

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde

LÍGIA FERNANDA FERRAZ

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DECORRENTE DA
ISQUEMIA/REPERFUSÃO HEPÁTICA SOBRE O TECIDO
ADIPOSO VISCERAL DE CAMUNDONGOS**

Bragança Paulista

2018

LÍGIA FERNANDA FERRAZ R.A. - 001201606394

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA DECORRENTE DA
ISQUEMIA/REPERFUSÃO HEPÁTICA SOBRE O TECIDO
ADIPOSO VISCERAL DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Gambero

Bragança Paulista

2018

WI Ferraz, Lígia Fernanda

F433e Efeito da inflamação sistêmica decorrente da
isquemia/reperfusão hepática sobre o tecido adiposo visceral
de camundongos / Lígia Fernanda Ferraz. - Bragança
Paulista, 2018.

44 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco - USF

Ficha catalográfica elaborada por: Luiz Felipe Galeffi / CRB 080/2018

FERRAZ, Lígia Fernanda. "Efeito da inflamação sistêmica decorrente da isquemia/reperfusão hepática sobre o tecido adiposo visceral de camundongos". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 30 de Agosto de 2018 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Alessandra Gambero

Profa. Dra. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco

Érica Martins Ferreira Gotardo

Profa. Dra. Érica/Martins Ferreira Gotardo
Universidade Estadual de Campinas

Raquel de Cássia dos Santos

Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho aos meus pais,
Sonia e Darci Ferraz, pois são
os alicerces da minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente a minha orientadora Alessandra Gambero pela orientação e por acreditado, muitas vezes mais do que eu, na realização deste trabalho. Agradeço também a Cíntia Caria pela amizade, paciência, ideias e discussões que foram fundamentais para construção do trabalho.

A professora Raquel de Cássia pelo ensinamento prático na execução do protocolo cirúrgico e pelas informações no decorrer do trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2016/17640-0) e a Universidade São Francisco – Campus Bragança Paulista -SP.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, acreditaram e compreenderem meus momentos de afastamento. E ao meu irmão Luciano e sobrinhos Gabriel e Maria Clara que mesmo com a distância sempre estiveram ao meu lado.

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que eles pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa
(Albert Einstein).

RESUMO

A isquemia se desenvolve quando ocorre uma obstrução de vasos sanguíneos e a reperfusão com o subsequente restabelecimento do fluxo. Durante a isquemia hepática, ocorre a produção excessiva de radicais livres que ativam células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) iniciando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com a reperfusão, neutrófilos e macrófagos são adicionalmente recrutados para o fígado levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que alcançam a circulação sistêmica desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica. Embora seja bem estabelecido que o tecido adiposo (TA) se inflama e contribui para o estabelecimento de uma inflamação sistêmica crônica e de baixo grau durante a obesidade, pouco se sabe sobre os efeitos de um quadro de inflamação sistêmica sobre o TA. Assim, esta dissertação teve como objetivo estudar os efeitos de uma inflamação sistêmica decorrente de injúria por isquemia/reperfusão hepática (IRH) sobre o TA visceral em camundongos. A presença de inflamação sistêmica foi caracterizada pelos níveis elevados de IL-1 β séricos após 30 minutos de isquemia e 6 horas de reperfusão, coincidentes com a presença de injúria hepática (infiltrado de neutrófilos no fígado, níveis séricos aumentados de AST/ALT). Nestas condições, a análise da fração estromal do TA por citometria indicou um número maior de neutrófilos, monócitos, linfócitos T e B. Analisamos também a expressão de um painel de genes por PCR Array no TA epididimal que codificam citocinas, quimiocinas e seus receptores e estes apresentaram-se superexpressos. Análises por RT-PCR confirmaram que ocorre superexpressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-6, leptina e a proteína de choque térmico 70 (Hsp70). A IRH não modifica a permeabilidade intestinal. Nossos resultados mostram que a inflamação sistêmica desencadeada pela IRH promove alterações no TA visceral levando a infiltração de células inflamatórias e ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, sugerindo que o TA também é um órgão remoto afetado pela síndrome inflamatória sistêmica ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos.

Palavras – chave: isquemia, reperfusão, inflamação, tecido adiposo.

ABSTRACT

Ischemia develops when an obstruction of blood vessels occur and reperfusion occurs with subsequent restoration of flow. During hepatic ischemia, excessive production of free radicals activates Kupffer cells (liver-resident macrophages), which initiates the production of pro-inflammatory cytokines. During reperfusion, neutrophils and macrophages are additionally recruited into the liver leading to increased production of proinflammatory cytokines that reach the systemic circulation triggering a systemic inflammatory response. Although it is well established that adipose tissue (AT) becomes inflamed and contributes to the establishment of chronic and low-grade systemic inflammation during obesity, there is no data about the effects of a systemic inflammation upon AT. Thus, this work aims to study the effects of a systemic inflammation due to hepatic ischemia/reperfusion (HIR) injury on the visceral AT in mice. The presence of systemic inflammation was characterized by elevated levels of serum IL-1 β after 30 minutes of ischemia and 6 hours of reperfusion, coinciding with the presence of liver injury (neutrophil infiltration in the liver, elevated serum AST / ALT levels). Under these conditions, analysis of the stromal vascular fraction by cytometry indicated a higher number of neutrophils, monocytes, T and B lymphocytes in AT. We also analyzed the gene expression in epididymal AT by RT-PCR array showing that overexpression of genes occurring encode proinflammatory cytokines, chemokines and its receptors. In agreement RT-PCR demonstrate that genes as IL-1 β and IL-6, leptin, and heat shock protein 70 (Hsp70) were overexpressed in AT after HIR. We also verify that HIR does not modify intestinal permeability. Our results show that systemic inflammation triggered by HIR promotes changes in visceral AT leading to infiltration of inflammatory cells and increased expression of proinflammatory genes, suggesting that AT is also a remote organ affected by systemic inflammatory syndrome or dysfunction of multiple organs.

Keywords: ischemia, reperfusion, inflammation, adipose tissue.

Lista de Símbolos e Abreviações

AST- Aspartato aminotransferase

ALT- Alanina aminotransferase

Adipo – Adiponectina

ATP – Trifosfato de adenosina

ATM - Macrófagos residentes no tecido adiposo

CCL2 ou MCP-1- Proteína quimiotática de monócitos

cDNA – DNA complementar

CEMIB/UNICAMP - Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas

CEUA/USF - Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade São Francisco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DAMPs- Padrões moleculares associados ao dano tecidual

EPM – Erro padrão da média

Fgf21 – Fator de crescimento de fibroblasto 21

FITC-dextran – Dextrano associado a isotiocianato de fluoresceína

HSP 70 - Proteína de choque térmico 70

Hsp90ab1 – Proteína de choque térmico 90ab1

Icam1 – Molécula de adesão intercelular-1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 - Interleucina 6

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

IRH – Isquemia e reperfusão hepática

Lep – Leptina

MMPs- metaloproteinases de matrix

mRNA – RNA mensageiro

MPO - Mieloperoxidase

NKT – células natural killer

NAFLD – doença hepática gordurosa não alcoólica

PPRs - receptores de reconhecimento padrão

PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PAF - Fator ativador de plaquetas
ROS- Espécies reativas de oxigênio
RNA- Ácido ribonucleico
SVF - Fração estromal vascular
TA – Tecido adiposo
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
USF- Universidade São Francisco

Lista de Figuras

FIGURA 1. Mecanismos relacionados com a lesão de isquemia e reperfusão.....	13
FIGURA 2. Lesão inflamatória por hepática após isquemia/reperfusão (I/R).....	14
FIGURA 3. Órgãos distantes que estão envolvidos na injúria remota após a isquemia/reperfusão hepática. Modificado de: Nastos et al., 2014.....	16
FIGURA 4. Atividade da mieloperoxidase no fígado nos grupos Sham-operados e IRH após 3, 6 e 24 horas de reperfusão.....	26
FIGURA 5. Níveis séricos de ALT e AST no soro nos grupos Sham-operados e IRH após 6 horas de reperfusão.....	27
FIGURA 6. Contagem de células na fração estromal vascular no tecido adiposo epididimal após a IRH.....	28
FIGURA 7. O gráfico de dispersão compara a expressão normalizada de cada gene no array entre os dois grupos selecionados, plotando-os um contra o outro para visualizar rapidamente grandes mudanças de expressão gênica.....	30
FIGURA 8. Avaliação da expressão gênica no tecido adiposo epididimal (TAE) dos animais Sham e isquemia de 6 horas nos gráficos acima.....	31
FIGURA 9. Níveis séricos de FITC-dextran após 6 h de reperfusão.....	32
FIGURA 10. Determinação de endotoxinas por LAL (Limulus Amebocytes Lisate) após horas de reperfusão.....	32

