutura do parênquima hepático após o insulto inflamatório. Ainda por histologia, foi visto nas lâminas que a integridade do parênquima hepático foi mantida após 24 horas de insulto por LPS, no qual não foi visto nenhum tipo de forma semelhante a um processo de necrose hepática ou rompimento dos hepatócitos (**Figura 2. A,B**), dado esse importante pelo fato de que os hepatócitos foram as células

escolhidas para a realização das análises metabólicas deste trabalho. Além disso, foram feitas análises para dosagem da atividade enzimática de alanina aminotransferase (ALT), um forte indicativo de lesão hepática (KARMEN; WROBLEWSKI; LADUE, [s.d.]). Assim, foi visto que as concentrações de ALT (U/L) no soro dos animais que receberam LPS aumentaram em relação aos animais do grupo controle (**Figura 2. D**), confirmando que o LPS é sentido pelos hepatócitos, podendo influenciar no metabolismo hepático. Entretanto, o aumento visto não foi equivalente àquele detectado em trabalhos nos quais é gerado uma necrose hepática (ALVARENGA et al., 2018; DE ARAUJO et al., 2018), o que reafirma a ausência de necrose observada por histologia e aprova a utilização desse modelo de inflamação para avaliação da interação imune-metabólica hepática via análise dos hepatócitos.

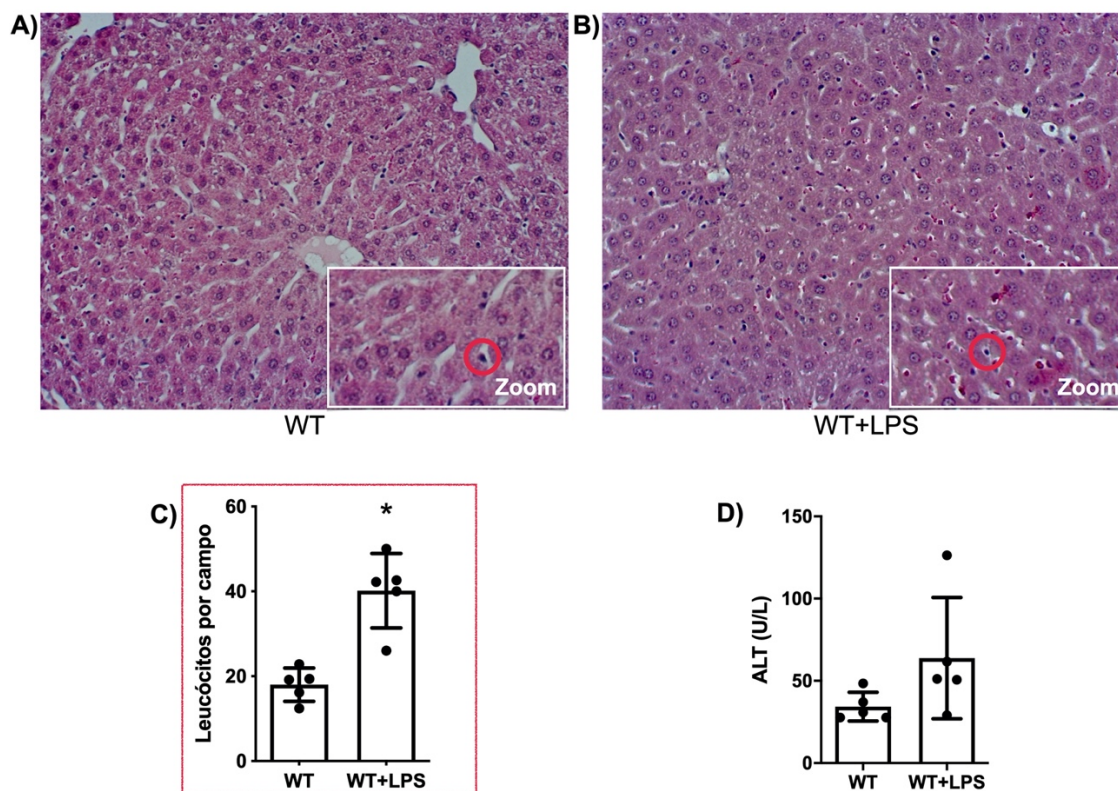


Figura 2: Resposta parenquimal hepática ao LPS. (B)(A) Histologia hepática após 24 horas de insulto por LPS e seu respectivo grupo controle (1mg/kg LPS, i.v – objetiva 20X). **(C)** Quantificação dos núcleos de leucócitos (corados por hematoxilina – circulado nas histologias) presentes nas histologias hepáticas. **(D)** Análise da quantidade de ALT

presente no soro dos camundongos após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

5.2 A inflamação por LPS gera uma redução da expressão de genes metabólicos lipídicos hepáticos

Após padronização do insulto inflamatório e certificação da integridade do parênquima hepático após esse insulto, analisamos qual o efeito deste nas principais vias metabólicas hepáticas. Para isso, após 24 horas de insulto por LPS, os hepatócitos de animais WT foram isolados e os genes-chave das principais vias metabólicas hepáticas foram analisados por RT-qPCR em tempo real: Metabolismo de Glicose, Metabolismo de Lipídios, Metabolismo de Xenobióticos e Metabolismo de Ferro.

Como resultado desse experimento, vimos que apenas um tipo de metabolismo analisado teve a expressão da maioria dos seus genes alterada: o Metabolismo de Lipídios (β -oxidação e Biossíntese de Ácidos Graxo). A alteração vista foi a redução da expressão dos genes-chave dessas vias (**Figura 3**).