Lista de Tabelas

TABELA 1. Marcação celular para análise por citometria do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo.....	21
TABELA 2. Sequência de primers utilizados no PCR.....	23
TABELA 3. Níveis séricos de AST (U/L) nos camundongos submetidos à IRH.....	25
TABELA 4. Níveis séricos de TNF- α (pg/mL) nos camundongos submetidos à IRH.....	26
TABELA 5. Níveis séricos de IL-1 β (pg /mL) nos camundongos submetidos à IRH.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivo Específico	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Animais.....	21
3.2. Modelo de Injúria por Isquemia/Reperusão Hepática.....	21
3.3. Eutanásia dos animais e coleta de materiais	22
3.4. Caracterização da injúria hepática (infiltrado neutrofílico, AST/ALT)	22
3.5. Caracterização da inflamação sistêmica	23
3.7. RT ² Profiler PCR Array – Quimiocinas e Receptores	24
3.8. Extração de RNA com Trizol/Preparação de cDNA/PCR quantitativo	24
3.9. Avaliação da permeabilidade intestinal	25
3.11. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Avaliação em diferentes tempos de reperusão dos níveis séricos de AST	27
4.2. Avaliação em diferentes tempos de reperusão do infiltrado de neutrófilos no fígado	27
4.3. Quantificação dos níveis séricos de IL- 1 β e TNF- α no soro após diferentes tempos de reperusão	28
4.4. Níveis séricos de AST e ALT após 6 horas de reperusão	29
4.5. Análise do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo epididimal por citometria de fluxo após 6 horas de reperusão.....	29
4.6. RT ² Profiler PCR Array – Quimiocinas e Receptores	31
4.7. Análise da expressão gênica no tecido adiposo visceral após 6 horas de reperusão	32

4.8. Permeabilidade intestinal após 6 horas de isquemia e reperfusão hepática.....	33
4.9. Determinação de endotoxinas séricas após 6 horas de reperfusão	33
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO	44

1.INTRODUÇÃO

A isquemia se desenvolve quando ocorre uma obstrução de vasos sanguíneos e o restabelecimento do fluxo determina o fenômeno conhecido como reperfusão, sendo sua ocorrência frequente em casos de isquemia miocárdica, choque, trauma, injúria hemorrágica, cirurgias e transplantes (QUESNELLE; BYSTROM; TOLEDO-PEREYRA, 2015) (Figura 1). Durante a isquemia, a fosforilação oxidativa cessa rapidamente e a glicólise anaeróbia é acelerada. Os produtos da glicólise anaeróbica são lactato e H^+ que resultam no estabelecimento de acidose. A acidose intracelular estimula os mecanismos de extrusão de ácido, incluindo o trocador NHE1 e o cotransportador Na^+/HCO^- que levam à entrada de um íon Na^+ para cada H^+ removido. O aumento resultante da concentração de Na^+ intracelular seria minimizado pela ativação de bombas de $Na^+K^+ATPase$. No entanto, o funcionamento de bombas e trocadores fica comprometido pela depleção de ATP resultante da hipóxia. O aumento de Na^+ afetará então o trocador de Na^+/Ca^{2+} , diminuindo a força do efluxo de Ca^{2+} e/ou aumentando a força de entrada de Ca^{2+} , o que tende a aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular. O acúmulo de Ca^{2+} no interior das células é uma característica comum da lesão e promove o dano celular por uma série de mecanismos, incluindo a ativação de proteases e a entrada nas mitocôndrias e a interrupção de sua função (ALLEN; XIAO, 2003). A reintrodução do oxigênio leva as mitocôndrias a produzirem espécies reativas de oxigênio ou radicais livres. O recrutamento de células do sistema imunológico para o local da isquemia é ativado durante a reperfusão potencializando a lesão (QUESNELLE; BYSTROM; TOLEDO-PEREYRA, 2015).

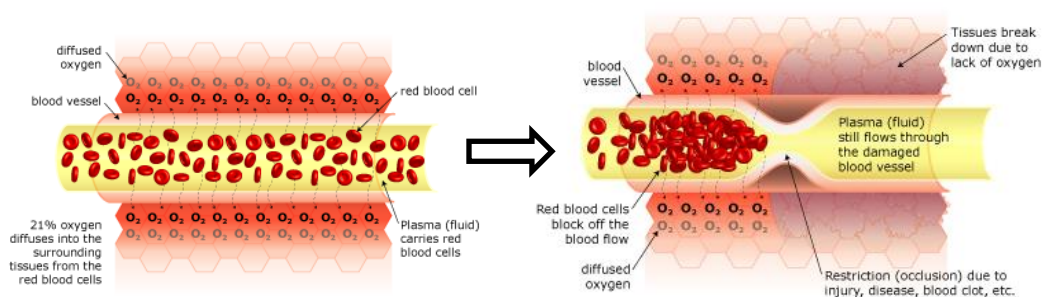


FIGURA 1. Mecanismos relacionados com a lesão de isquemia e reperfusão. Fonte: <https://www.slideshare.net/jamickle/senior-research-presentation-use-of-co-to-treat-ischemia-reperfusion-injury>. Acesso: 17 de Julho de 2018.

Durante a isquemia hepática, por exemplo, o metabolismo aeróbico é reduzido e, a produção de xantina oxidase e NADPH oxidase é aumentada (JAESCHKE, 2003). Imediatamente após o início da reperfusão, um edema celular é observado devido a distúrbios na função da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ como já citado, um declínio na produção de óxido nítrico ocorre e um excesso de radicais livres é gerado, resultando em estresse oxidativo, que ativa células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado) iniciando a produção de citocinas. Com a reperfusão, neutrófilos e macrófagos são adicionalmente recrutados para o órgão lesado levando ao aumento da produção de citocinas e morte celular (NASTOS et al., 2014) (Figura 2). Os vertebrados utilizam um mesmo sistema sentinela para respostas imunes inatas frente a uma invasão de microrganismos ou ao dano tecidual provocado pela isquemia. Este sistema sentinela é composto pelos receptores de reconhecimento padrão (PPRs) responsivos aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou aos padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs). O dano celular causado pela isquemia ativa uma inflamação estéril em resposta a ativação imunológica pela liberação de DAMPs (JAESCHKE, 2003). Este ambiente inflamatório é resultado da ativação de células residentes no fígado como células de Kupffer, as células dendríticas e células T natural killer (NKT) (LU et al., 2016). Quando ocorre o restabelecimento no suprimento de oxigênio, os metabólitos tóxicos são removidos, neutrófilos e monócitos são recrutados em resposta a estimulação dos PPRs pelos DAMPs, amplificando a resposta inflamatória que envolve também a participação dos hepatócitos (LU et al., 2016).

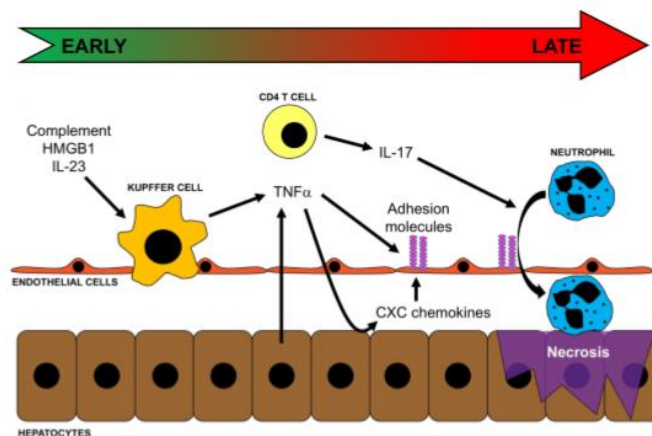


FIGURA 2. Lesão inflamatória hepática por isquemia/reperfusão (I/R). O estresse oxidativo induzido por I/R resulta na liberação de complemento e IL-23, que ativam células de Kupffer e induzem a produção de $\text{TNF-}\alpha$. O $\text{TNF-}\alpha$ leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e induz a expressão de quimiocinas CXC por hepatócitos. Ao mesmo tempo, as células T CD4 são recrutadas para o fígado e, simultaneamente o aumento da expressão de quimiocinas CXC e moléculas de adesão, facilita o recrutamento de neutrófilos para o parênquima hepático. Os neutrófilos lesionam diretamente os hepatócitos pela via oxidativa e por proteases, levando à morte celular necrótica. Modificado de: Takanori Konishi e Alex B., 2017.

Essa resposta global afeta órgãos remotos como pulmão, rins, intestino, pâncreas, adrenais e o coração, levantando o questionamento se o tecido adiposo também seria afetado (Figura 3). A hipertensão portal que resulta em vasodilatação abdominal parece ser o fator desencadeante da injúria renal. A ativação do sistema renina-angiotensina que se segue causa isquemia renal levando a necrose de túbulos renais (VERNA; WAGENER, 2013). Mas a resposta inflamatória sistêmica caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas, como a IL-6 e TNF- α que se segue a isquemia/reperfusão hepática podem também culminar na injúria renal (KADKHODAEI et al., 2012). Segundo, Park et al. a IL-17 derivada de células de Paneth exerceria um papel importante no aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial, como a E-selectina, P-selectina e moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1 em órgãos remotos após a isquemia/reperfusão hepática, o que culminaria no recrutamento e extravasamento de leucócitos nestes locais (PARK et al., 2011). O TNF- α , fator ativador de plaquetas (PAF), IL-6, IL-18 circulante e o aumento da expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 e E-selectina levando ao infiltrado de neutrófilos, é também apontado como o mecanismo envolvido na injúria pulmonar que se segue a isquemia/reperfusão hepática (TAKEUCHI et al., 2010). A apoptose induzida pelos radicais livres parece ser um dos mecanismos que leva a perda da função da mucosa intestinal após a isquemia/reperfusão hepática, o que aumenta o nível de endotoxinas circulantes (FILOS et al., 2004). As lesões em pâncreas e adrenais ainda têm suas etiologias pouco compreendidas, enquanto as lesões cardíacas são também atribuídas a mecanismos inflamatórios (CHEN; XIE, 2012).