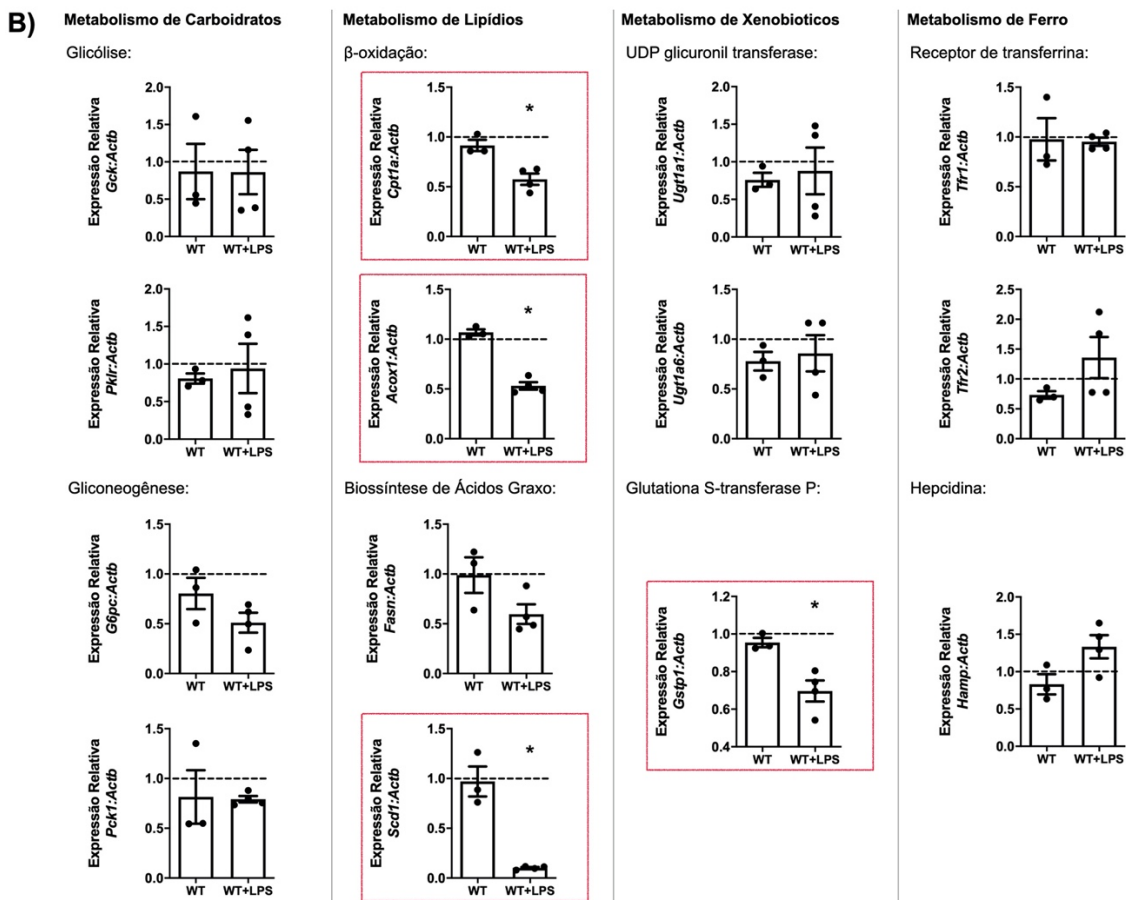
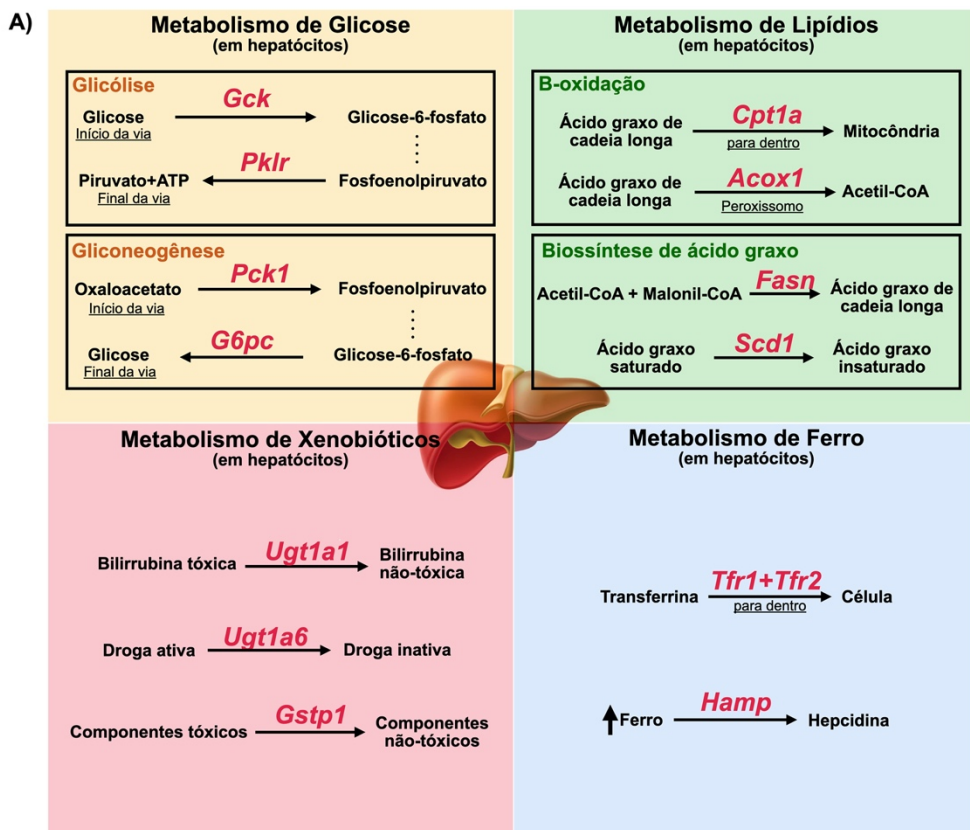
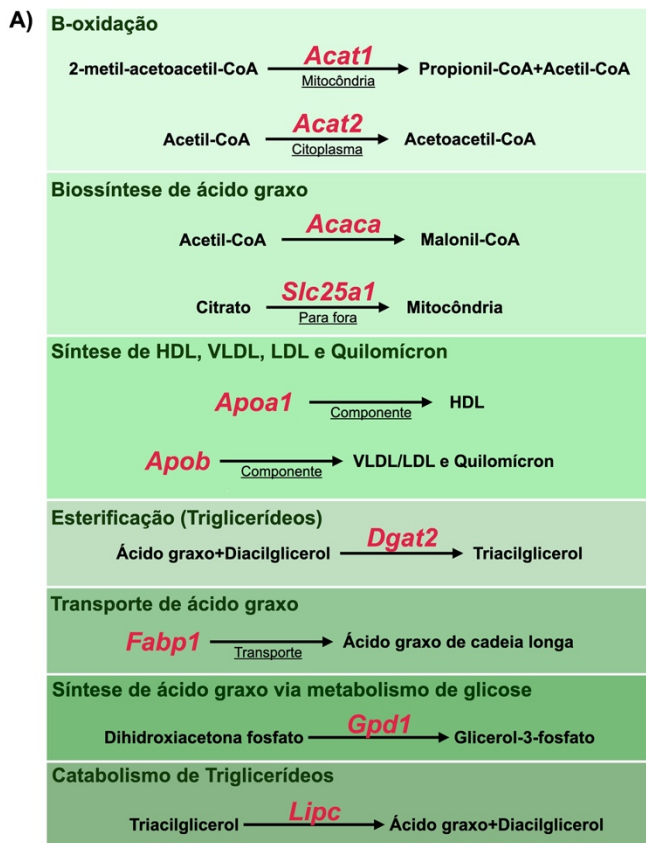