O tecido adiposo branco é conhecido como um tecido metabolicamente ativo e importante órgão endócrino. A expansão excessiva deste tecido está relacionada ao estabelecimento de um estado de inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau que leva a inúmeras co-morbidades como a resistência à insulina e o diabetes tipo-2, hipertensão, dislipidemias e a doença do fígado gorduroso não-alcoólica (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD). Citocinas e quimicinas produzidas por células imunocompetentes localmente influenciam a inflamação sistêmica (BALLAK et al., 2015), por exemplo, macrófagos residentes no tecido adiposo podem produzir interleucina (IL) -1 β , IL-6, proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2; MCP-1), fator de necrose tumoral (TNF)- α e outros. Estima-se que 35% da IL-6 sérica seja produzida no tecido adiposo (MOHAMED-ALI et al., 1997). No entanto, há um volume menor de conhecimento sobre a influência da inflamação sistêmica sobre o tecido adiposo.

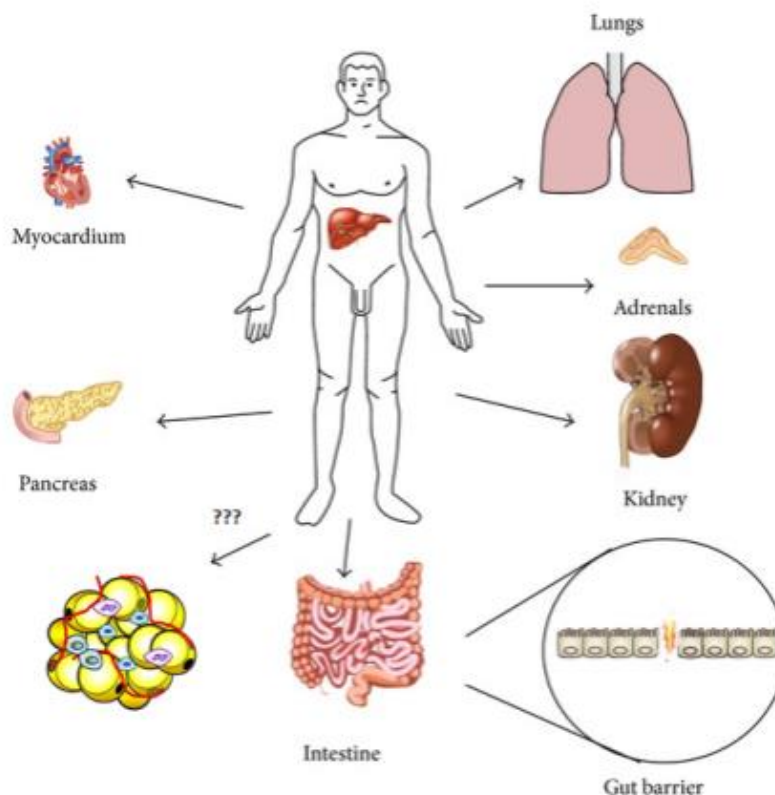


FIGURA 3. Órgãos distantes que estão envolvidos na injúria remota após a isquemia/reperfusão hepática. Modificado de: Nastos et al., 2014.

Quando o tecido adiposo é cirurgicamente traumatizado, ocorre uma liberação de IL-6 que parece estar associada à resistência à insulina detectada perioperativamente (GLETSU et al., 2006). Quando o tecido adiposo é submetido a um quadro isquêmico durante cirurgias plásticas, por exemplo, registra-se alterações degenerativas como a morte de adipócitos seguida da ativação de células tronco/progenitoras levando a um processo de remodelamento tecidual (SUGA et al., 2010). Adipócitos maduros submetidos a um quadro de isquemia/reperfusão *in vitro* (exposição a uma câmara de hipóxia temporariamente), respondem com o aumento da expressão de mRNA para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e para diversas citocinas como IL-1, IL-8 e TNF- α , além de expressarem moléculas citoprotetoras como a proteína de choque térmico (HSP)-70 e óxido nítrico sintase (HONG et al., 2014). Um efeito cardioprotetor envolvendo a produção/liberação do fator de crescimento de fibroblasto (FGF)-21 pelo fígado e tecido adiposo após um quadro de isquemia/reperfusão cardíaca foi relatado (LIU et al., 2013). Cardiomiócitos respondem ao FGF21 reduzindo a atividade de caspase-3 e a morte celular, sugerindo que o tecido adiposo possa produzir fatores protetores neste contexto (LIU et al., 2013). Células

progenitoras presentes no tecido adiposo tem sido extensivamente estudado quanto a sua capacidade de proteger e regenerar estruturas lesionadas por processos de isquemia/reperfusão hepática, tanto no órgão principal (fígado) como nos órgãos remotos (LEE; KIM; KIM, 2015; SAIDI et al., 2014). A aplicação de células foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 circulantes após a lesão de isquemia/reperfusão hepática, sugerindo uma modulação da resposta inflamatória (LEE; KIM; KIM, 2015).

Considerando que o tecido adiposo participa ativamente no estabelecimento de um estado de inflamação crônica, sistêmica e de baixo grau durante a obesidade e, que a resposta que se segue ao evento de isquemia e reperfusão hepática gera uma resposta inflamatória sistêmica que acomete vários órgãos remotos, este projeto busca compreender se o tecido adiposo é afetado pela resposta inflamatória sistêmica e se poderia contribuir de forma diferente para a inflamação sistêmica decorrente da isquemia e reperfusão hepática, exercendo um efeito sinérgico ou protetor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos de uma resposta inflamatória sistêmica sobre o funcionamento do tecido adiposo visceral.

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar os efeitos da inflamação sistêmica decorrente da isquemia/reperfusão hepática sobre o tecido adiposo visceral, avaliando o infiltrado de células inflamatórias presentes na fração estromal vascular (leucócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos) e as expressões de genes que codificam citocinas (Il1b, Il6), proteínas de choque térmico (Hsp90ab1, Hsp70), adipocinas (Adipo, Lep), marcadores de fibrose (Mmp2, Mmp9), moléculas de adesão (Icam1) e de fatores de proteção (Fgf21).
- Avaliar se uma possível ativação de resposta inflamatória no tecido adiposo seria proveniente de níveis circulantes de endotoxinas por alterações na permeabilidade intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste experimento foram utilizados camundongos Swiss machos com 6 semanas de idade adquiridos do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

Os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com maravalha fina autoclavada no Biotério Central da Universidade São Francisco no campus de Bragança Paulista, com ciclos artificiais de 12 horas claro e escuro e temperatura controlada. Alimentados com ração padrão (ração comercial) para camundongos fabricada pela Presence (Paulínia, SP) e água a vontade.

O projeto foi submetido para apreciação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade São Francisco e aprovado sob protocolo CEUA/USF 002.11.2015 (Anexo I).

3.2. Modelo de Injúria por Isquemia/Reperusão Hepática

Os animais foram mantidos em jejum de 6 horas, anestesiados com uma mistura 1:2 v/v de cetamina 100mg/ml e xilasina 2% no volume de 0,3 UI para cada 100g de peso corpóreo e imobilizados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto, o fígado exteriorizado e a veia porta exposta. Um “clamp” (pinça bulldog) foi colocado na veia porta junto com a artéria hepática e o canal biliar logo acima da ramificação do lobo lateral direito. O animal foi mantido com gazes umedecidas com PBS heparinizada e sob aquecimento a 37° C, durante 30 minutos. Durante este tempo, a anestesia adicional quando necessário foi requerida e feita pela colocação de um pequeno volume (50uL) de anestésico no abdômen aberto.

Depois do período desejado de isquemia, os clamps foram removidos e a reperusão visualmente verificada (lóbulo isquêmicos começaram a mostrar restauo da cor avermelhada normal dentro de alguns segundos de retirada da pinça). Por fim, o abdômen foi suturado e

diferentes tempos pós-reperfusão foram avaliados (3, 6 e 24 horas). Animais do grupo controle (Sham-operados) passaram pelo mesmo procedimento mas sem a colocação do clamp.

3.3. Eutanásia dos animais e coleta de materiais

Os animais foram reanestesiados com uma proporção de 1:1 v/v de cetamina 100mg/ml e xilasina 2% no volume de 0,3 UI para cada 100g de peso corpóreo. A coleta de sangue nos camundongos foi realizada por punção cardíaca. O sangue coletado utilizando seringa sem anticoagulante e o soro empregado em análises posteriores. O animal foi eutanasiado pela retirada do coração sob efeito do anestésico. Os estoques de tecido adiposo (epididimal) e o fígado foram retirados, divididos em biópsias, utilizados a fresco ou armazenadas a seco em - 80°C para posterior utilização.

3.4. Caracterização da injúria hepática (infiltrado neutrofílico, AST/ALT)

Um fragmento do fígado foi utilizado na determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), um marcador bioquímico do infiltrado de neutrófilos. Para tanto, fragmentos do tecido hepático foram pesados, homogeneizados com tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia – Sigma – diluído em 1 litro de Tampão Fosfato de Potássio) e centrifugados (10 minutos, 14000 rpm e 4°C). Em seguida, adicionado o-dianisidine (16,7mg de o-dianisidine – Sigma; 90mL de água deionizada; 10mL de Tampão Fosfato de Potássio; 50µl de água oxigenada 1%) ao sobrenadante e realizadas leituras cinéticas de absorbância em 460nm.

Amostras de soro foram empregadas na quantificação da AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG).

3.5. Caracterização da inflamação sistêmica

Amostras de soro foram empregadas na quantificação de TNF- α e IL-1 β utilizando kits comerciais de ELISA (Raybiotech, EUA).

3.6. Obtenção de células e caracterização do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo epididimal (Fração estromal vascular)

Biópsias de tecido adiposo epididimal foram fragmentadas em solução contendo colagenase (1mg/ml) e incubados com agitação constante (velocidade 100 rpm) em banho-maria a 37°C, durante 45 min. A suspensão celular foi centrifugada e o precipitado coletado e filtrado em malhas de 150 μ m e posteriormente em 37 μ m. As células obtidas (Fração Estromal Vascular) foram utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo.

Para a análise do infiltrado de células inflamatórias do tecido adiposo visceral, as células obtidas na etapa descrita foram contadas e a suspensão celular ajustada para conter 1x10⁶ células/mL. A suspensão celular foi aliquotada em tubos plásticos e incubadas com 2 μ L de anticorpo conjugado com fluorocromos conforme Tabela 1, por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Após a incubação as células foram lavadas e ressuspensas em PBS para leitura imediata. A expressão de marcadores de superfície celular foi avaliada utilizando um Citômetro Capilar (Guava Easy-Cyte HT, Millipore, Hayward, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra. O software utilizado na leitura e análise foi o InCyte.

TABELA 1. Marcação celular para análise por citometria do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo

Nome do tubo	Anticorpos
Branco	-
Leucócitos totais	CD45+
Neutrófilo	CD11b+ Ly-6C+ Ly-6G+
Macrófago	CD11b+CD14+ F4/80+
Monócito	CD11b+ Ly-6C+ Ly-6G-
Linfócito B	CD19+ CD3+ CD4-
Linfócito T	CD19+ CD3+ CD4+

3.7. RT² Profiler PCR Array – Quimiocinas e Receptores

Biópsias de tecido adiposo epididimal foram submetidas à extração total de RNA utilizando TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Em seguida foi adicionado clorofórmio 1:5 v/v e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado 12000 rpm (24.19g) à 4°C por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e adicionou-se 20ul de acetato de sódio 3M e 1ul de GenElute® LPA (5 mg/mL), misturando por inversão (15 vezes). Em seguida, foi adicionado 500ul de isopropanol e incubado novamente por 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugando 12000 rpm à 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 500ul de etanol 75% e misturado por inversão para lavar o pellet. O material foi novamente centrifugado a 9000 rpm, 4°C por 5 minutos. O material foi ressuspenso em água livre RNase. As amostras que apresentaram leitura de absorbância igual ou superior a 100 ng/μL de RNA, para a normalização, bem como se mantiveram acima de 1.7 na razão A260:A230 e entre 1.8 e 2.0 na razão A260:A280 foram empregadas. As amostras de RNA foram utilizadas para a síntese de cDNA utilizando “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este material foi empregado para análise da expressão de 84 genes que codificam quimiocinas e seus receptores pela técnica de PCR Array (Inflammatory Cytokines and Receptors RT2 Profiler PCR Array – Qiagen, CA, USA). Utilizando-se o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), as amostras foram amplificadas no equipamento 7300 Real-Time PCR System e analisadas pelo Analyse Center, online no site da Qiagen.

3.8. Extração de RNA com Trizol/Preparação de cDNA/PCR quantitativo

As amostras de biópsias de tecido adiposo epididimal que foram submetidas a extração de RNA e em seguida a preparação de cDNA que apresentaram leitura de absorbância igual ou superior a 100 ng/μL de RNA. A análise da expressão dos genes e do gene constitutivo β-actina foi feita por meio de qRT-PCR, utilizando-se o SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram amplificadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em duplicata de 4 amostras distintas, e as amostras foram

normalizadas com os valores do gene constitutivo. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2. Sequência de primers utilizados no PCR.

Gene	Sequência do primer (5'→3')	
	Reverse primer	Forward primer
Actb	ACGAGGCCAGAGCAAGAG	GGTGTGGTGCCAGATCTT
Il6	TCCACGATTTCCAGAGAAC	CCGGAGAGGAGACCTCACAG
Il1b	GTACCAGTTGGGAACTCCTGC	GAAGATGGGAAAAGCGGTTTG
Hsp90ab1	GCGTCGGTTAAGTGAATCTT	TGGCTGAGGACAAGGAGAA
Hsp70	CCGCTGAGAGTCGTTGAAG	TGGTGCTGACGAAGATGAAG
Adipoq	GATCTGTGAACTCTGATCCAGTAAG	AATAAGGGTCAAGGCCTGGAAACAC
Lep	ACCAAACCAAGCATTTTTGC	CTATGCCACCTTGGTCACCT
Mmp2	TCCAGGGTCCTGAGAGTGTT	TACGATGATGATGACCGA
Mmp9	AGGAAGACGAAGGGGAAGAC	CCACAGCCAACTATGACCAG
Icam1	TCAGGGGTGTCGAGCTTT	AGGGCTGGCATTGTTCTCTA
Fgf21	GGCCTCAGGATCAAAGTG	CATTCAAATCCTGGGTGTCA

3.9. Avaliação da permeabilidade intestinal

Camundongos que passaram por IRH receberam por via oral (gavagem) 500 mg/kg de dextran conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextran) diluído em água filtrada após 3 h. Após 3 horas da administração oral de FITC-dextran, os animais foram eutanasiados conforme descrito anteriormente e o sangue coletado por punção cardíaca e transferido para um tubo de vidro. O plasma foi obtido por centrifugação de 2000rpm, 22°C, 10 min. A fluorescência foi avaliada no plasma em leitor de fluorescência (485 nm de excitação e 535 nm de emissão; Glomax, Madison, Wisconsin-EUA).

3.10. Determinação de endotoxemia por LAL (Limulus Amebocytes Lisate)

Foram utilizadas amostras de plasma dos camundongos que passaram por IRH. A presença de endotoxina foi avaliada no plasma através do kit Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation (Thermo Scientific, USA).

3.11. Análise estatística

Os dados estão expressos como média acompanhados do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste T. Os testes foram realizados utilizando o software GraphPad InStat. Valor de p inferior a 5% foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação em diferentes tempos de reperfusão dos níveis séricos de AST

Os níveis séricos de AST foram mensurados nos grupos que sofreram reperfusão por 3, 6 e 24 horas. Os resultados estão mostrados na Tabela 3. Observamos um aumento nos níveis séricos de AST nos grupos que sofreram reperfusão por 3 e 6 horas.

TABELA 3. Níveis séricos de AST (U/L) nos camundongos submetidos à IRH.

	3 horas	6 horas	24 horas
Sham	17±1	22 ±3	33±3
Isquemia	70±29*	94±25*	42±3

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com respectivo grupo Sham.

4.2. Avaliação em diferentes tempos de reperfusão do infiltrado de neutrófilos no fígado

A atividade de mieloperoxidase (MPO) foi empregada como marcador do infiltrado de neutrófilos no fígado. A atividade de MPO foi quantificada no fígado nos grupos que sofreram reperfusão por 3, 6 e 24 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 4. Observamos um aumento significativo do infiltrado de neutrófilos nos fígados dos grupos reperfundidos por 6 e 24 horas quando comparado com os grupos sham-operados.

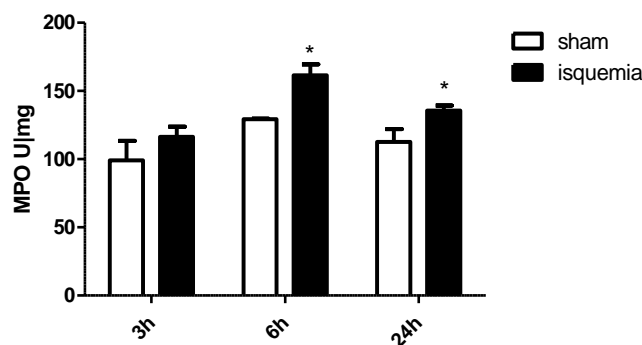


FIGURA 4. Atividade da mieloperoxidase no fígado nos grupos Sham-operados e IRH após 3, 6 e 24 horas de reperfusão. Os dados são expressos como média \pm EPM. $n=5$ por grupo. * $p<0,05$ quando comparado com o respectivo grupo Sham.

4.3. Quantificação dos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α no soro após diferentes tempos de reperfusão

Na dosagem de IL-1 β observamos concentrações altas no soro dos animais após reperfusão de 6 e 24 horas quando comparado com o Sham (Tabela 5). Porém não houve diferença dos níveis séricos de TNF- α (Tabela 4).

TABELA 4. Níveis séricos de TNF- α (pg/mL) nos camundongos submetidos à IRH.

	3 horas	6 horas	24 horas
Sham	15 \pm 4	17 \pm 6	18 \pm 3
Isquemia	10 \pm 2	22 \pm 7	17 \pm 4

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 5 animais por grupo.

TABELA 5. Níveis séricos de IL-1 β (pg/mL) nos camundongos submetidos à IRH.

	3 horas	6 horas	24 horas
Sham	0,18 \pm 0,09	0,25 \pm 0,09	0,15 \pm 0,02
Isquemia	0,47 \pm 0,26	1,26 \pm 0,46*	0,57 \pm 0,14*

Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p<0,05$ quando comparado com o respectivo grupo Sham.

4.4. Níveis séricos de AST e ALT após 6 horas de reperfusão

A avaliação dos níveis séricos de ALT também confirmou que esta encontrava-se elevada no soro dos camundongos após 6 horas de IRH (Figura 5).