Figura 3: Resposta metabólica hepática ao LPS. (A) Atuação, em suas respectivas vias, dos genes-chaves selecionados nesse experimento (em vermelho). **(B)** Análise da expressão gênica de genes-chave que compõem diferentes vias metabólicas hepáticas após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

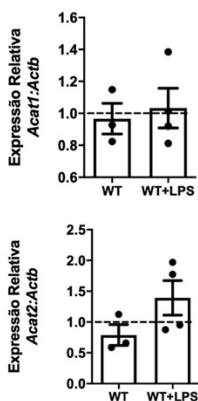
Ainda, com o intuito de investigar melhor a via metabólica de lipídios, já que esta foi a mais influenciada pelo insulto inflamatório gerado, procuramos analisar mais genes-chave dessa via que não foram previamente analisados. Os genes escolhidos são pertencentes da: β -oxidação, Biossíntese de Ácidos Graxo, Síntese de HDL, Síntese de VLDL/LDL e Quilomícron, Esterificação (Triglicerídeos), Proteína transportadora de Ácidos Graxo, Síntese de Ácidos Graxo via Metabolismo de Glicose e Catabolismo de Triglicerídeos.

Mais uma vez, foi vista uma alteração na expressão de alguns desses genes, alteração essa que se caracteriza também pela redução da expressão destes. Os genes que sofreram dessa alteração foram o gene da Lipase Hepática e o gene Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase (**Figura 4**).

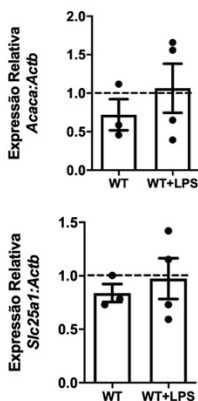


B) Metabolismo de Lipídios

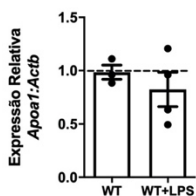
β-oxidação:



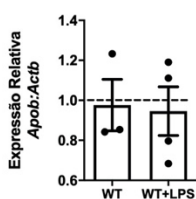
Biossíntese de Ácidos Graxo:



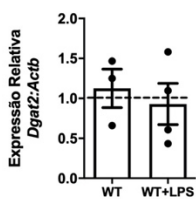
Síntese de HDL:



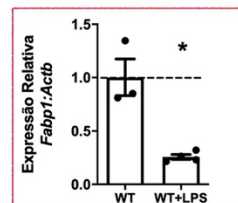
Síntese de VLDL/LDL e Quilomícron:



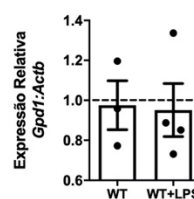
Esterificação (Triglicerídeos):



Proteína Transportadora de Ácidos Graxo:



Síntese de Ácidos Graxo via Metabolismo de Glicose:



Catabolismo de Triglicerídeos:

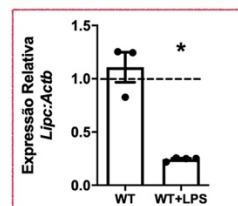


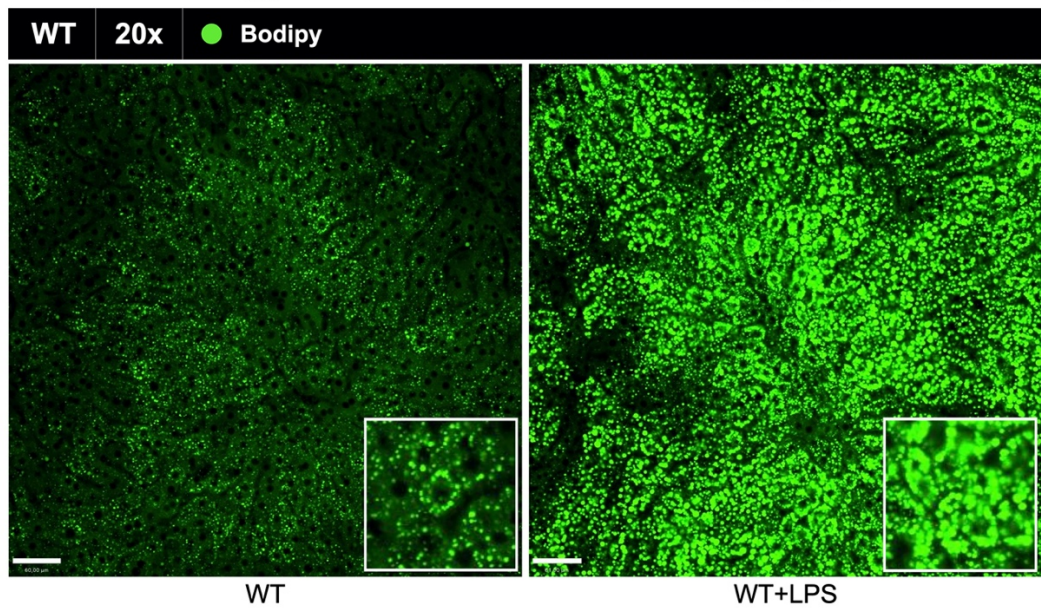
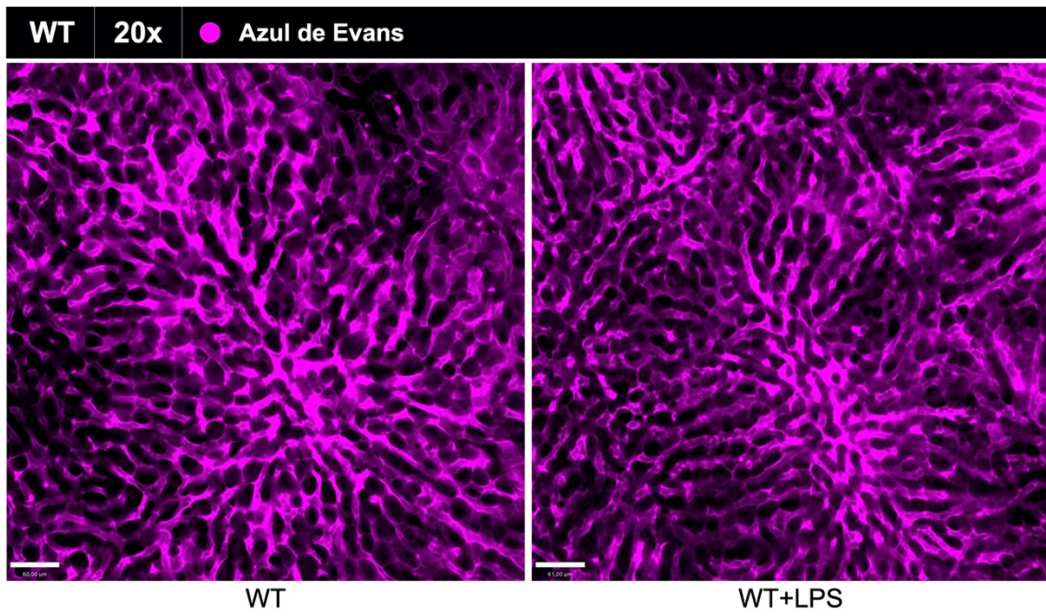
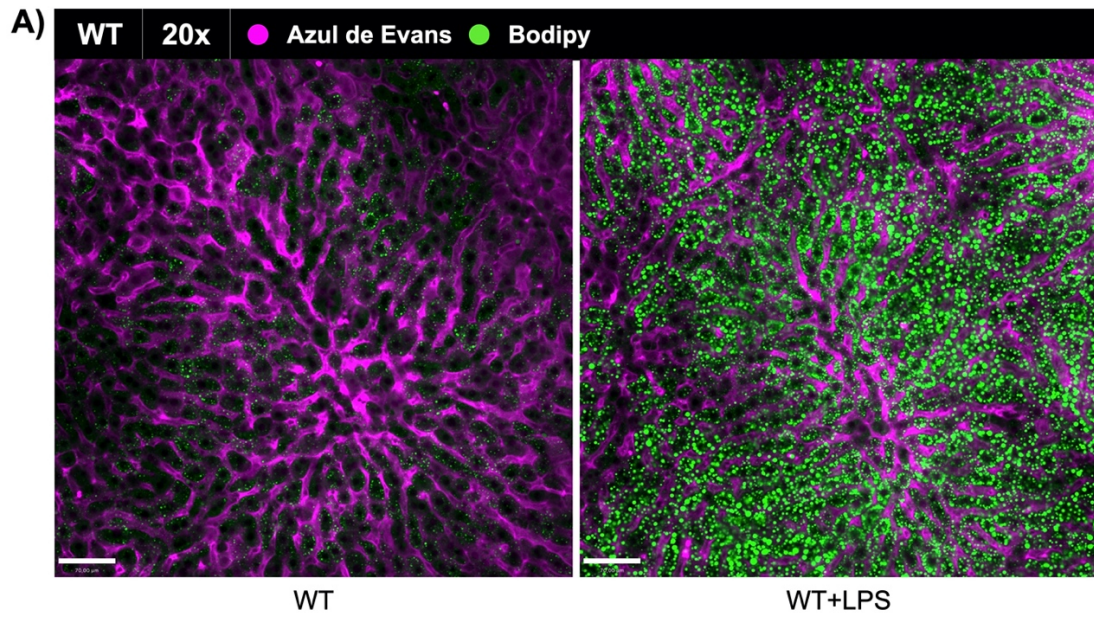
Figura 4: Resposta metabólica lipídica hepática ao LPS. (A) Atuação, em suas respectivas vias, dos genes-chaves selecionados nesse experimento (em vermelho). **(B)** Análise da expressão gênica de genes-chave que compõem a via metabólica lipídica hepática após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

5.3 O insulto por LPS gera um acúmulo lipídico hepático

Tendo em vista a alteração metabólica nos hepatócitos gerada após 24 horas de insulto por LPS, investigamos se mais alguma outra alteração relacionada poderia ser detectada no microambiente hepático, e, para isso, partimos para a visualização deste por Microscopia Intravital.

Para isso, camundongos WT receberam uma dose endovenosa do corante Azul de Evans para marcação do fluxo sanguíneo e delimitação dos sinusóides hepáticos, e foram laparatomizados para retirada do fígado. Sabendo previamente que a alteração metabólica hepática detectada após 24 horas de insulto por LPS reside na via de Metabolismo de Lipídios, de forma *ex vivo*, foi depositado no fígado a solução de Bodipy para que assim fosse possível a visualização de gotículas lipídicas no fígado (caso elas estivessem presentes).

Após esse processo, o fígado dos camundongos foi avaliado por Microscopia Intravital e foi possível visualizar um acúmulo lipídico no fígado após 24 horas de insulto por LPS, aumento esse não só da área compreendida pelas gotículas lipídicas, mas também da quantidade destas no parênquima hepático **(Figura 5. A,B,C)**.



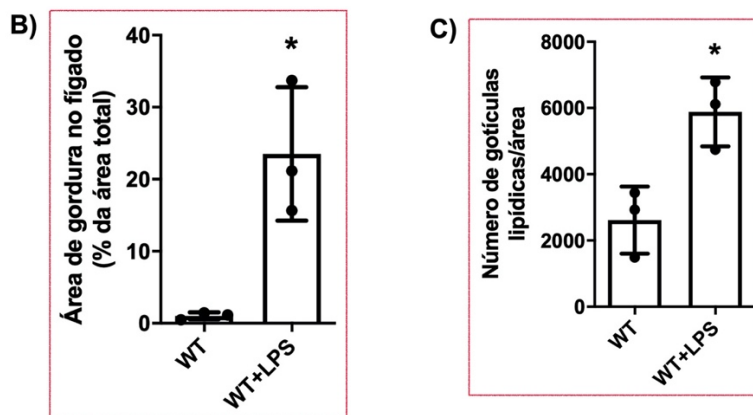


Figura 5: O insulto por LPS gera um acúmulo lipídico hepático. (A) MIV evidenciando o acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos (em verde, corante fluorescente, Bodipy), e sinusóides hepáticos (em magenta, corante fluorescente, Azul de Evans) após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v – Objetiva de 20X). **(B)** Quantificação da área compreendida pelas gotículas lipídicas nas imagens tiradas por MIV. **(C)** Quantificação do número de gotículas lipídicas nas áreas visualizadas por MIV. Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

5.4 O insulto por LPS gera um quadro de hipertrigliceridemia hepática

Ao detectarmos o acúmulo de gotículas lipídicas no fígado após 24 horas de insulto por LPS, procuramos saber um pouco mais sobre a composição dessas gotículas. Dessa forma, realizamos um ensaio para dosagem de triglicerídeos e colesterol hepáticos.

Para isso, após 24 horas de insulto por LPS, os animais tiveram 200mg do fígado coletado, processado pelo método de Folch para extração de lipídios e a amostra resultante foi direcionada para dosagem de triglicerídeos e colesterol com auxílio de teste enzimático da Bioclin. Como resultado desse teste, obtivemos que, mesmo tendo em vista o acúmulo lipídico hepático visualizado anteriormente, o peso lipídico hepático total e o colesterol hepático não se alteram quantitativamente nos camundongos após o insulto inflamatório gerado **(Figura 6. A,C)**. Em compensação, após esse insulto, a quantidade de triglicerídeos hepáticos aumentou bastante em comparação com os camundongos do grupo controle, o que, após quantificação, caracterizou um

quadro de hipertrigliceridemia hepática após 24 horas de insulto por LPS (**Figura 6. B**).