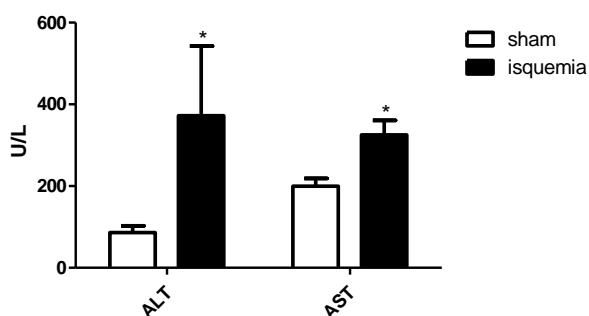


FIGURA 5. Níveis séricos de ALT e AST no soro nos grupos Sham-operados e IRH após 6 horas de reperfusão. Os dados são expressos em média \pm EPM. n= 5 por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Sham.

4.5. Análise do infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo epididimal por citometria de fluxo após 6 horas de reperfusão

Animais que passaram pelo processo cirúrgico de isquemia e foram reperfundidos por 6 horas não apresentaram aumento do infiltrado de células CD45+ características de leucócitos ou de células CD14+/F4/80+/CD11b+, marcação empregada para contagem de macrófagos que é a população quantitativamente mais importante na fração estromal vascular de tecido adiposo visceral. Entretanto, neutrófilos (CD45+/CD14+/, CD15+), monócitos (CD11B+/LY6C+/LY6G-), bem como linfócitos T (CD19+/CD3+/CD4+) e linfócitos B (CD19+/CD3+/CD4-) apresentaram-se aumentados no tecido adiposo epididimal dos animais que passaram pela isquemia e reperfusão. Note que essas populações de células são minoritárias e, portanto, não alteraram a contagem total, bem como outras células não avaliadas poderiam estar reduzidas, o que também compensaria a contagem total de células CD45+ (Figura 6).

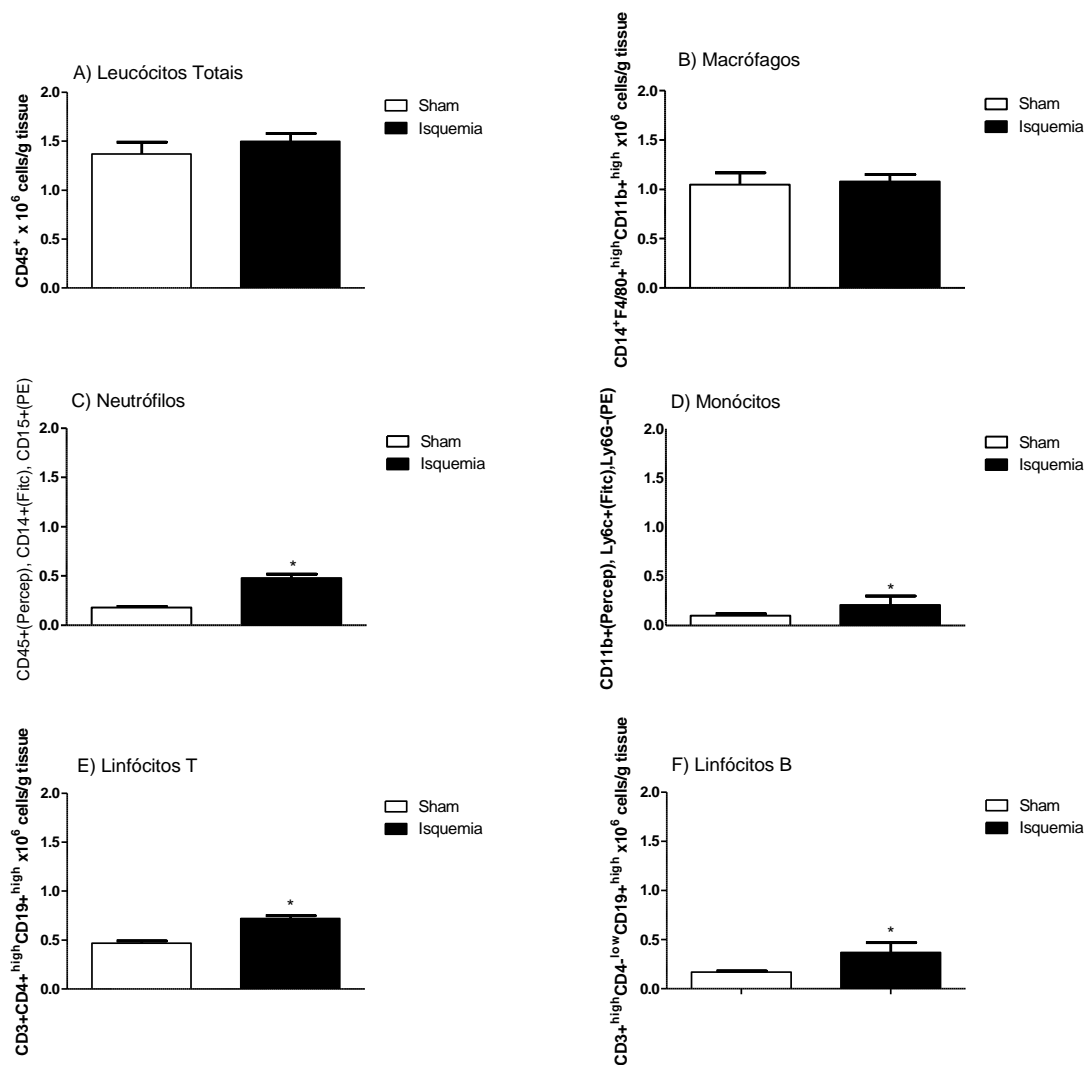
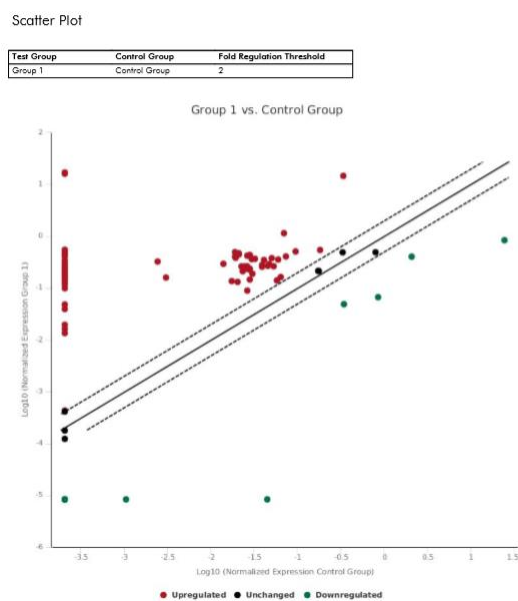


FIGURA 6. Contagem de células na fração estromal vascular no tecido adiposo epididimal após a IRH. A) Leucócitos Totais, B) Macrófagos, C) Neutrófilos, D) Monócitos, E) Linfócitos T, F) Linfócitos B na fração estromal do tecido adiposo epididimal dos animais sham e isquemia/reperfusão de 6 horas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão de 5 animais. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo Sham.

4.6. RT² Profiler PCR Array – Quimiocinas e Receptores

Com um fragmento da amostra de tecido adiposo epididimal dos camundongos submetidos à injúria por isquemia e reperfusão por 6 horas foram analisados 84 genes que codificam quimiocinas e receptores (Figura 7 A e B). Vários genes estavam superexpressos. Alguns genes deste painel foram validados a seguir por RT-PCR quantitativo.

A.



B.

Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	C5ar1	Ackr2	Ccl1	Ccl11	Ccl12	Ccl17	Ccl19	Ccl2	Ccl20	Ccl22	Ccl24	Ccl25
	65.89	86.34	65.89	4.63	4.86	164.51	67.74	33.17	87.55	116.32	143.21	12.48
B	Ccl26	Ccl28	Ccl3	Ccl4	Ccl5	Ccl6	Ccl7	Ccl8	Ccl9	Ccr1	Ccr10	Ccr11
	120.43	47.24	52.78	83.40	27.32	-1.08	54.64	31.38	14.34	30.95	38.11	49.59
C	Ccr2	Ccr3	Ccr4	Ccr5	Ccr6	Ccr7	Ccr8	Ccr9	Ackr4	Ccr12	Cmklr1	Cmtm2a
	4.09	28.68	149.29	12.06	38.91	76.21	71.61	33.87	4.26	29.90	12.75	83.40
D	Cmtm3	Cmtm4	Cmtm5	Cmtm6	Cx3cl1	Cx3cr1	Cxcl1	Cxcl10	Cxcl11	Cxcl12	Cxcl13	Cxcl14
	3.16	1.78	86.94	1.10	19.19	44.69	14.14	9.79	5.86	-1.78	63.21	8.41
E	Cxcl15	Cxcl16	Cxcl2	Cxcl3	Cxcl5	Cxd9	Cxcr1	Cxcr2	Cxcr3	Cxcr4	Cxcr5	Cxcr6
	58.57	12.66	114.72	88.16	4.60	33.64	32.27	80.00	38.11	26.21	156.72	24.97
F	Ackr3	Ackr1	Fpr1	Gpr17	Hif1a	lfng	Il16	Il1b	Il4	Il6	Itgam	Itgb2
	9.66	48.91	84.57	46.27	1.57	87.55	33.64	64.53	136.43	68.69	33.41	18.28
G	Mapk1	Mapk14	Pf4	Ppbbp	Slit2	Tgfb1	Tlr2	Tlr4	Tnf	Tymp	Xcl1	Xcr1
	-1.56	4.26	44.38	201.13	9.86	1.32	25.67	6.11	710.16	100.57	97.82	51.34

FIGURA 7. Avaliação da expressão gênica no tecido adiposo epididimal dos animais Sham e isquemia de 6 horas. A. O gráfico de dispersão compara a expressão normalizada de cada gene no array entre os dois grupos selecionados. A linha central indica expressão gênica inalterada. As linhas pontilhadas indicam o limite de regulação (acima das linhas pontilhadas indicam genes superexpressos e abaixo os genes reprimidos). B. Valores obtidos para cada gene. Representativos de um experimento.