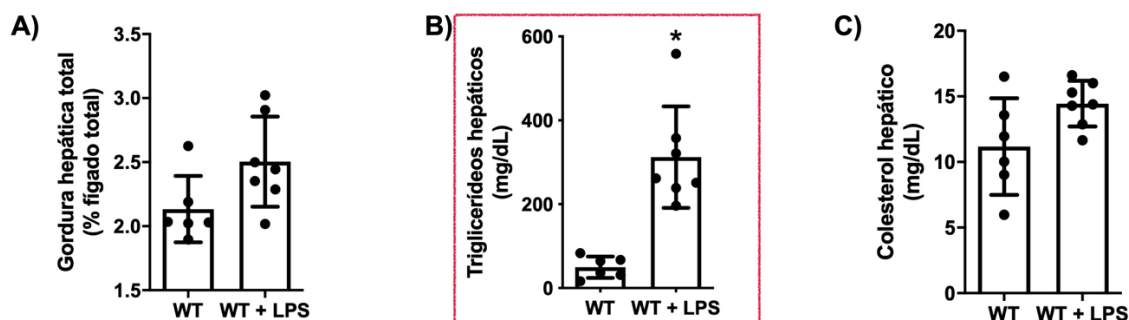


Figura 6: O LPS gera um quadro de hipertrigliceridemia hepática. (A) Quantificação da gordura hepática total após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). **(B)** Quantificação dos triglicerídeos hepáticos após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). **(C)** Quantificação do colesterol hepático após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ se comparado com o controle (WT).

5.5 A alteração metabólica hepática sob influência de LPS é coordenada pelo parênquima hepático

Tendo em vista todas as alterações hepáticas citadas acima, e considerando o contexto no qual o sistema imune e o metabolismo hepáticos atuam em conjunto, decidimos então avaliar a atuação de cada um desses componentes individualmente no fenótipo metabólico descrito acima.

Para isso, executamos o protocolo de quimerização de camundongos e os seguintes grupos formados foram:

Camundongo doador (medula)	Camundongo receptor
WT	WT
TLR4 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}
WT	TLR4 ^{-/-}
TLR4 ^{-/-}	WT

Tabela 2: Grupos de camundongos quimerizados. Tabela evidenciando quais genótipos de camundongos foram utilizados para a formação dos grupos de camundongos quimerizados presentes nesse trabalho.

Portanto, por meio desse protocolo de quimerização, obtivemos um grupo de camundongos quimeras no qual somente as células imunes hepáticas eram sensíveis ao LPS (WT>TLR4^{-/-}) e um grupo de camundongos quimeras no qual somente o parênquima hepático era sensível ao LPS (TLR4^{-/-}>WT). Esses grupos representam individualmente a atividade de cada compartimento hepático em resposta ao insulto padronizado neste trabalho.

Sendo assim, após serem formados, esses grupos passaram por uma injeção endovenosa de LPS e, após 24 horas, seus hepatócitos foram isolados para avaliação por RT-qPCR em tempo real da expressão de genes-chave do metabolismo hepático. Como já sabíamos do fenótipo metabólico descrito anteriormente em camundongos WT, selecionamos novamente genes-chave da via metabólica lipídica hepática, sendo estes os genes de β -oxidação de Lipídios e de Biossíntese de Ácidos Graxo.

Como resultado desse experimento, vimos que apenas o grupo TLR4^{-/-}>WT teve a expressão dos seu genes-chave alterada após 24 horas de insulto por LPS, alteração que foi a mesma vista anteriormente nos animais WT: a redução da expressão gênica dos genes-chave das vias de β -oxidação de Lipídios e de Biossíntese de Ácidos Graxos (**Figura 7. A,B**).

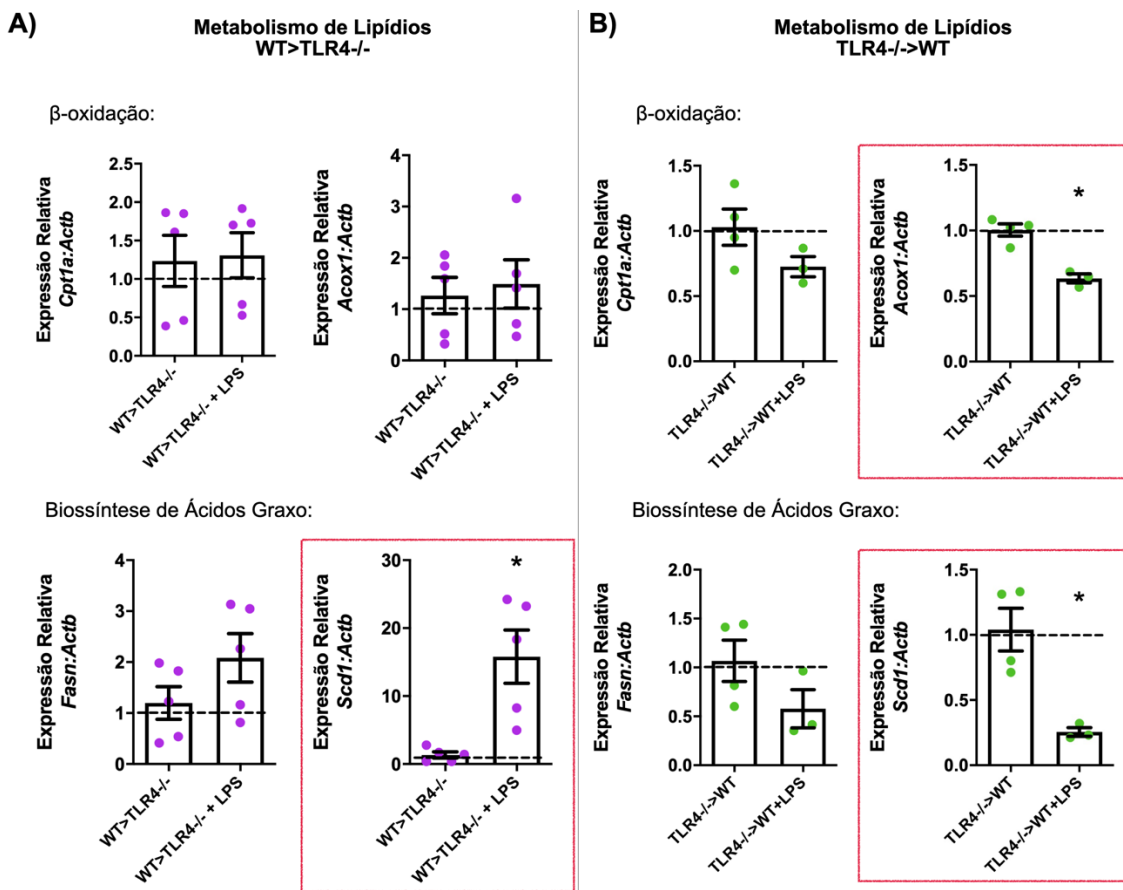


Figura 7: Resposta metabólica lipídica hepática dos camundongos quimerizados. (A) Análise da expressão gênica lipídica hepática dos camundongos WT>TLR4^{-/-} após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). (B) Análise da expressão gênica lipídica hepática dos camundongos TLR4^{-/-}>WT após 24 horas de insulto por LPS (1mg/kg LPS, i.v). Resultados exibidos como média ± EPM. *p<0,05 se comparado com o controle (WT).

6.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

No âmbito de doenças crônicas metabólicas hepáticas, como durante as doenças hepática gordurosa não alcoólica e hepática gordurosa alcoólica, o quadro que caracteriza essas doenças e as define separadamente ainda está sendo elucidado na literatura (LEE et al., 2021). Nessas doenças, inclusive, é descrita a presença de uma esteatose hepática que, em conjunto com outras desordens metabólicas, podem levar o fígado a um quadro de cirrose com consequente falência desse órgão (DINIZ et al., 2020; FRIEDMAN et al., 2018; LAKSHMAN et al., 2015). Sendo assim, o fenômeno de se acumular lipídios no fígado já foi, e ainda está sendo estudado como consequência de uma disfunção metabólica hepática, que também tem como um dos desfechos a geração de um processo inflamatório no tecido. Porém, como destacado anteriormente, esta é uma situação que está sendo avaliada durante um distúrbio do nosso metabolismo.

Uma outra faceta dessa interação imune-metabólica hepática é um pouco menos explorada pela sua não previsibilidade: a inter-relação imune-metabólica hepática durante uma patogenia. O contexto no qual vemos esse tipo de estudo está presente principalmente em estudos sobre infecções causadas pelo vírus da hepatite C, no qual a presença de uma esteatose hepática, advinda do próprio quadro infeccioso, influencia diretamente na progressão da fibrose hepática e no desfecho funcional desse órgão (POWELL; JONSSON; CLOUSTON, 2005).

Entretanto, sabendo que o fígado é um órgão extremamente vascularizado e que se localiza na interface entre o trato gastrointestinal e a circulação sistêmica (NAKAGAKI et al., 2018), infere-se um aporte constante de moléculas potencialmente patogênicas para dentro desse órgão. Uma delas é o

LPS, que pode estar presente no fígado tanto em condições homeostáticas quanto durante uma endotoxemia (CANDELLI et al., 2021; HAN, 2002).

Portanto, a partir disso, e sabendo da existência dos compartimentos imune e metabólico hepáticos (NAKAGAKI et al., 2018), o presente estudo contribui para novas descobertas no campo descrito acima: o estudo das consequências metabólicas da interação entre as facetas imune-metabólicas hepáticas durante uma endotoxemia.

Como primeiro ponto a ser discutido, temos o tempo escolhido para a análise dos dados. O tempo de 24 horas após insulto por LPS foi assim escolhido pela curiosidade em entender melhor as consequências geradas pela interação entre os compartimentos hepáticos, e não a atuação de um ou outro no tecido durante o insulto. Essas consequências, portanto, só seriam evidentes após o tempo considerado como pico da inflamação por LPS, que, de acordo com a literatura, ocorre no tempo de 12 horas após esse insulto (TAKAGI et al., 2007). Sendo assim, selecionamos o tempo de 24 horas após insulto por LPS por este nos mostrar, após a padronização do modelo desse trabalho, que o fígado ainda apresenta sinais inflamatórios clássicos derivados do insulto, como a presença de MPO e leucócitos no tecido e alta expressão gênica de *Tnf*, porém em intensidades bem menores do que as vistas em estudos que avaliam o pico da inflamação hepática gerada pelo LPS (MENEZES et al., 2009b; TAKAGI et al., 2007). E, ainda, mesmo com sinais de inflamação que representam a atuação do sistema imune nesse contexto, o fígado, após 24 horas de insulto por LPS, também apresenta o seu parênquima íntegro, como foi visto por histologia e pelo ensaio de ALT, o que nos confirmou que esse é o tempo pós-pico de inflamação

por LPS mais assertivo para as análises metabólicas hepáticas que seriam feitas a seguir.

Portanto, a primeira análise a ser feita foi a do metabolismo hepático após 24 horas de insulto por LPS, já que esta é a principal função do fígado no nosso organismo e o perfil inflamatório gerado pelo LPS nesse período já é bem descrito na literatura (FANG et al., 2018), sendo assim confirmado e complementado no presente estudo a partir das análises histológicas e de expressão gênica feitas durante a padronização do modelo. Tendo feito isso, com base na análise de alguns genes-chave metabólicos hepáticos, encontramos uma alteração no metabolismo de lipídios desse órgão. Os genes alterados foram: *Cpt1a* e *Acox1*, que estão presentes na via de β -oxidação, mais precisamente no transporte de ácidos graxo para dentro da mitocôndria celular e no catabolismo de ácidos graxo de cadeia longa respectivamente; e o gene *Scd1*, que está presente na via de Biossíntese de Ácidos Graxo, mais precisamente na síntese de ácidos graxo insaturados. Essa alteração encontrada diz respeito a redução da expressão desses genes metabólicos, o que nos chamou a atenção por ser algo não descrito anteriormente na literatura, e que deu início à descrição do fenótipo encontrado neste trabalho, já que foi neste ponto que nos questionamos quanto ao fato do metabolismo lipídico hepático, tanto anabólico quanto catabólico, estar ligado ao processo inflamatório gerado pela endotoxemia.

A partir disso, então, procuramos ir além na avaliação dessa alteração de expressão gênica, buscando dessa vez avaliar a expressão de mais genes da via metabólica lipídica hepática, para que assim pudéssemos ter uma conclusão mais global quanto ao fenômeno visto inicialmente. Logo, após analisar a

expressão de mais genes metabólicos lipídicos hepáticos, pudemos observar mais uma vez uma alteração na expressão de dois deles: o gene *Fabp1*, responsável pela síntese de proteínas ligantes hepáticas, que realizam o transporte de lipídios no fígado; e o gene *Lipc*, responsável pela síntese da lipase hepática, proteína encontrada somente no fígado, que é responsável pelo catabolismo dos triglicerídeos que ali chegam. E, novamente, a alteração vista foi a de redução na expressão desses genes.