4.7. Análise da expressão gênica no tecido adiposo visceral após 6 horas de reperfusão

Com um fragmento da amostra de tecido adiposo epididimal dos camudongos submetidos à injúria por isquemia e reperfusão por 6 horas foi realizado a análise da expressão gênica. Foram analisadas as expressões de genes que codificam citocinas (Il1b, Il6), proteínas de choque térmico (Hsp90ab1, Hsp70), adipocinas (Adipo, LepR), marcadores de fibrose (Mmp2, Mmp9), moléculas de adesão (Icam1) e de fatores de proteção (Fgf21). O processo de isquemia e reperfusão hepática teve como consequência o aumento da expressão dos genes que codificam as interleucinas 1 β e 6 de forma significativa, citocinas estas que tem papel pró-inflamatório, bem como a expressão do gene que codifica a proteína de choque térmico (HSP)-70 também foi aumentada. Em adição também observamos uma maior expressão genica do receptor de Leptina, sem que fosse observadas alterações na expressão dos demais genes analisados (Figura 8).

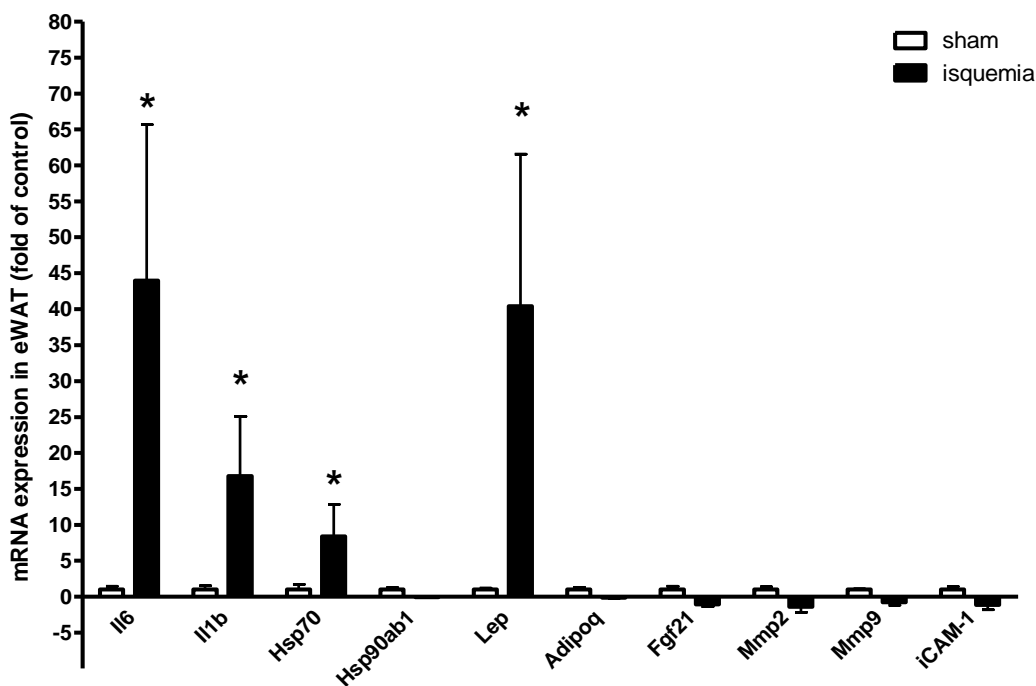


Figura 8. Avaliação da expressão gênica no tecido adiposo epididimal (TAE) dos animais Sham e isquemia de 6 horas. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 4 animais. * $p < 0,05$ quando comparando os grupos sham e isquemia.

4.8. Permeabilidade intestinal após 6 horas de isquemia e reperfusão hepática

A IRH não alterou de forma significativa a permeabilidade intestinal como pode ser observado pelos níveis séricos de FITC-Dextran após administração deste por via oral (Figura 9).

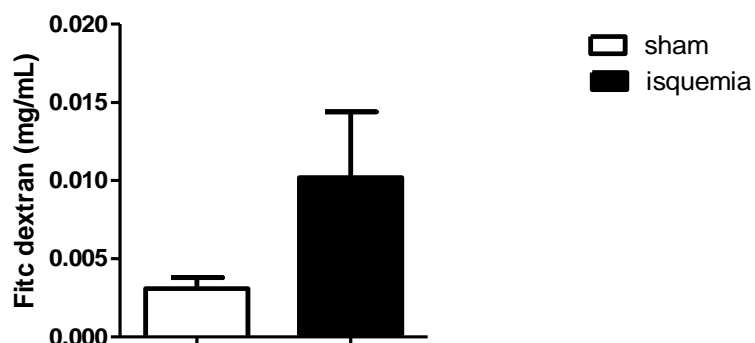


FIGURA 9. Níveis séricos de FITC-dextran após 6 h de reperfusão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 4-5 animais.

4.9. Determinação de endotoxinas séricas após 6 horas de reperfusão

A IRH não alterou de forma significativa a presença de endotoxinas no soro dos animais como podemos observar na Figura 10.

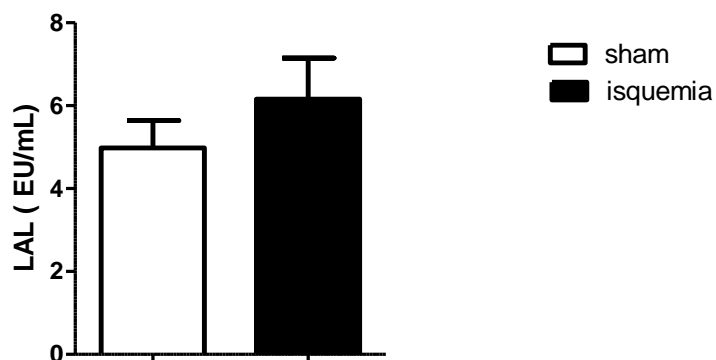


FIGURA 10. Níveis séricos de endotoxinas após 6 h de reperfusão. Os valores estão apresentados na forma de média e erro padrão da média de 4-5 animais.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente buscamos estudar em diferentes tempos de reperfusão a caracterização da injúria hepática e a presença de inflamação sistêmica. A colocação do clamp na vasculatura hepática produz uma perda de coloração imediata nos lobos, exceto no lobo caudado que se mantém com a coloração normal, confirmando que este modelo induz a um quadro de isquemia parcial no fígado. Após a retirada do clamp a cor retorna imediatamente a todos os lobos, confirmando relatos de literatura que utilizaram o mesmo modelo (JOHNSON; ZAGER, 2014).

Os trabalhos da literatura apresentam tempos variados de reperfusão (GUAN et al., 2014; JOHNSON; ZAGER, 2014) e considerando então a presença de níveis aumentados de transaminases séricas, que são enzimas presentes em grande quantidade nos hepatócitos, a presença de um infiltrado de neutrófilos no fígado, o que indica a injúria hepática (LEE; KIM; KIM, 2015) e níveis séricos aumentados de IL-1 β , caracterizando a presença de inflamação sistêmica (BRENNER et al., 2013; ZHOU; YAO; CHEN, 2012), optamos por continuar os experimentos com um protocolo de 30 minutos de isquemia e 6 horas de reperfusão.

A injúria hepática e a inflamação sistêmica desencadeada pela isquemia/reperfusão do fígado foram capazes de alterar o infiltrado de células no tecido adiposo visceral de camundongos eutróficos. Embora a contagem global de leucócitos não tenha sido alterada de forma significativa, populações minoritárias de células como neutrófilos, monócitos e linfócitos T e B, apresentaram-se aumentadas. Segundo Zhou, Yao e Chen, após a indução de isquemia e reperfusão hepática, um intenso infiltrado de neutrófilos pode ser observado no pulmão de camundongos, associado a edema e alterações na parede alveolar (ZHOU; YAO; CHEN, 2012). O TNF- α circulante e o aumento da expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e E-selectina são apontados como os responsáveis pelo infiltrado de neutrófilos na injúria pulmonar que se segue a isquemia/reperfusão hepática (TAKEUCHI et al., 2010). Em trabalho recentemente publicado, Gust e colaboradores desenvolveram um modelo de ciclos de isquemia e reperfusão por pressão na pele em camundongos e observaram também um infiltrado significativo de neutrófilos no tecido adiposo (GUST et al., 2017). Os neutrófilos representam a maior proporção dos glóbulos brancos circulantes desempenhando um papel vital na imunidade inata. São inicialmente recrutados para locais de inflamação e estimulam a secreção de MCP-1 e outras citocinas, como o TNF- α . A infiltração de neutrófilos é um processo precoce e transitório na resposta inflamatória, preparando o caminho para recrutamento e ativação de outros tipos de células (MRAZ; HALUZIK, 2014).

Um trabalho que induziu diretamente isquemia severa por cirurgia no tecido adiposo registrou um aumento significativo de macrófagos infiltrados no tecido adiposo hipóxico de camundongos magros e não-diabéticos ao redor de células adiposas mortas a partir do terceiro dia, em estruturas semelhantes às coroas observadas durante a obesidade (SUGA et al., 2010), mas isto não foi observado em nosso modelo experimental sugerindo que os danos ao tecido adiposo não foram tão severos ou que o tempo de observação foi menor, sendo possível somente a detecção de um aumento na discreta população de monócitos. Os macrófagos compõem a maior parte da população de células do sistema imunológico residentes no tecido adiposo. Em camundongos magros e humanos, os macrófagos residentes no tecido adiposo (ATM) compreendem cerca de 5% das células da fração estromal vascular (SVF), enquanto que nos obesos, o número de ATM aumenta, atingindo cerca de 50% das células que compõem a SVF (WEISBERG et al., 2003). Este aumento na população de macrófagos em parte depende do recrutamento de monócitos circulantes. São os principais mediadores da resposta imune inata na inflamação do tecido adiposo relacionada à obesidade. Quando estimulados fagocitam detritos celulares e secretam citocinas, interagindo de forma recíproca com linfócitos T e B para combater patógenos (DAM; SIKDER; SANTOSA, 2016).

Os trabalhos que tem como enfoque a função dos linfócitos infiltrados no tecido adiposo são menos numerosos. Estudos indicam que existem diferentes subpopulações de linfócitos infiltrados no tecido adiposo e que linfócitos T CD8⁺ contribuem para o recrutamento, diferenciação e ativação de macrófagos (CHATZIGEORGIOU et al., 2012), como verificamos um infiltrado inicial de linfócitos T CD8⁺ maior após a IRH, podemos sugerir que participariam no recrutamento, diferenciação de monócitos/macrófagos no tecido adiposo. Um estudo de obesidade mostrou que linfócitos B se infiltram antes de linfócitos T e de macrófagos no tecido adiposo (DUFFAUT et al., 2009), participando também do estabelecimento da resistência à insulina que se estabelece com a obesidade. Linfócitos B atuam como apresentadores de antígenos a linfócitos T, secretam citocinas pró-inflamatórias e produzem anticorpos patogênicos, podendo também interferir com o fenótipo final de macrófagos infiltrados no tecido adiposo (WINER et al., 2014).

O tecido adiposo é um importante reservatório energético e reconhecido como um órgão endócrino com múltiplas funções. Responsável pela produção e secreção de diversas citocinas, que neste caso passam a ser denominadas adipocinas. Por exemplo, a leptina, TNF- α e adiponectina atuam diretamente ou indiretamente em processos inflamatórios (BRENNER et al., 2013).

O tecido adiposo vem sendo considerado uma fonte de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para injúria vascular, resistência periférica à insulina e aterogênese. No entanto, algumas adipocinas possuem ação protetora contra a inflamação vascular e resistência insulínica, dentre as quais figuram a adiponectina e o óxido nítrico (BERGMAN; MITTELMAN, 1998). Adiponectina e leptina são as adipocinas mais abundantes sintetizadas pelo tecido adiposo. A adiponectina, também conhecida como proteína complementar relacionada com o adipócito (Acrp 30) é o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo de humanos e murinos, e está envolvida na resposta inflamatória e regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório. A produção da adiponectina parece ser alterada pela presença de outras citocinas pró-inflamatórias, mais especificamente a IL-6, o TNF- α e a proteína C reativa (BERGMAN; MITTELMAN, 1998). A avaliação da expressão gênica no tecido adiposo após a reperfusão revelou que ocorre um aumento da expressão do gene que codifica a leptina, mas não o da adiponectina, sugerindo uma resposta mais pró-inflamatória em relação às adipocinas. Outros genes que codificam citocinas como a IL-1 β e IL-6 também estava com a expressão aumentada. A interleucina-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória para respostas de defesa do hospedeiro a infecções e lesões. É produzida e segregada por uma variedade de células, embora a grande maioria dos estudos se tenha concentrado em sua produção dentro das células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). A interleucina-6 (IL-6) é também uma citocina inflamatória potente, com atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003).

Como citado anteriormente, o infiltrado de neutrófilos no pulmão decorrente da isquemia/reperfusão hepática envolve um aumento na expressão de ICAM-1 vascular (TAKEUCHI et al., 2010), mas o mesmo não foi observado em nossos resultados. Ocorre uma alteração na conformação nas moléculas de adesão e não na expressão dos neutrófilos como a LFA-1 e MAC-1 induzida pela presença de citocinas e quimiocinas inflamatórias, a ligação das moléculas de adesão do neutrófilo com a ICAM-1 endotelial (ALVARENGA et al., 2018). As quimiocinas, juntamente com as interações entre selectinas nas células endoteliais e neutrófilos, induzem cascatas de sinalização intracelular que levam a uma mudança conformacional e subsequente ativação de β 2-integrinas (também conhecidas como LFA-1 e MAC-1) que são constitutivamente expressas na superfície dos neutrófilos (ZARBOCK; ROSSAINT, 2011). As integrinas ligam-se aos seus ligandos ICAM1 e ICAM2 na superfície das células endoteliais, que

são essenciais para a firme fase de adesão (ALVARENGA et al., 2018). A isquemia e reperfusão hepática induz a expressão de genes que codificam as metaloproteinases de matrix (MMPs) no próprio fígado e isto está relacionado a eventos de remodelamento tecidual neste órgão (PALLADINI et al., 2015). As MMPs também desempenham papel importante no remodelamento do tecido adiposo e contribuem para o infiltrado de células inflamatórias (CATALAN et al., 2012). No entanto, alterações na expressão dos genes que codificam a MMP-2 e MMP-9 no tecido adiposo após 6 horas de reperfusão.

O FGF21 é uma das 22 proteínas da família dos fatores de crescimento derivados de fibroblastos (FUKUMOTO, 2008; LIU et al., 2012), e é encontrada no fígado e, em menor nível, no tecido adiposo e células β das ilhotas pancreáticas (LIU et al., 2012). Tem sido demonstrado um papel cardioprotetor durante processos isquêmicos cardíacos desempenhado por FGF21 vindas do fígado e do tecido adiposo (LIU et al., 2013), mas em nosso modelo de IRH não observamos alteração no gene que codifica este fator de proteção no tecido adiposo epididimal.

Observamos, no entanto, um aumento significativo na expressão do gene que transcreve a proteína de choque térmico 70 (Hsp70). Dentre os genes da família de resposta ao choque térmico, o HSP70 é um dos genes altamente conservados e o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (MUKHOPADHYAY; SAXENA; CHOWDHURI, 2003). Ao lado da Hsp60 e gp96, a Hsp70 exibe propriedades pró- e anti-inflamatórias dependendo do contexto que se encontram na resposta imunológica. A Hsp70 extracelular pode ser encontrada como uma proteína livre ou associada a vesículas lipídicas em exossomas e lisossomas. Uma parte pequena das Hsp70 extracelulares é proveniente de células mortas e acredita-se que poderiam atuar como DAMPs (POCKLEY; HENDERSON, 2018). Em contraste a esta hipótese, vários relatos de literatura indicam que a Hsp70 apresenta ações anti-inflamatórias promovendo por exemplo o desenvolvimento de células T CD4+ Th2 capazes de produzir citocinas regulatórias como a IL-4 e IL-10, que também alteram o fenótipo de macrófagos (POCKLEY; HENDERSON, 2018). Nesta linha, o aumento de Hsp70 nas células lesadas, além de auxiliar no reparo de proteínas, apresenta um importante papel na manutenção da viabilidade uma vez que inibe a apoptose. As Hsp70 interagem diretamente com elementos da via apoptótica, seja ela intrínseca ou extrínseca, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MUKHOPADHYAY; SAXENA; CHOWDHURI, 2003), abrindo a possibilidade que a expressão aumentada do gene de Hsp70 em resposta a IRH possa ser uma resposta protetora.

Os camundongos que passaram pelo procedimento de IRH não obtiveram alteração de forma significativa na permeabilidade intestinal. A permeabilidade intestinal foi avaliada pelos

níveis séricos de FITC-Dextran após 3 h de administração por via oral. Em contraste a essa resposta outros estudos utilizando ratos, observaram que 60 min de isquemia mesentérica seguida de reperfusão resultaram em aumento da permeabilidade da mucosa do íleo ao FITC-Dextran (UCHIYAMA; DELUDE; FINK, 2003). Nossa análise da presença de endotoxinas séricas também não revelou diferenças significativas entre os níveis presentes nos animais com ou sem IRH. Ratos que foram colonizados com isolados clínicos *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) e *E. coli* produtoras de beta-lactmase de espectro extendido submetido a procedimento de IRH total com estase intestinal (30 min isquemia seguido de 1 hora de reperfusão), observou-se a presença de endotoxinas no soro portal e periférico, indicando a ocorrência de translocação bacteriana.

6. CONCLUSÃO

A isquemia hepática levou o aumento significativo das concentrações de ALT/AST séricas e MPO no fígado, sugerindo lesão hepática. Essa lesão levou a um aumento dos nível sérico de IL-1 β estabelecendo um modelo de inflamação sistêmica que buscávamos. Frente a esta inflamação sistêmica, o tecido adiposo é provocado e responde alterando as células infiltradas e expressando genes que em sua quase totalidade codificam proteínas pró-inflamatórias.

No modelo de IRH aplicado neste estudo não se observou alterações na permeabilidade intestinal.

Os resultados que obtivemos demonstram que a inflamação sistêmica desencadeada pela IRH promove alterações no tecido adiposo visceral ampliando a infiltração de células inflamatórias e ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, indicando que o TA também é um órgão remoto afetado pela síndrome inflamatória sistêmica ou síndrome da falência de múltiplos órgãos.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D. G.; XIAO, X. H. Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 4, p. 934-941, 2003.