Portanto, esses dados iniciais em conjunto nos mostraram o seguinte cenário: o fígado, após endotoxemia, apresenta-se com a capacidade de processar lipídeos reduzida, tanto dizendo respeito ao seu transporte intra-hepático, quanto ao seu catabolismo e anabolismo por meio dos hepatócitos; e, ainda, o fígado aparenta também não processar os triglicerídeos que chegam ali pela corrente sanguínea, ou seja, possivelmente, os lipídios que ali chegam ao longo do insulto por LPS permanecerão estocados dentro do órgão. Por isso, frente a essa conclusão inicial detectada após análises de expressão gênica hepática, decidimos investigar como o fígado apresentava aquele genótipo de forma fenotípica. Para isso, partimos para as análises do fígado por meio de Microscopia Intravital.

Durante a realização da MIV dos animais WT após 24 horas de insulto por LPS, e tendo em mente as conclusões anteriormente tomadas, decidimos utilizar o corante de lipídios chamado Bodipy. Dessa forma, caso a alteração gênica lipídica vista se desdobrasse em uma alteração fenotípica, seríamos capazes de detectar por meio desse corante, já que este se liga aos lipídios neutros (lipídios de armazenamento de energia), e não aos lipídios polares (lipídios componentes de membrana) (ANTUNES et al., 2021; ATHENSTAEDT; DAUM, 2006). E foi

dessa forma que observamos mais um dado inédito: há um acúmulo lipídico significativo após 24 horas de insulto por LPS, detectado a partir da visualização dessa gordura intra-hepática via bodipy.

Ainda, a fim de caracterizar com mais detalhes esse fenótipo observado, dosamos a quantidade de triglicerídeos e colesterol hepáticos após 24 horas de insulto por LPS, e vimos que o fígado passa por uma alteração lipídica qualitativa, e não quantitativa, de lipídios após esse insulto. Isso foi representado pela não alteração no peso da gordura total desse órgão e na quantidade de colesterol intra-hepático, frente a uma alteração na sua composição lipídica caracterizada pelo aumento da quantidade de triglicerídeos no tecido; ou seja, o fígado apresenta um quadro de hipertrigliceridemia hepática após 24 horas de insulto por LPS.

Toda a caracterização fenotípica descrita anteriormente, tanto por MIV quanto por ensaios enzimáticos, se encaixa muito bem com os dados vistos por meio das análises de expressão gênica metabólica hepática. A redução vista na expressão de genes responsáveis pelo transporte e catabolismo lipídico hepático justifica o acúmulo lipídico visto por MIV após endotoxemia, lipídios esses que provavelmente estão vindo de fora do órgão, já que a via anabólica lipídica hepática também apresenta redução em sua atividade metabólica. Ainda, levando em consideração o que foi visto durante as dosagens enzimáticas hepáticas, um dos tipos de lipídios que se acumulam no fígado após 24 horas de insulto por LPS são triglicerídeos, o que também nos remete aos dados de expressão gênica hepática analisados, pois nestes resultados foi visto uma redução na expressão gênica hepática do gene *Lipc*, responsável pela proteína que quebra os triglicerídeos que chegam via circulação sistêmica no fígado; ou

seja, a redução na expressão desse gene implica na passagem dessa molécula para o ambiente intra-hepático sem que haja um processamento desta, gerando assim o seu acúmulo dentro do tecido.

A pergunta que nos vem à cabeça após a aquisição de todos esses dados é: Por que há uma alteração lipídica hepática durante endotoxemia? Qual é a função da gordura que ali se acumula? Já foi descrito na literatura sobre a associação entre o metabolismo lipídico sistêmico e a inflamação existente durante endotoxemia. Basicamente, a sinalização via citocinas pró-inflamatórias, especialmente *Tnf*, intensificam a atividade das lipases nos tecidos adiposos e, como consequência disso, há uma liberação exacerbada de triglicerídeos na corrente sanguínea, que têm como um dos seus destinos o fígado (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 1979; WANNEMACHER; PACE; NEUFELD, 1982). Contudo, como se dá o processamento dessa gordura que chega no fígado, se esta é composta por mais de um tipo de lipídio, e qual a sua função naquele tecido segue ainda sob investigação na literatura. Existem análises lipídicas durante um processo inflamatório no qual foi descoberta a participação destas moléculas na fase pró-resolutiva da inflamação, auxiliando na limpeza e reconstrução do tecido, porém esses estudos dizem respeito aos lipídios como os eicosanoides, resolvinas e protectinas, e não se referem a uma participação clara de triglicerídeos nesse processo (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

Outro aspecto também descrito na literatura é o acúmulo de triglicerídeos nas células de Kupffer após ativação do TLR4, acúmulo que se apresenta como necessário para a eficácia da resposta imune gerada por essa célula durante um processo inflamatório (FEINGOLD et al., 2012). Diante dessa informação, portanto, nos questionamos sobre o papel de cada um dos compartimentos

hepáticos, imune e metabólico, no fenótipo lipídico descrito neste trabalho, já que o acúmulo de lipídios visualizado poderia estar sendo orquestrado pelas células de Kupffer durante o insulto por LPS. Logo, pensando na individualização dos dois compartimentos hepáticos, executamos um modelo de quimerização entre camundongos WT e TLR4^{-/-}, no qual um grupo destes teria somente as suas células imunes hepáticas sensíveis ao LPS (WT>TLR4^{-/-}) e o outro teria somente os seus hepatócitos sensíveis ao LPS (TLR4^{-/-}>WT).

Após execução do protocolo de quimerização entre os camundongos e formação dos dois grupos quimerizados descritos acima, realizamos as mesmas análises de expressão gênica metabólica lipídica feitas em camundongos WT no início deste trabalho, e dessa forma obtivemos um resultado surpreendente: apenas o grupo quimera TLR4^{-/-}>WT apresentou o genótipo visto anteriormente em animais WT, caracterizado pela redução de genes-chave do metabolismo lipídico hepático (*Acox1* e *Scd1*); ou seja, a célula que é responsável, sozinha, por todas essas alterações visualizadas após o insulto por LPS é o hepatócito.

Por sua vez, o grupo WT>TLR4^{-/-}, além de não apresentar uma redução na expressão de seus genes metabólicos lipídicos hepáticos, apresentou um aumento de expressão significativo do gene *Scd1* após 24 horas de insulto por LPS. Este fato também nos chamou bastante atenção, pois foi algo não visto anteriormente por nós em nossos experimentos e não descrito na literatura até o momento. Portanto, ao pensarmos mais além, esse dado pode ser mais um indício da importância da gordura durante a inflamação. Isso, pois, os camundongos WT>TLR4^{-/-}, ao não terem mais em ação a célula responsável pelo recrutamento de lipídios para dentro do fígado (os hepatócitos desse grupo são TLR4^{-/-}) durante o processo inflamatório gerado pelo LPS, resolvem esse

problema da maneira que podem, ou seja, sinalizando por outras vias para que os hepatócitos sintetizem mais lipídios no fígado. Sendo assim, os lipídios são imprescindíveis para a nossa resposta imune após um insulto por LPS? Para responder isso, mais estudos precisam ser feitos para o melhor esclarecimento dessa hipótese.

Desta forma, sabemos que muitas perguntas geradas por meio desses resultados ainda precisam ser avaliadas e respondidas, como qual é a função, origem e durabilidade das alterações observadas. Contudo, o presente trabalho propõe bases sólidas e abre luzes à biologia hepática, trazendo à tona não somente a importância da interação imune-metabólica dentro do fígado, mas também anunciando a grande importância que os hepatócitos, até então mais conhecidos por suas funções exclusivamente metabólicas, têm como células essenciais para a biologia hepática durante uma resposta imunológica no nosso organismo.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, D. M. et al. Paradoxical role of matrix metalloproteinases in liver injury and regeneration after sterile acute hepatic failure. **Cells**, v. 7, n. 12, 1 dez. 2018.

ANTUNES, M. M. et al. IL-33 signalling in liver immune cells enhances drug-induced liver injury and inflammation. **Inflammation Research**, v. 67, n. 1, p. 77–88, 1 jan. 2018.

ANTUNES, M. M. et al. Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections. **Nutrition**, v. 81, 1 jan. 2021.

ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. **The life cycle of neutral lipids: Synthesis, storage and degradation. Cellular and Molecular Life Sciences**, jun. 2006.

BAIKIE, A. G. " **Liver Function** ". Third Edit ed. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1958. v. 272

BOGDANOS, D. P.; GAO, B.; GERSHWIN, M. E. Liver immunology. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 567–598, 2013.

CANDELLI, M. et al. **Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases. International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 2 jun. 2021.

CARSWELL, E. A. et al. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage) Zymosan (from Saccharomyces cerviiae) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W. [s.l: s.n.]**

CRISPE, I. N. Hepatocytes as Immunological Agents. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 1, p. 17–21, 1 jan. 2016.

CZERKIES, M.; KWIATKOWSKA, K.; PLYTYCZ, B. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: Focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–23, 2014.

DANNER, R. L. et al. **Endotoxemia in Human Septic Shock***. [s.l: s.n.]

DE ARAUJO, A. M. et al. Liver immune cells release type 1 interferon due to DNA sensing and amplify liver injury from acetaminophen overdose. **Cells**, v. 7, n. 8, 1 ago. 2018.

DINIZ, A. B. et al. Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD. **JHEP Reports**, v. 2, n. 4, 1 ago. 2020.

FANG, H. et al. The severity of LPS induced inflammatory injury is negatively associated with the functional liver mass after LPS injection in rat model 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 15, n. 1, 15 nov. 2018.

FEINGOLD, K. R. et al. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 829–839, out. 2012.

FRIEDMAN, S. L. et al. **Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies**. **Nature Medicine** Nature Publishing Group, , 1 jul. 2018.

GREENWAY, C. V; STARK, R. D. **Hepatic Vascular BedREVIEWS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.physiology.org/journal/physrev>.

HAN, D.-W. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 6, 2002.

JIA, L. et al. Hepatocyte toll-like receptor 4 deficiency protects against alcohol-induced fatty liver disease. **Molecular Metabolism**, v. 14, p. 121–129, 1 ago. 2018.

KARMEN, A.; WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. **TRANSAMINASE ACTIVITY IN HUMAN BLOOD**. [s.l: s.n.].

LAKSHMAN, R. et al. **Synergy between NAFLD and AFLD and potential biomarkers**. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology** Elsevier Masson s.r.l., , 1 set. 2015.

LEE, H. et al. Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease and Incident Cardiovascular Disease Risk: A Nationwide Cohort Study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 10, p. 2138- 2147.e10, 1 out. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARINA A. DOBROVOLSKAIA; STEFANIE N. VOGEL. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, 2002.

MARQUES, P. E. et al. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, v. 10, n. 2, p. 258–268, 1 jan. 2015.

MENEZES, G. B. et al. Selective Down-Regulation of Neutrophil Mac-1 in Endotoxemic Hepatic Microcirculation via IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7557–7568, 2009a.

MENEZES, G. B. et al. Selective Down-Regulation of Neutrophil Mac-1 in Endotoxemic Hepatic Microcirculation via IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7557–7568, 1 dez. 2009b.

NAITO, M. et al. **Differentiation and function of Kupffer cells. Medical Electron Microscopy**, mar. 2004.

NAKAGAKI, B. N. et al. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 1 dez. 2018.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, p. e66-9, 2013.

POWELL, E. E.; JONSSON, J. R.; CLOUSTON, A. D. **Steatosis: Co-factor in other liver diseases. Hepatology**, jul. 2005.

SAKAGUCHI, O.; SAKAGUCHI, S. **Alterations of Lipid Metabolism in Mice Injected with Endotoxin** **Microbiol. Immunol.** [s.l: s.n.].

SASSE, D.; SPORNITZ, U.; MALY, P. **LiverArchitecture**. 1992.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. **Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. Nature Reviews Immunology**, maio 2008.

TAKAGI, K. et al. Interleukin-1 is not essential for expression of inducible NOS in hepatocytes induced by lipopolysaccharide in vivo. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 433–441, jun. 2007.

TOSHCHAKOV, V. et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. **Nature Immunology**, v. 3, n. 4, p. 392–398, 2002.

TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. triantafilou2002. 2002.

VALENTINE, R. J. et al. Imoxin attenuates LPS-induced inflammation and MuRF1 expression in mouse skeletal muscle. **Physiological Reports**, v. 6, n. 23, 1 dez. 2018.

WANNEMACHER, R. W.; PACE, J. G.; NEUFELD, H. A. **Lipid metabolism during infection MAR 16 1982-and endotoxemia.** [s.l: s.n.].

XUE, L. et al. Probiotics may delay the progression of nonalcoholic fatty liver disease by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal endotoxemia. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–13, 2017.

ZHOU, Z.; XU, M.-J.; GAO, B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. 2016a.

ZHOU, Z.; XU, M.-J.; GAO, B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. 2016b.