ALVARENGA, D. M.; MATTOS, M. S.; ARAUJO, A. M.; ANTUNES, M. M.; MENEZES, G. B. Neutrophil biology within hepatic environment. **Cell Tissue Res**, v. 371, n. 3, p. 589-598, 2018.

BALLAK, D. B.; STIENSTRA, R.; TACK, C. J.; DINARELLO, C. A.; VAN DIEPEN, J. A. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 280-290, 2015.

BERGMAN, R. N.; MITTELMAN, S. D. Central role of the adipocyte in insulin resistance. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 205-221, 1998.

BRENNER, C.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Decoding cell death signals in liver inflammation. **J Hepatol**, v. 59, n. 3, p. 583-594, 2013.

CATALAN, V.; GOMEZ-AMBROSI, J.; RODRIGUEZ, A.; FRUHBECK, G. Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 12, p. 1515-1528, 2012.

CHATZIGEORGIOU, A.; KARALIS, K. P.; BORNSTEIN, S. R.; CHAVAKIS, T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2583-2592, 2012.

CHEN, Y.; XIE, X. Tacrolimus attenuates myocardium damage to the total hepatic ischemia-reperfusion via regulation of the mitochondrial function. **J Surg Res**, v. 172, n. 1, p. e47-54, 2012.

DAM, V.; SIKDER, T.; SANTOSA, S. From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots. **Obes Rev**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2016.

DUFFAUT, C.; GALITZKY, J.; LAFONTAN, M.; BOULOUMIE, A. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 384, n. 4, p. 482-485, 2009.

FILOS, K. S.; KIRKILESIS, I.; SPILIOPOULOU, I.; SCOPA, C. D.; NIKOLOPOULOU, V.; KOURAKLIS, G.; VAGIANOS, C. E. Bacterial translocation, endotoxaemia and apoptosis following Pringle manoeuvre in rats. **Injury**, v. 35, n. 1, p. 35-43, 2004.

FUKUMOTO, S. Actions and mode of actions of FGF19 subfamily members. **Endocr J**, v. 55, n. 1, p. 23-31, 2008.

GLETSU, N.; LIN, E.; ZHU, J. L.; KHAITAN, L.; RAMSHAW, B. J.; FARMER, P. K.; ZIEGLER, T. R.; PAPANICOLAOU, D. A.; SMITH, C. D. Increased plasma interleukin 6 concentrations and exaggerated adipose tissue interleukin 6 content in severely obese patients after operative trauma. **Surgery**, v. 140, n. 1, p. 50-57, 2006.

GUAN, L. Y.; FU, P. Y.; LI, P. D.; LI, Z. N.; LIU, H. Y.; XIN, M. G.; LI, W. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. **World J Gastrointest Surg**, v. 6, n. 7, p. 122-128, 2014.

GUST, M. J.; HONG, S. J.; FANG, R. C.; LANIER, S. T.; BUCK, D. W., 2ND; NUNEZ, J. M.; JIA, S.; PARK, E. D.; GALIANO, R. D.; MUSTOE, T. A. Adipose Tissue Drives Response to Ischemia-Reperfusion Injury in a Murine Pressure Sore Model. **Plast Reconstr Surg**, v. 139, n. 5, p. 1128e-1138e, 2017.

HONG, S. J.; PARK, E.; XU, W.; JIA, S.; GALIANO, R. D.; MUSTOE, T. A. Response of human mature adipocytes to hypoxia-reoxygenation. **Cytotherapy**, v. 16, n. 12, p. 1656-1665, 2014.

JAESCHKE, H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, n. 1, p. G15-26, 2003.

JOHNSON, A. C.; ZAGER, R. A. Renal cortical pyruvate as a potentially critical mediator of acute kidney injury. **Nephron Clin Pract**, v. 127, n. 1-4, p. 129-132, 2014.

KADKHODAEI, M.; MIKAEILI, S.; ZAHMATKESH, M.; GOLAB, F.; SEIFI, B.; ARAB, H. A.; SHAMS, S.; MAHDAVI-MAZDEH, M. Alteration of renal functional, oxidative stress and inflammatory indices following hepatic ischemia-reperfusion. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, n. 2, p. 195-202, 2012.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 149, p. 1-38, 2003.

LEE, S. C.; KIM, J. O.; KIM, S. J. Secretome from human adipose-derived stem cells protects mouse liver from hepatic ischemia-reperfusion injury. **Surgery**, v. 157, n. 5, p. 934-943, 2015.

LIU, S. Q.; ROBERTS, D.; KHARITONENKOV, A.; ZHANG, B.; HANSON, S. M.; LI, Y. C.; ZHANG, L. Q.; WU, Y. H. Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. **Sci Rep**, v. 3, p. 2767, 2013.

LIU, S. Q.; TEFFT, B. J.; ROBERTS, D. T.; ZHANG, L. Q.; REN, Y.; LI, Y. C.; HUANG, Y.; ZHANG, D.; PHILLIPS, H. R.; WU, Y. H. Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 12, p. H1446-1458, 2012.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011.

LU, L.; ZHOU, H.; NI, M.; WANG, X.; BUSUTTIL, R.; KUPIEC-WEGLINSKI, J.; ZHAI, Y. Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. **Transplantation**, v. 100, n. 12, p. 2601-2610, 2016.

MOHAMED-ALI, V.; GOODRICK, S.; RAWESH, A.; KATZ, D. R.; MILES, J. M.; YUDKIN, J. S.; KLEIN, S.; COPPACK, S. W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 12, p. 4196-4200, 1997.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **J Endocrinol**, v. 222, n. 3, p. R113-127, 2014.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). **Environ Health Perspect**, v. 111, n. 16, p. 1926-1932, 2003.

NASTOS, C.; KALIMERIS, K.; PAPOUTSIDAKIS, N.; TASOULIS, M. K.; LYKOUDIS, P. M.; THEODORAKI, K.; NASTOU, D.; SMYRNIOTIS, V.; ARKADOPOULOS, N. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 906965, 2014.

PALLADINI, G.; FERRIGNO, A.; RICHELMI, P.; PERLINI, S.; VAIRETTI, M. Role of matrix metalloproteinases in cholestasis and hepatic ischemia/reperfusion injury: A review. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 42, p. 12114-12124, 2015.

PARK, S. W.; KIM, M.; BROWN, K. M.; D'AGATI, V. D.; LEE, H. T. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1662-1675, 2011.

POCKLEY, A. G.; HENDERSON, B. Extracellular cell stress (heat shock) proteins-immune responses and disease: an overview. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 373, n. 1738, 2018.

QUESNELLE, K. M.; BYSTROM, P. V.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. **Arch Toxicol**, v. 89, n. 5, p. 651-657, 2015.

SAIDI, R. F.; RAJESHKUMAR, B.; SHARIFTABRIZI, A.; BOGDANOV, A. A.; ZHENG, S.; DRESSER, K.; WALTER, O. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate liver ischemia-reperfusion injury and promote liver regeneration. **Surgery**, v. 156, n. 5, p. 1225-1231, 2014.

SUGA, H.; ETO, H.; AOI, N.; KATO, H.; ARAKI, J.; DOI, K.; HIGASHINO, T.; YOSHIMURA, K. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. **Plast Reconstr Surg**, v. 126, n. 6, p. 1911-1923, 2010.

TAKEUCHI, D.; YOSHIDOME, H.; KUROSAWA, H.; KIMURA, F.; SHIMIZU, H.; OHTSUKA, M.; KATO, A.; YOSHITOMI, H.; FURUKAWA, K.; MIYAZAKI, M. Interleukin-18 exacerbates pulmonary injury after hepatic ischemia/reperfusion in mice. **J Surg Res**, v. 158, n. 1, p. 87-93, 2010.

UCHIYAMA, T.; DELUDE, R. L.; FINK, M. P. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 11, p. 2050-2058, 2003.

VERNA, E. C.; WAGENER, G. Renal interactions in liver dysfunction and failure. **Curr Opin Crit Care**, v. 19, n. 2, p. 133-141, 2013.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W., JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WINER, D. A.; WINER, S.; CHNG, M. H.; SHEN, L.; ENGLEMAN, E. G. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 6, p. 1033-1043, 2014.

ZARBOCK, A.; ROSSAINT, J. Regulating inflammation: ADAM8--a new player in the game. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 12, p. 3419-3422, 2011.

ZHOU, L.; YAO, X.; CHEN, Y. Dexamethasone pretreatment attenuates lung and kidney injury in cholestatic rats induced by hepatic ischemia/reperfusion. **Inflammation**, v. 35, n. 1, p. 289-296, 2012.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética



Bragança Paulista, 29 de Junho de 2017.

Projeto de Pesquisa: "Efeito da Inflamação Sistêmica decorrente da isquemia/reperusão sobre o tecido adiposo visceral de camundongos".

Área de Conhecimento: Farmacologia

Autor(es): Profª Alessandra Gambero; Profª Raquel de Cássia dos Santos

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: 002.11.2015 => versão II

Notificação: Troca da linhagem de camundongos.

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/06/2017- 01/06/2020

Número e Animais: 60

Espécie: camundongos

Linhagem Peso: Heterogênicos Swiss.

Total de Animais: 60 camundongos Macho

Procedência do Animal: CEMIBI - UNICAMP

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião ordinária no dia 29/06/2017 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Mário Angelo Claudino
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco