

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas

NADJANIA SARAIVA DE LIRA SILVA

**IMPACTO DELETÉRIO DA INTERLEUCINA-9 NA FISIOLOGIA
HEPATORENAL**

Uberlândia – MG
2017

NADJANIA SARAIVA DE LIRA SILVA

**IMPACTO DELETÉRIO DA INTERLEUCINA- 9 NA FISIOLOGIA
HEPATORENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientadora: Profa. Ms. Patrícia de Castilhos.

Uberlândia – MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586i

Silva, Nadjania Saraiva de Lira, 1993

2017

Impacto deletério da interleucina-9 na fisiologia hepatorenal /
Nadjania Saraiva de Lira Silva. - 2017.

84 p. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientadora: Patricia de Castilhos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Interleucina 9 - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4.
Stress oxidativo - Teses. I. Silva, Claudio Vieira da, 1972. II. Castilhos,
Patricia de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

DEDICATÓRIA

Ao Espírito Santo todo Poderoso que sempre está ao meu lado, me encorajando e dando força para lutar pelos meus sonhos. Em muitos momentos de solidão foi minha única companhia nesse caminho que escolhi seguir em busca da formação intelectual.

A minha mãe, Maria do Céu, que mesmo com o coração partido ao ver sua filha voar para longe de suas asas, sempre me ajudou nos momentos que mais precisei. A docura do seu olhar, seu coração de mãe e seu espírito de guerreira foram, em muitos momentos, o meu escuto quando eu mesma já não acreditava em mim, principalmente, nos momentos que minha alma se falecia pelo cansaço da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador, Dr. Cláudio Vieira, por me conceder a oportunidade de realizar meu mestrado sob sua orientação. Agradeço infinitamente pela oportunidade e confiança atribuída a mim, acreditando em cada ideia de experimento que surgia em minha cabeça. Obrigada por sempre estar disponível, me auxiliando em todos os momentos de incertezas e dúvidas.

Agradeço a minha coorientadora, Ms. Patrícia de Castilhos, que me acompanha desde a graduação, e sempre me incentivou a lutar pelo meu sonho de fazer mestrado. Obrigada pelos inúmeros conselhos, ajuda, ensinamentos científicos e por sempre estar disponível para ouvir meus desabafos, sempre de forma respeitosa e acolhedora. Em muitos momentos pude encontrar ao seu lado, a presença de uma irmã e grande amiga, principalmente, por eu estar tão longe de casa e muitas vezes sozinha. Muito obrigada!

Meu muito obrigada, a querida Bruna Borges, companheira de laboratório e amiga. Obrigada por sempre me ajudar em tudo que eu preciso, principalmente, por estar presente nos diversos dias de tratamentos dos animais que duraram dois anos. Dois anos em que perdemos nossos finais de semana. Obrigada por ser minha confidente e amiga. Você foi um dos meus melhores

presentes que pude ganhar aqui em Uberlândia, pois sei que encontrei uma grande e eterna amiga.

A Thaise Lara que foi minha terceira irmã mais velha nessa minha estadia em Uberlândia. Sempre esteve disposta a me ajudar nos longos experimentos, apesar das inúmeras obrigações do seu dia a dia. Obrigada por sempre se preocupar comigo, tentando ao máximo me proteger. Agradeço pelos inúmeros conselhos e críticas que me fizeram crescer como pessoa e profissional. Muito obrigada!

A toda família LATRI, incluindo os presentes e aqueles que foram realizar seus sonhos em outros lugares: Alíne, Ana Flávia, Cassiano, Flávia, Júlia, Marlus, Samuel, Silvany, Paula, Rebeca. Vocês fazem meus dias mais coloridos e divertidos. Além de sempre estarem dispostos a me ajudar a qualquer momento e no que for preciso. Todos contribuíram para minha formação como mestra. Muito obrigada!

A todos os funcionários do CBEA pela prestação de serviço e ensinamentos.

Aos meus amigos do programa de Biologia Celular e Estrutural, especialmente, a Francyelle que foi minha colega de classe durante as diversas disciplinas do curso de Mestrado, mas aos poucos se tornou uma grande amiga e parceira. Obrigada por toda ajuda e por suportar minhas diversas mensagens pelo

Whatsapp, sempre tirando dúvidas sobre algum experimento, organização de festas e comemorações. Levarei sempre comigo nossa amizade.

A todos os professores que foram parceiros nessa pesquisa: Renata Zanon, Tatiana Tomíosso, Marcelo Silva e Foued Espíndola. Muito obrigada!

Finalmente, mas, não menos importantes, agradeço as agências de fomentos CNPq, CAPES, FAPEMIG pelo financiamento da presente pesquisa que hoje está sendo apresentada. Muito obrigada!

A ciéncia é a arte que nos leva a enxergar a grandeza de Deus, fazendo nos suspirar de admiração a cada descoberta.

Frase da autora

RESUMO

A IL-9 é uma citocina pleiotrópica, recentemente reconhecida como pertencente às células Th9 que estão envolvidas em diversas patologias. Nós objetivamos avaliar o papel da IL-9 no curso da fibrose hepática e renal. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram tratados, por via subcutânea, com IL-9 100ng e 200ng durante 40 dias, alternando de 5 em 5 dias cada aplicação, cujo controle negativo foi tratado com PBS e controle positivo com CCL₄. IL-9 manifestou atividade fibrogênica, levando aumento da deposição de colágeno I e III tanto no fígado quanto no rim, bem como desencadeou hepatite lobular com a fibrose no estágio 1. Além disso, induziu resposta inflamatória com o recrutamento de linfócitos, neutrófilos e macrófagos em ambos os órgãos. A inflamação foi presente na região da zona portal e parenquimal no fígado, e na zona cortical e medular nos rins. IL-9 regulou a expressão gênica de TGF-β1 e α-SMA, sendo sugerida como possíveis responsáveis pela ativação das células de Ito e miofibroblastos renais. A atividade pró-inflamatória da IL-9 desencadeou estresse oxidativo, levando a oxidação das proteínas e dos lipídios presentes na membrana celular dos hepatócitos e nas células renais. Concomitante, ocorreu diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, bem como da capacidade total antioxidant do fígado e do rim. Nossos resultados sugerem papel deletério da IL-9 no aumento da fibrose hepática e renal, com exacerbação da resposta inflamatória, indicando que a mesma poder ser alvo terapêutico para o tratamento dessas doenças.

Palavras-chave: Fibrose; Fígado; Rim; Inflamação; Interleucina 9; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

IL-9 is a pleiotropic cytokine, recently recognized as belonging to Th9 cells that are involved in various pathologies. We aimed to evaluate the role of IL-9 in the course of hepatic and renal fibrosis. Female C57BL/6 mice were treated subcutaneously with IL-9 100ng and 200ng during 40 days, alternating every 5 days each application, the negative control of which was treated with PBS and positive control with CCL₄. IL-9 demonstrated fibrogenic activity, leading to increased collagen I and III deposition in both liver and kidney, as well as triggering lobular hepatitis with stage 1 fibrosis. In addition, IL-9 induced an inflammatory response with recruitment of lymphocytes, neutrophils, and macrophages in both organs. The inflammation was present in the region of the portal and parenchymal zone in the liver, and in the cortical and medullary zone in the kidneys. IL-9 regulated the gene expression of TGF- β and α -SMA, being responsible for the activation of Ito cells and renal myofibroblasts. The proinflammatory activity of IL-9 triggered oxidative stress, leading to oxidation of proteins and lipids present in the cell membrane of hepatocytes and renal cells. At the same time, there was a decrease in the activity of antioxidant enzymes as well as the total antioxidant capacity of the liver and kidney. Our results suggest deleterious role of IL-9 in the increase of renal and hepatic fibrosis, with exacerbation of the inflammatory response, indicating that it may be a therapeutic target for the treatment of these diseases.

Keywords: Fibrosis; Liver; Kidney; Inflammation; Interleukin 9; Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

AngII – angiotensina II

BSA – Soro albumina bovina

CAT – Catalase

CCL₄ – Tetracloreto de carbono

CCL5 – Ligante de quimiocina 5

CEUA – Comitê de ética para utilização de animais

CTGF – Fator de crescimento de tecido conectivo

DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrozina

ECM – Matriz extracelular

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra – acético

EMT – Transição epitelio- mesênquima

FGF2 – Fator de crescimento de fibroblasto básico

FRAP – Ferric – Reducing Ability

GSH – Glutationa reduzida

H.E – Hematoxilina e Eosina

ICBIM – UFU – Instituto de Ciências Biomédicas da UFU

IFN- γ – Interferon gama

IgE – Imunoglobulina E

IL-1 – Interleucina 1

IL-13 – Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

IL-19 – Interleucina 19

IL-20 – Interleucina 20

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-9 – Interleucina 9

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP1- Proteína quimiotática de monócito

MDA – Malondialdeído

MMP – Metaloproteínase

MMP – 13 – Metaloproteinase 13

MMP – Metaloproteinases

MMP- 12 – Metaloproteinase 12

MMP-9 – Metaloproteinase 9

NK – Células natural killer

PDGF – Fatores de crescimento derivado de plaqueta

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

SOD – Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBM – Membrana basal tubular

TCA – Ácido tricloroacético

TGF-β – Fatores de transformação de crescimento beta

TNB – Tiolato

TNF – Fator de necrose tumoral

TNF-α – Fatores de necrose tumoral alfa

TPTZ – 2,4,6 – Tri (2-piridil-s-triazina)

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Organização interna de um lóbulo interno.....	17
Figura 2. Desenvolvimento da fibrose hepática.....	18
Figura 3. Principais eventos da fibrogênese renal.....	19
Figura 4. Tratamento com IL-9 levou a fibrose hepática e renal nos camundongos C57BL/6.....	37
Figura 5. Tratamento com IL-9 levou a expressão de colágeno I e III em tecido hepático e renal nos camundongos.....	38
Figura6. Análise histológica no número de mastócitos no tecido renal.....	39
Figura 7. Fotomicrografias, dados apresentados na tabela1, referentes a regiões típicas e representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, provenientes do tecido hepático dos camundongos tratados com PBS, CCL ₄ , IL-9 100ng e 200ng.....	40
Figura 8. Fotomicrografias, dados apresentados na tabela2, referentes a regiões típicas e representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, provenientes do tecido renal dos camundongos tratados com PBS, CCL ₄ , IL-9 100ng e 200ng.....	42
Figura 9. O tratamento com IL-9 aumentou a expressão de TGF- β e α -SMA no rim.....	45
Figura 10. IL-9 diminuiu a carbonilação das proteínas hepáticas.....	46
Figura11. IL-9 diminuiu a atividade das sulfidrilas tanto no fígado quanto no rim.....	47
Figura 12. O tratamento com IL-9 a 200ng alterou os níveis de GSH tanto no fígado quanto no rim.....	48

Figura 13. O tratamento com IL-9 a 200ng alterou os níveis de peroxidação lipídica no fígado no rim.....	48
Figura 14. Catalase teve sua atividade aumentada no fígado dos animais tratados com IL-9 200ng.....	49
Figura 15. Superóxido dismutase teve sua atividade alterada no rim dos animais tratados com IL-9 200ng.....	50
Figura 16. O tratamento com IL-9 alterou o equilíbrio antioxidante total no fígado e no rim.....	50

TABELAS

Tabela 1: Análise qualitativa do infiltrado de células no tecido hepático de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL ₄	41
Tabela 2: Análise qualitativa do infiltrado de células no tecido renal de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL ₄	43
Tabela 3: Gradiente histológico e estágio da hepatite crônica de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL ₄	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1. FIBROSE HEPÁTICA E RENAL	17
1.2. MEDIADORES CELULARES NA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E RENAL ..	23
1. 3. PAPEL DAS CITOQUÍNAIS NA FIBROSE HEPÁTICA E RENAL.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS	29
3.1.1 Animais.....	29
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.2.1 Reconstituição da IL-9.....	29
3.2.2 Diluição do tetracloreto de carbono.....	29
3.2.3 Grupos experimentais	30
3.3. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	30
3.3.1 Quantificação da fibrose hepática e renal	30
3.3.2 Quantificação de mastócitos hepáticos e renais	31
3.3.3 Avaliação qualitativa da resposta inflamatória.....	31
3.3.4 Avaliação do escore necroinflamatório da hepatite crônica	31
3.4 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL - (RT-PCR)	32
3.5 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
3. 5.1 Biomarcadores não enzimáticos do estresse oxidativo	33
3.5.3 Dosagem total de proteína	36
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS	37

6.1 IL-9 em diferentes concentrações aumenta a fibrose tecidual tanto no fígado quanto no rim de camundongos C57BL/6	37
5.2 A IL-9 não alterou a quantidade de mastócitos no rim dos camundongos C57BL/6	39
5.3 A IL-9 induziu uma inflamação nos tecidos hepáticos e renais dos camundongos C57BL/6.	40
5.4 Tratamento com IL-9 induziu hepatite com fibrose em estágio inicial	45
5. 5 O tratamento com IL-9 regulou a expressão gênica de TGF- β 1 e α -SMA em tecido hepático e renal	45
5.6 IL-9 alterou o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em tecido hepático e renal	46
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	62
8 REFERÊNCIAS	63
ANEXO 1	85

1 INTRODUÇÃO

1.1. FIBROSE HEPÁTICA E RENAL

A fibrose hepática ocorre como resultado de uma lesão crônica no fígado, desencadeando um aumento na síntese de componentes da matriz extracelular que acaba preenchendo todo o espaço antes ocupado pelos hepatócitos (TUNG-HUNG; JIA-HORNG; CHUN-JEN, 2014). A contínua lesão nos hepatócitos leva a cirrose que é o estágio final da doença (FRIEDMAN, 2003).

A cirrose resulta de diversos estímulos crônicos como: hepatite viral, distúrbios metabólicos, abuso de álcool, resposta autoimune no fígado, entre outros (LIAW et al., 2004; TUNG-HUNG; JIA-HORNG; CHUN-JEN, 2014). Essa doença corresponde a 45% do total de mortes relacionadas à doença hepática nos países desenvolvidos, devido, principalmente, a fibrose hepática gordurosa, que acomete 30% da população dos Estados Unidos (WYNN, 2008; LAZO et al., 2011).

A fibrose hepática inicia-se com a morte dos hepatócitos, consequentemente desencadeando um processo inflamatório com o recrutamento de células de defesa para o local lesionado e secreção de citocinas inflamatórias e quimiocinas. O fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de transformação de crescimento beta (TGF)- β , o fator de necrose tumoral alfa (TNF) – α e a interleucina (IL)-1, que ativam as células de Ito (células que armazenam vitamina A e que estão localizadas no espaço de Disse, em contato direto com os hepatócitos e com o epitélio sinusoidal no fígado) (**Figura 1**), intensificam a progressão da fibrose hepática e contribuem na deposição de colágeno.

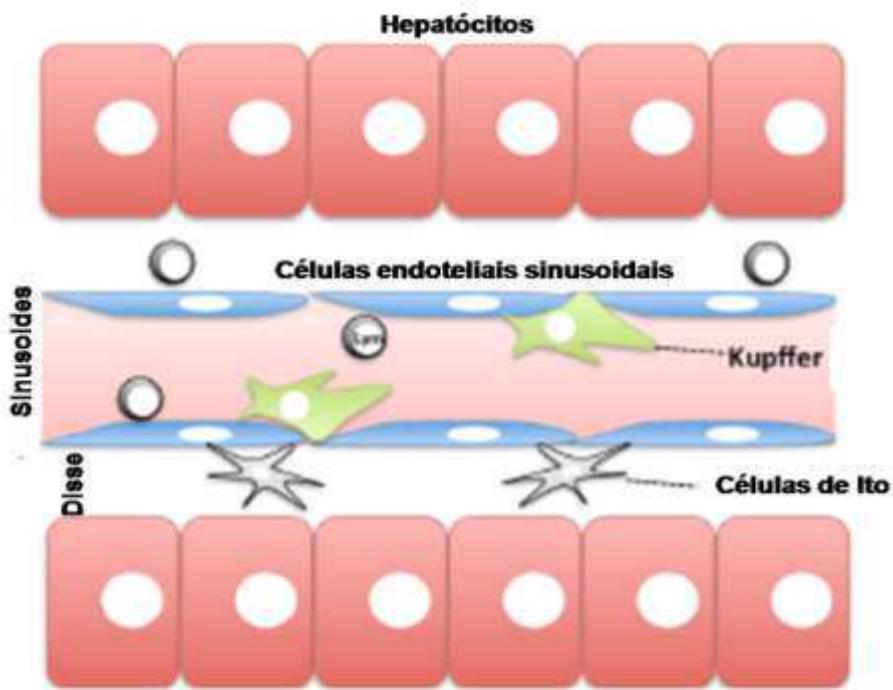
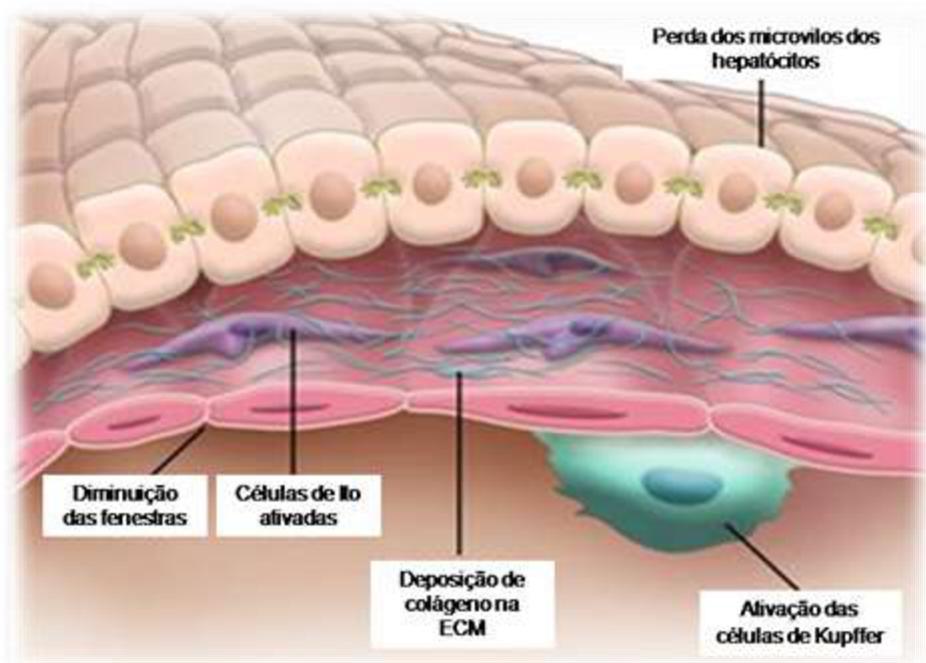


Figura 1: Organização interna de um lóbulo hepático. Entre as placas de hepatócitos contêm capilares denominados de sinusoides hepáticos que são compostos por células endoteliais fenestradas. Nos sinusoides encontramos importantes células do sangue, entre elas macrófagos residentes no fígado, células de Kupffer. Entre as placas de hepatócitos e os capilares sinusoides existe o espaço de Disse, que contém os microvilos dos hepatócitos e as células de Ito que são responsáveis por armazenar retinoides, além de sintetizar diversas proteínas da ECM. Adaptado de (TSUTSUI; NISHIGUCHI, 2014).

A ativação das células de Ito resulta em sua proliferação, migração e diferenciação em miofibroblastos que expressam α -actina do músculo liso (α -SMA), bem como estimula a mesma a sintetizar colágeno, principalmente do tipo I e III, na matriz extracelular (Figura 2) (OAKLEY et al., 2005). À medida que a fibrose avança no órgão, ocorre uma alteração no funcionamento adequado do fígado que consequentemente afeta a atividade de outros órgãos, sendo que as principais complicações dessa doença incluem ascite, encefalopatia hepática, e principalmente distúrbio renal (DAVIS et al., 2003).



Fígura 2: Desenvolvimento da fibrose hepática. A injúria nos hepatócitos por substâncias tóxicas ou outros fatores resulta no recrutamento e estímulo de células inflamatórias, além de ativar as células inflamatórias residentes (células de Kupffer). Citocinas liberadas por essas células leva ativação das células de Ito, consequentemente, se diferencia em miofibroblastos, no qual inicia síntese e secreção de colágeno e outras proteínas na ECM no espaço de Disse, que contribui para formação da fibrose no local. Adaptado de (IRADELE, 2007).

O rim é um dos principais órgãos que acaba sendo comprometido pelo mau funcionamento do fígado, entretanto, outros fatores podem afetá-lo levando ao estágio crônico renal que é caracterizado pela fibrose. As principais etiologias são: infecções, compostos xenobióticos, toxinas, obstrução mecânica, complexos imunes que resultam de doenças autoimunes ou infecções crônicas, bem como doenças genéticas. Outras causas freqüentes, principalmente em países desenvolvidos, são diabetes mellitus tipo 2, nefropatia hipertensiva/isquêmica e cirrose (GO et al., 2004).

Essas diversas etiologias afetam três compartimentos funcionais do rim: vascularização, glomérulos e túbulo-intersticial que são responsáveis pela entrega de sangue e filtrado plasmático. Consequentemente, todos os pacientes com doença renal crônica apresenta um declínio na função renal com o tempo, chegando a um estado irreversível, estágio final renal, o que requer diálise ao longo da vida ou transplante de rim (SNYDER et al., 2004).

Independente da causa primária que leva ao dano renal, a fibrose intersticial é um processo comum que resulta na ativação dos fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos, expressando α - actina do músculo liso (α -SMA), sendo a principal fonte de acúmulo de matriz intersticial dessa doença (LIU, 2004). O continuo acúmulo de matriz extracelular (ECM) leva a difusão da fibrose, consequentemente, destrói as células parenquimatosas e compromete a função do órgão (SCHIEPPATI; REMUZZI, 2005) (Figura 3).

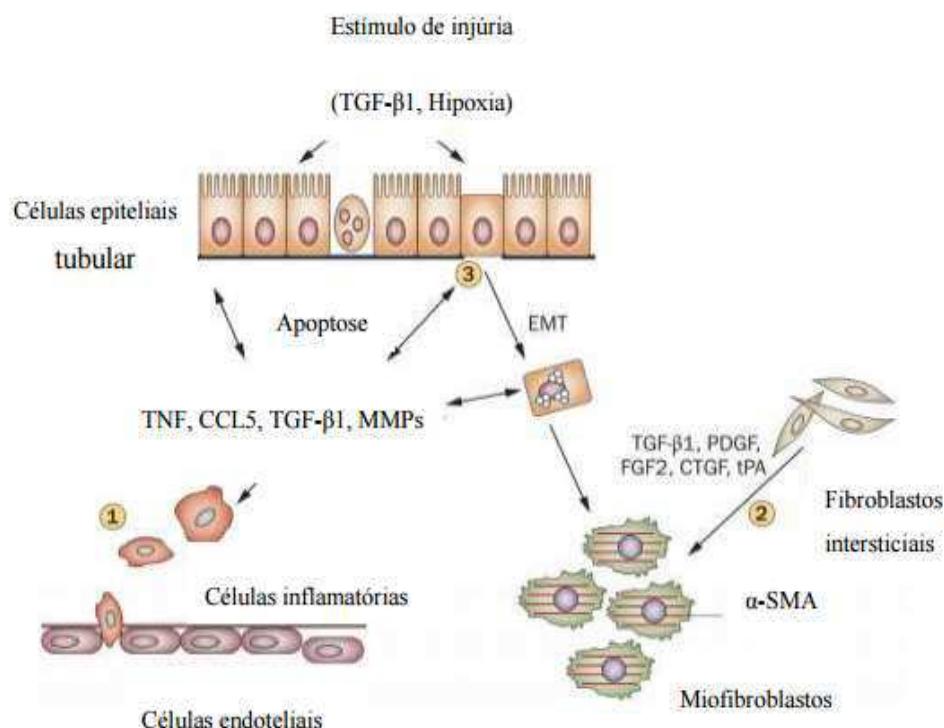


Figura 3: Principais eventos da fibrogênese renal: (1) Infiltrado peritubular das células inflamatórias, principalmente, células T e macrófagos, sendo o evento inicial da fibrogênese. (2) Ativação dos miofibroblastos. A maioria dos miofibroblastos que produz matriz extracelular é gerada a partir da ativação local dos fibroblastos interticiais. (3) Apoptose das células tululares e de células EMT leva a atrofia tubular. Abreviação: α - SMA, α actina do músculo liso, AngII, angiotensina II; CCL5, ligante de quimiocina 5; EMT, transição epitélio – mesenquima; FGF2, fator de crescimento de fibroblasto básico; MMP, metaloproteínases; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF-β1, fator de transformação de crescimento β1; TNF, fator de necrose tumoral; tPA, ativador de tipo de plasminogênio-tecidual. Adaptado de (LIU, 2011).

A ECM é composta de uma complexa rede de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos que atuam nas propriedades biofísicas e bioquímicas do tecido (HYNES, 2009). Todas essas moléculas da ECM exercem certas atividades no funcionamento biológico da célula, e quando sintetizadas em excesso desorganizam a dinâmica da

ECM, levando a uma arquitetura anormal. Essa dinâmica anormal da ECM está relacionada ao desenvolvimento de diversas patologias, entre elas a fibrose. Em ambas as situações ocorrem o aumento da deposição de proteínas, principalmente de colágeno I, III, IV, bem como uma diminuição de outras proteínas como as metaloproteinases (MMT),, sendo que sua diminuição favorece ao aumento excessivo de ECM, uma vez que a mesma é responsável pela degradação do colágeno (NORTON et al., 2005; BUTCHER et al., 2009; FRANTZ et al., 2010).

Existem mais de 28 diferentes tipos de colágenos humano, de diferentes formas e tamanho (KADLER et al., 2007). O colágeno é uma molécula composta de três cadeias polipeptídicas α hélice, cada uma contém uma ou mais regiões repetidas modificadas de aminoácidos (Gly-X-Y), onde as cadeias X e Y podem ser qualquer tipo de aminoácidos. A partir da modificação do aminoácido em certas cadeias α , o colágeno pode ser homotrimérico, consiste de três idênticas cadeias α , colágeno II e III, ou heterotípico, com três distintas cadeias, colágeno I (HULMES, 2008).

O colágeno constitui cerca de 30% do total de proteínas no corpo humano, sendo que na fibrose hepática ocorre aumento entre 4 a 7 vezes no conteúdo total de colágeno no tecido (FRANTZ et al., 2010). Os colágenos dos tipos I, III são os mais sintetizados pelas células de Ito e pelos miofibroblastos hepáticos e renais (MURATA et al., 1984).

Os colágenos I e III são sintetizados por miofibroblasto de diferentes origens e localização anatômica. Miofibroblasto portal e veias portal produzem grandes quantidades de colágenos I e III, entretanto, miofibroblastos e as células de Ito presentes no espaço de Disse produzem mais colágeno I, formando, assim, o septo fibroso porta-portal (POONKHUM et al., 2011).

Processo semelhante ocorre em um rim lesionado, como aumento da deposição de componentes da matriz extracelular, principalmente, colágeno I e III substituindo espaço antes ocupado pelas células parenquimatosas (TUNG-HUNG; JIA-HORNG; CHUN-JEN, 2014). Esse processo ocorre como uma resposta à injúria, ajudando no processo de reparo e remodelamento do tecido que resultam no recrutamento de leucócitos, angiogênese, aparecimento de miofibroblastos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GABBIANI; MAJNO, 1972).

Alguns estudos vêm mostrando que existe uma relação entre a formação de ROS e a resposta fibrogênica, atuando na regulação da ECM e na desdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos – α -SMA (ZHOU et al., 2010; SAMPSON et al., 2011). O aumento elevado na produção de ROS leva ao estresse oxidativo que ocorre devido a

uma desregulação do balanço entre a resposta oxidante-antioxidante, resultando na morte celular. A maioria das células tem uma leve capacidade de tolerar o estresse oxidativo devido à existência de mecanismos moleculares que reconhecem e removem moléculas de danos derivado da oxidação (DROGE, 2003). Quando a célula perde a capacidade de gerar uma resposta antioxidant, ocorre a super-expressão de ROS que lesionam as camadas de lipídios na membrana, a estrutura das proteínas, bem como ativa a via de apoptose celular (PERRY et al., 2000).

O fígado é o principal órgão afetado pelas ROS que agem diretamente nas células parenquimais durante uma injúria hepática (SANCHEZ-VALLE et al., 2012). Na progressão da injúria hepática há aumento da produção de ROS que ativam as células de Ito, induzindo a secreção de componentes da matriz extracelular, principalmente, colágeno (OKUNO et al., 2002). O gene do colágeno tipo I é regulado pela quantidade de ROS, além de diversos outros fatores que interagem com citocinas contribuindo para ativação das células de Ito durante a inflamação (FRIEDMAN, 2008). Além das células de Ito, as células de Kupffer e as células endoteliais são mais expostas ou sensíveis as moléculas relacionadas ao estresse oxidativo (SAKAGUCHI et al., 2011; WU et al., 2009).

O aumento do estresse oxidativo é resultado de várias doenças hepáticas, por exemplo, hepatite viral crônica, doenças hepáticas alcoólica, esteatohepatite não-alcoólica e fibrose hepática (SINGAL et al., 2011). Durante a doença hepática, outros órgãos são lesionados devido ao estresse oxidativo, levando as lesões cerebrais e, principalmente, distúrbios nos rins, desempenhando um papel crítico na patologia de diversas doenças renais (WANG et al., 2015).

ROS desempenham um papel crítico no curso da injúria renal aguda e crônica, bem como na progressão da fibrose que está associada com aumento do estresse oxidativo (KIM et al., 2008). NADPH oxidase é importante enzima responsável pela geração de ROS, e tem sido reconhecida como mediadora chave na proliferação celular e acúmulo de matriz na fibrose renal. Essa enzima tem sido encontrada em diferentes tipos de células renais como: células mesangiais, túbulos renais, células endoteliais e fibroblastos estando envolvida no desenvolvimento da fibrose túbulo interticial via ativação do fator transcricional Smad2 e miofibroblastos (DJAMALI et al., 2009; BARNES; GORIN et al., 2011).

1.2. MEDIADORES CELULARES NA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E RENAL

Durante uma resposta inflamatória no fígado e/ou no rim, as células do sistema imunológico se comunicam por meio de mediadores químicos, principalmente, citocinas que atuam numa complexa rede de sinalização ativando as células de Ito ou miofibroblastos renais que levam a síntese de colágeno, consequentemente a formação de fibrose (ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

A fibrose hepática é acompanhada por inflamação e atividade do sistema imune inato e adquirido, que são fundamentais para regulação do processo fibrótico (PELLICORO et al., 2014). Durante injúria dos hepatócitos ocorre a liberação de mediadores inflamatórios que recrutam células do sistema imune. Os leucócitos recrutados para o local da injúria, fagocitam células mortas ou apoptóticas, bem como amplificam a resposta inflamatória a partir da secreção de citocinas inflamatórias como TNF, interleucina- 6 (IL-6), IL-1 β e células T, entre outras (MUHANNA et al., 2008).

Estudos mostram que células imunes podem, principalmente os macrófagos, regular tanto a progressão, quanto a regressão da fibrose hepática (MUHAMMA et al., 2008). Os tipos de macrófagos que atuam na fibrose hepática são classificados como macrófagos heterogêneos a partir da sua localização: macrófagos residentes, célula de Kupffer, e infiltrados de macrófagos derivados da medula-óssea, monócitos circulantes (ZIMMERMANN et al., 2012).

As células de Kupffer que estão localizadas nos sinusoides hepáticos permitem uma interação com células hepáticas não parenquimais, influenciando em suas diferenciações em miofibroblastos (WEHR et al., 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as células de Kupffer podem ativar as células de Ito a se diferenciar em miofibroblasto, por meio de via parácrina. Essa via parácrina ocorre por meio da liberação de citocinas profibrótica TGF- β e mitogênica PDGF (PRADERE et al., 2013). Essas células também contribuem no processo de regeneração do fígado, através da secreção de metaloproteinases 9, 12 e 13 (MMP-9, MMP-12, MMP-13) que promovem a degradação da matriz extracelular e assim, ajuda na diminuição da fibrose (FALLOWFIELD et al., 2007; PELLICORO et al., 2012).

Ide et al. (2005) mostraram em seu estudo *in vivo* que a depleção de macrófagos residentes em ratos resulta na diminuição na ativação de miofibroblastos, consequentemente, a fibrose tecidual. A depleção dos macrófagos durante contínua

injúria no fígado leva a uma diminuição no número de miofibroblastos derivados de células de Ito, atenuando a fibrose, indicando que os macrófagos possuem papel pró-fibrogênico (DUFFIELD et al., 2005).

As células natural killer (NK) são outras células do sistema imunológico que participam no processo da fibrogênese hepática. Essas células no fígado estão localizadas nos sinusoidais hepáticos, ligados com as células não parenquimatas (VANDERKERKEN et al., 1993). As células NK lisam as células de Ito ativadas ou senescentes, mas não as quiescentes ou aquelas diferenciadas em miofibroblastos. Durante a injúria dos hepatócitos, as células NK secretam IFN- γ que induz apoptose das células de Ito, bem como bloqueia o ciclo celular e, subsequentemente, inibe a fibrose hepática (VANDERKERKEN et al., 1993; GAO; RADAЕVA, 2013). Essa ação apoptótica se dá devido à diminuição da expressão das moléculas MHC-I pelas células de Ito, que é ligante inibitório das células NK (MELHEM et al., 2006).

Em relação ao rim, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com intuito de compreender os mecanismos que regulam a fibrose renal, focando na atuação de citocinas e células do sistema imunológico (LONNEMANN et al., 1995; BIHORAC et al., 2013).

O recrutamento e ativação dos linfócitos T podem ser importantes eventos que atuam na fase inicial da fibrogênese renal, contribuindo com o fluxo dos macrófagos na injúria renal (TAPMEIER et al., 2010). Niedermeier et al. (2009) mostraram que camundongos deficientes de linfócitos T, bem como camundongos tipo selvagem tratados com anticorpos anti-CD4 tem uma redução significativa na deposição de colágeno I durante obstrução renal. Entretanto, a reconstituição de células T CD4 $^{+}$ em camundongos knockout RAG1 levou a fibrogênese após a injúria (TAPMEIER et al., 2010).

Além dos linfócitos T, outros tipos de células do sistema imunológico residem no rim, entre elas se destacam as células dendríticas, macrófagos e mastócitos que são responsáveis por manter a homeostase no rim, entretanto, encontram em pequenas populações (WOLTMAN et al., 2007).

Em condições normais, os macrófagos localizam na medula renal e na cápsula, já as células dendríticas encontram-se no túbulo intersticial (KRUGER et al., 2004; NELSON et al., 2012). Os macrófagos intra-renal exercem função homeostática a partir da fagocitose de抗ígenos no rim, participando tanto do processo inflamatório quanto anti-inflamatório, bem como regula a resposta imune no rim.

Os macrófagos M1 apresentam atividade pró-inflamatória, produzindo diversas citocinas que desencadeiam o dano tecidual e fibrose nos rins. A depleção de macrófagos leva ao melhoramento da fibrose renal após vários insultos, cuja transferência adotiva de macrófagos leva ao agravamento da lesão fibrótica (LIN et al., 2009).

Acredita-se que o grau de severidade da fibrose renal esteja relacionado com infiltrado de macrófagos ativados, visto que os mesmos secretam citocinas pró-fibróticas e pró-inflamatória como TGF- β e TNF- α (EDDY 1995; KITAMOTO et al. 2009). Esses macrófagos induzem apoptose nas células epiteliais tubulares via TNF- α e TGF- β , bem como produz ROS que são responsáveis por intensificar a injúria tubular (MISSERI et al. 2005). Células endoteliais também entram em apoptose, consequentemente os fibroblastos diferenciam em miofibroblastos, o que resulta na sintetize e secreção de colágeno na ECM, levando a fibrose no tecido (IWANO et al. 2002).

Já os mastócitos que residem, principalmente, na cápsula renal, participam de diversos processos patológicos renais (NELSON et al., 2012). Ratos deficientes de mastócitos apresentaram uma extensa área de fibrose intersticial no rim comparado com os ratos normais (KANAMARU et al., 2006). Entretanto, ainda carece de muitos estudos sobre atuação da resposta inflamatória dos mastócitos no curso da fibrose renal.

1. 3. PAPEL DAS CITOQUINAS NA FIBROSE HEPÁTICA E RENAL

As citocinas são importantes glicoproteínas sintetizadas pelas células do sistema imune que atuam no desenvolvimento e progresso de diversas doenças crônicas que acometem variados órgãos, entre eles, o fígado e o rim (WYNN, 2008).

Uma importante citocina é TGF- β 1 que é conhecida por induzir fibrogênese em diversos órgãos lesionados, sendo sintetizado pelas células de Ito, células de Kupper (KC), miofibroblastos hepáticos e renais e macrófagos (KIRMAZ et al, 2004). O TGF- β 1 estimula essas células a sintetizar componentes da matriz extracelular, principalmente, colágeno (LI et al., 2015).

No rim, o TGF- β 1 liga com receptores presentes nas células glomerular e desencadeia uma cascata de sinalização que ativa inúmeros genes, amplificando o efeito biológico. Com uma inativação do receptor TGF- β , a migração e a diferenciação das células parenquimáticas em miofibroblasto são cessadas, e consequentemente, não há uma

progressão no processo de reparo de feridas no tecido, diminuindo a fibrose renal (BORDER; NOBLE, 1994).

Igualmente, TNF- α está envolvido ativamente na progressão da fibrose renal, uma vez que ratos com problemas renais foram tratados com uma substância que neutraliza a ação dessa citocina, consequentemente, houve uma redução na inflamação, na pressão sanguínea, bem como na fibrose renal (THERRIEN et al. 2012). Além disso, TNF- α juntamente com interferon gama (IFN- γ) que são produzidos por macrófagos M1 promovem estresse oxidativo e o desenvolvimento da fibrose renal (RICARDO; VAN, 2008).

Outras citocinas como interleucina 19 (IL-19) e interleucina 20 (IL-20) foram detectadas em grandes quantidades em amostras de sangue obtidas de pacientes com doença crônica renal, sendo correlacionadas com a patologia dessa doença (JENNINGS et al., 2015)

No fígado, a IL-1 é importante citocina que participa na resposta inflamatória nesse órgão, visto que controla a progressão da injúria hepática para fibrogênese através da ativação das células de Ito (GIELING, WALLACE, HAN, 2009).

A interleucina 9 (IL-9) é uma citocina produzida pelos linfócitos CD4 $^{+}$ de diferentes perfis Th2, Th17 e Th9, esta última a sintetiza em maiores quantidades. Os linfócitos CD4 $^{+}$ perfil Th9 estão presentes em processos fisiológicos, patológicos e inflamatórias, aumentando o número de linfócitos, eosinófilos e mastócitos, bem como estimulando a secreção de imunoglobulina E (IgE) (SOUSSI-GOUNNI et al., 2001).

Essa citocina atua em vários tipos de inflamações como mostrou Gregersen et al. (2013), observando que o processo de arterosclerose da coronária e da carótida está relacionado com aumento do nível da IL-9, sendo mediada pela interleucina 17 (IL-17) que estimula as Th9 a liberá-la. Além de ser mais expressa em arteroscleroses, existem relatos de que IL-9 está relacionada com asma, doença alérgica pulmonar, doença respiratória epitelial (ARRAS et al., 2001; GU et al., 2015).

Entretanto, alguns estudos vêm mostrando que a IL-9 pode ter um efeito anti-inflamatório e anti-fibrótico. Alves (2015) tratou camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*, durante 15 dias com IL-9 a 2,5ng/g de peso corporal do animal, observando que essa citocina foi capaz de diminuir a fibrose cardíaca durante a fase aguda da infecção, bem como aumentou a síntese de citocinas do perfil Th1 (IL-12, IFN- γ e TNF- α), que foram responsáveis pelo controle da parasitemia. Esses dados mostram um possível papel protetor da IL-9 durante a fase aguda da infecção.

Arras et al. (2001) observaram efeito semelhante em seus experimentos realizados com camundongos que expressavam alta quantidade de IL-9, desenvolviam asma bronquial. Nesses camundongos a severidade da fibrose pulmonar foi menor em relação ao grupo controle. Igualmente, quando injetado IL-9 intraperitoneal em camundongos houve redução da amplitude da fibrose pulmonar induzida pela sílica.

Observa-se a partir de diversas pesquisas que o papel da IL-9 apresenta papel pleiotrópico, no qual exerce diferentes atividades dependendo do tipo celular, bem como do tipo de resposta imunológica (ARRAS et al., 2001; GU et al., 2015; ALVES, 2015). Apesar de intensas pesquisas com essa citocina, não se tem conhecimento preciso da sua atuação e impacto no desenvolvimento da fibrose hepática e renal, sendo esse o primeiro trabalho a mostrar seu envolvimento nessa doença.

Estudos envolvendo a atividade da IL-9 contribuem no entendimento do mecanismo imunológico mediado pela mesma durante a progressão da fibrose hepática e renal, bem como da sua ação protetora e/ou prejudicial no organismo. Além disso, ajuda significativamente no estabelecimento de novas intervenções terapêuticas, uma vez que o único tratamento disponível para os pacientes com fibrose no estágio crônico é o transplante de órgão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial fibrogênico da IL-9 no sistema hepatorenal em modelo murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar ação fibrogênica da IL-9 em diferentes concentrações no fígado e no rim de camundongos C57BL/6 fêmeas;
- Realizar uma análise qualitativa e quantitativa do infiltrado de células inflamatórias no tecido hepático e renal dos animais tratados com IL-9 em diferentes concentrações, bem como nos seus respectivos grupos controles;
- Avaliar a modificação no Índice de Atividade Histológica no grau e na área da hepatite crônica no tecido hepático dos animais tratados com IL-9 em diferentes concentrações, bem como nos seus respectivos grupos controles;
- Quantificar a expressão gênica de TGF- β 1 e α -SMA no tecido hepático e renal dos animais tratados com IL-9 a 200ng;
- Avaliar o perfil de estresse oxidativo através da atividade de biomarcadores não enzimáticos, das enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidant total no tecido hepático e renal dos animais tratados com IL-9 a 200ng.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

No presente estudo, todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com número do protocolo 082/16 (Anexo1).

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (Blocos 2B, sala 200) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM-UFU).

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com 6-8 semanas de idade, mantidos no Centro de Bioterismos e Experimentação Animal (CBEA) na UFU, campus Umuarama, sob condições padrão de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro) em temperatura controlada ($25\pm2^{\circ}\text{C}$) bem como comida e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical após serem anestesiados, conforme as normas do CEUA.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Reconstituição da IL-9

A citocina recombinante murina IL-9 foi reconstituída através da diluição da amostra em 1mL de água de injeção ficando na concentração de 10.000 ng/mL conforme orientação do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente, a IL-9 foi diluída em tampão fosfato (PBS), nas concentrações de 100ng e 200ng. Cada animal recebia por via subcutânea 100 μL de IL-9 durante 40 dias.

3.2.2 Diluição do tetracloreto de carbono

O tetracloreto de carbono (CCL₄) (Sigma, St. Louis, MO) foi utilizado para induzir fibrose no fígado e no rim nos animais experimentais, sendo o controle positivo do experimento. O CCL₄ foi diluído em óleo de Oliva (1:10), na proporção 1 $\mu\text{L}/\text{g}$ do peso corporal do animal (OGAWA et al., 1992; KNIGHT et al., 2011). Por via subcutânea, cada animal recebeu 160 μL de CCL₄ durante 40 dias.

3.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos: controle e experimento. O grupo controle foi subdividido em 2 subgrupos (n =5):

- **Subgrupo 1:** Animais tratados com tampão fosfato salino (PBS);
- **Subgrupo 2:** Animais tratados com CCL₄.

O grupo experimento foi subdividido em 2 subgrupos (n =5):

- **Subgrupo 1:** Animais tratados com IL-9 a 100ng/animal;
- **Subgrupo 2:** Animais tratados com IL-9 a 200ng/animal.

Os camundongos foram tratados com CCL₄, alternando de dois e dois dias durante 40 dias, sendo que no 41^a os mesmos foram eutanasiados. Processo semelhante foi realizado no grupo tratado com IL-9 e PBS, entretanto, sendo alternado de cinco em cinco dias o período da administração de tais substâncias. No 41^a, os mesmos foram eutanasiados para retirada do fígado e do rim para análise histológica e bioquímica.

3.3. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

As amostras de tecidos do fígado e do rim foram fixadas em formaldeído tamponada a 4% durante uma semana, posteriormente, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (TOLOSA et al., 2003). Em seguida foram realizados com auxílio de um micrótomo, cortes histológicos com 4µm de espessura, sendo corados e depois montados em lâminas de vidro para observação em microscópio de luz.

3.3.1 Quantificação da fibrose hepática e renal

Para análise do papel fibrogênico da IL-9 no fígado e no rim através da quantificação total de colágeno, bem como colágeno I e III, os cortes foram submetidos à coloração em Picrossirus Red, que permite identificar as fibras de colágeno depositadas no tecido (FREITAS-FILHO et al., 2006).

A análise da quantidade total de fibras colágenas por área foi realizada por meio do Color Threshod do software Image J a partir de imagens digitais obtidas de 20 campos aleatórios de cada corte/animal em microscópio óptico com câmera acoplada Leica DM500 (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, HE, Alemanha), no aumento de 40x.

Para quantificação de colágeno I e III, foi utilizado microscópio óptico com luz polarizada acoplada ao analisador de imagem digital para quantificação da área por diferença de cor. Nesse sistema, o grau de birrenfrigênciadas fibras colágenas é avaliado através da intensidade de cor, no qual se delimita as faixas de espectros correspondentes a coloração do colágeno I e III. As fibras colágenas do tipo I emitem cor vermelha e as fibras colágenas III emite cor verde, sendo que a sobreposição das cores emite cor amarelada para alaranjada (JUNQUEIRA et al., 1979).

As imagens digitais foram obtidas em 20 campos aleatórios de cada corte/animal no aumento de 20X, sendo posteriormente, analisado a intensidade de fibras colágenas I e III através de Threshod pelo software Image J.

3.3.2 Quantificação de mastócitos hepáticos e renais

Os cortes histológicos do fígado e do rim foram corados com Azul de Toluidina para contagem total de mastócitos por campo, 20 campos aleatórios por animal, através da microscopia óptica de luz com câmera acoplada Leica DM500, utilizando objetiva de 40X de aumento (HAMMAN et al., 1994).

3.3.3 Avaliação qualitativa da resposta inflamatória

Avaliação qualitativa da resposta inflamatória foi observada a partir do tipo e severidade do infiltrado inflamatório em cortes histológicos do fígado e do rim corados com Hematoxilina e Eosina (H.E). O tipo e a severidade do infiltrado inflamatório foram determinados pela ausência ou presença (P) de (i) resposta inflamatória, (ii) neutrófilos, (iii) macrófagos, (iv) linfócitos, (v) células plasmáticas, (vi) células gigantes do corpo estranho, (vii) tecido necrosado, (viii) edema, (ix) adipócito e (xi) degeneração hidrópica. Essas características foram avaliadas por intensidade: (-) ausente, (+) leve, (++) moderada e (+++) intensa. Todas as análises foram feitas com a objetiva de 40X de aumento, em ensaio duplo cego independente.

3.3.4 Avaliação do escore necroinflamatório da hepatite crônica

Os cortes histológicos do fígado foram corados com Tricomo de Masson e H.E para avaliação da modificação no Índice de Atividade Histológica (IAH) na graduação, intensidade da atividade necro-inflamatória, e na área, mensuração da fibrose e da alteração da arquitetura, da hepatite crônica de acordo com Ishak (1995).

No IAH, através da coloração de H.E., foi avaliado quatro tipos de modificações histopatológicas: hepatite na interface periseptal ou portal, confluência da necrose, necrose lítica focal, apoptótica ou inflamação focal e inflamação portal; sendo acessadas separadamente, recebendo valores números individuais que variam de 0 a 4 (hepatite na interface periseptal ou portal, necrose lítica focal, apoptótica ou inflamação focal e inflamação portal) e de 0 a 6 (confluência da necrose). Já o IAH, Tricomo de Masson, referente à modificação da área foi avaliado a mudança da arquitetura, presença de fibrose e cirrose, recebendo valores números que variam de 0 a 6. Esses valores numéricos da classificação IAH correspondente a ausente, mínima, leve, moderada e severa da hepatite crônica, ou seja, quanto maior o valor do grau e da área mais severa a hepatite crônica, e quanto menor, mais leve a hepatite.

3.4 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL - (RT-PCR)

O RNA total do tecido hepático e renal foi extraído utilizando o Kit de extração automático *Maxwell 16 LEV* para tecido (Promega), seguindo as instruções do Fabricante. Posteriormente, cDNA foi sintetizado através *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). RT-qPCR foi realizado utilizando o sistema SYBR® Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems) através do ABI 7300 (Applied Biosystems), sendo que os dados obtidos foram analisados no SDS Software v 1.4.1 (Applied Biosystems).

Em relação as sequências dos iniciadores específicos para os genes, esses foram desenhados utilizando alinhamentos de sequências obtidas a partir do GenBank (NIH/NCBI) com o auxílio da ferramenta IDT Primer Quest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>; San Diego, CA), com validação a partir das ferramentas Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Bethesda, USA) e Standart NucleotideBLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, Bethesda, USA) para confirmar especificidade.

Os genes avaliados foram:

- **TGF- β 1** – (F) CTCCCGTGGCTTAGTGC
(R) GCCTTAGTTGGACAGGATCTG
- **α -SMA** – (F) AACACAGGAATACGACGAAG
(R) CAGGAATGATTGGAAAGGA

3.5 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

As amostras de fígado e rim provenientes de animais tratados com IL-9 a 200ng, bem como seus respectivos controles foram homogeneizadas com o homogeneizador para tecidos tipo *Potter* em tampão de homogeneização (20 mM de tampão fosfato de sódio e 140 mM de KCl, pH 7.4) na proporção 1:10 p/v. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a realização das dosagens dos parâmetros de estresse oxidativo, biomarcadores não enzimáticos: Proteína carbonilada, sulfidrila, glutationa reduzida e peroxidação lipídica, bem como da atividade das enzimas antioxidantes: Catalase e superóxido dismutase e a capacidade antioxidante total.

3.5.1 Biomarcadores não enzimáticos do estresse oxidativo

3.5.1.1 Determinação da carbonilação protéica

Através de reagentes específicos para grupos carbonila é realizada a detecção e quantificação de oxidação catalisada por metais. No presente método foi usado a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) um reagente clássico, que reage com as carbonilas de proteínas oxidadas (REZNICK e PACKER, 1994). A DNPH foi precipitada com 10% de ácido tricloroacético (TCA), lavado com etanol-acetato de etilo e dissolvidos em 6 mol.L⁻¹ de cloridrato de guanidina. Os valores de absorvância foram registados a 370 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) e a carbonilação de proteína foi determinada de acordo com o espectro de diferença entre a amostra tratada com DNPH em HCl e a amostra tratada com HCl sozinho.

3.5.1.2 Conteúdo de sulfidrila

A determinação do conteúdo de sulfidrila foi baseada na redução do DTNB pelos tióis presentes nas amostras de fígado. Os homogenizados de fígado e rim foram incubados com solução salina tamponada com fosfato contendo 1 mmol.L⁻¹ de EDTA (pH 7,4) e 10 mmol.L⁻¹ de DTNB, e o DTNB reduzido foi detectado a 412 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA).

3.5.1.3 Glutationa reduzida

Glutationa reduzida (GSH) é um tripeptídio de baixo peso molecular que contém um tiol em sua molécula, além de ser o substrado da enzima glutationa peroxidase. Segundo Beutler, Duron e Kellen (1963), essa técnica está relacionada com a reatividade da GSH com DTNB formando um tiolato (TNB), de cor amarelada (quanto maior a presença de GSH, mais intensa a cor).

O procedimento consistiu na adição de 150 µL de amostra em 150 µL de ácido metafosfórico, posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C . Em seguida, foram retirados 30 µL do sobrenadante, sendo adicionados 185 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0, contendo EDTA 5mM e 15 µL de oftaldialdeído (1mg/ml em metanol). Essa mistura foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos e a fluorescência foi lida a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas utilizando uma curva padrão de GSH (0.001-0.1 mM) como nmol/mg de proteína.

3.5.1.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é avaliada através da formação do subproduto malondialdeído (MDA) que reage durante o aquecimento com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um produto de coloração rósea, mensurado em fluorímetro.

Essa avaliação ocorreu com adição de 100 µL de amostra, 200 µL de ácido tricloroacético 10% e 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.67% em sulfato de sódio 7.1% misturados em microtubos (YAGI, 1998). As soluções foram incubadas por 2 horas em banho de água fervente (95°C), em seguida foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração, submetida ao mesmo tratamento que as amostras,

foi realizada utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os níveis de TBA-RS foram calculados em nmol TBA-RS/mg de proteína.

3. 5.2. Catalase

O princípio deste método consiste no decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H₂O₂ em água e oxigênio através da atividade da catalase (CAT) presente nas amostras que foi lido espectrofotometricamente a 240 nm (AEBI, 1984). Para esse ensaio utilizou-se a solução de H₂O₂ (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise. Na cubeta de quartzo foi adicionado 1000 µL de tampão fosfato e 10 µL da amostra diluída 10X. A reação foi lida por 30 segundos (s), com leitura nos seguintes intervalos: 0,15 e 30s realizadas em duplicatas. Os resultados foram expressos em unidade – mg de proteína – segundos.

3. 5.2.2 Superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) está relacionada com a capacidade de auto-oxidação do pirogalol, cujo processo depende do radical superóxido (FERNANDES et al., 2011). A partir da inibição da auto-oxidação do pirogalol que ocorre na presença de SOD, sua atividade é indiretamente analisada em espectrofotômetro a 420 nm, em meio contendo 50 mM de tampão Tris com 1 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pH 8.2, 80U/mL de catalase, 0.38 mM de pirogalol e 15 µL de amostra. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definido como uma unidade de SOD. Os resultados foram calculados em U/mg de proteína.

3.5.2.3 Capacidade antioxidante total

A partir do método de FRAP (Ferric-Reducing Ability) foi avaliada a capacidade antioxidante através da redução do Fe⁺³ a Fe⁺², o qual é quelado pelo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) para formação do complexo Fe+2-TPTZ, de coloração azul intensa (BENZIE & STRAIN, 1999). Foram adicionados 10 µl de homogeneizados de fígado/ rim ao meio da reação contendo 300mM de tampão acetato de sódio pH 3.6, 10mM de TPTZ em 40 mM de HCl e 20 mM de cloreto férrico (10:1:1). As amostras foram incubadas por 6 min à 37°C e a absorbância foi lida a 593 nm. A capacidade

antioxidante foi calculada a partir da curva padrão de trolox. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.5.3 Dosagem total de proteína

O método de Bradford foi utilizado para determinação da concentração de proteínas totais, utilizando como padrão a proteína de soro albumina bovina (BSA) (BRADFORD, 1976).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo a comparação dos resultados entre os grupos analisada pelo teste one – way ANOVA e o teste Turkey de múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$.

5 RESULTADOS

6.1 IL-9 em diferentes concentrações aumenta a fibrose tecidual tanto no fígado quanto no rim de camundongos C57BL/6

A fim de verificar o papel fibrogênico da IL-9 no curso da doença hepática e renal, amostras de tecidos de ambos os órgãos de todos os grupos experimentais foram analisados tanto à área total de fibrose e quanto à porcentagem dos tipos de colágenos I e III, após 40 dias de tratamento. Nota-se que a IL-9 aumentou de forma significativa à deposição de colágeno no fígado e no rim (**Figura 4B e 4C**) em ambas as concentrações em relação ao seu controle negativo (PBS), apresentando efeito semelhante quando comparado com o CCL₄. IL-9 a 200ng intensificou seu efeito fibrogênico em ambos os órgãos, sendo significativamente maior que o controle positivo (CCL₄) no fígado. O aumento do colágeno no fígado foi mais intenso na região do capilar sinusóide, e no rim esteve mais presente entre os túbulos e glomérulos, caracterizando uma fibrose intersticial (**Figura 4A**).

Esse aumento na área de fibrose está relacionado com a maior expressão na ECM de colágeno I e III. A IL-9 em diferentes concentrações elevou a porcentagem de colágeno I e III de forma significativa em relação ao PBS e semelhante ao CCL₄ tanto no fígado (**Figura 5B e 5C**) quanto no rim (**Figura 5D e 5E**). Entretanto, houve maior expressão de colágeno I em relação ao III nos animais tratados com IL-9 a 200ng em ambos os órgãos (**Figura 5A**).

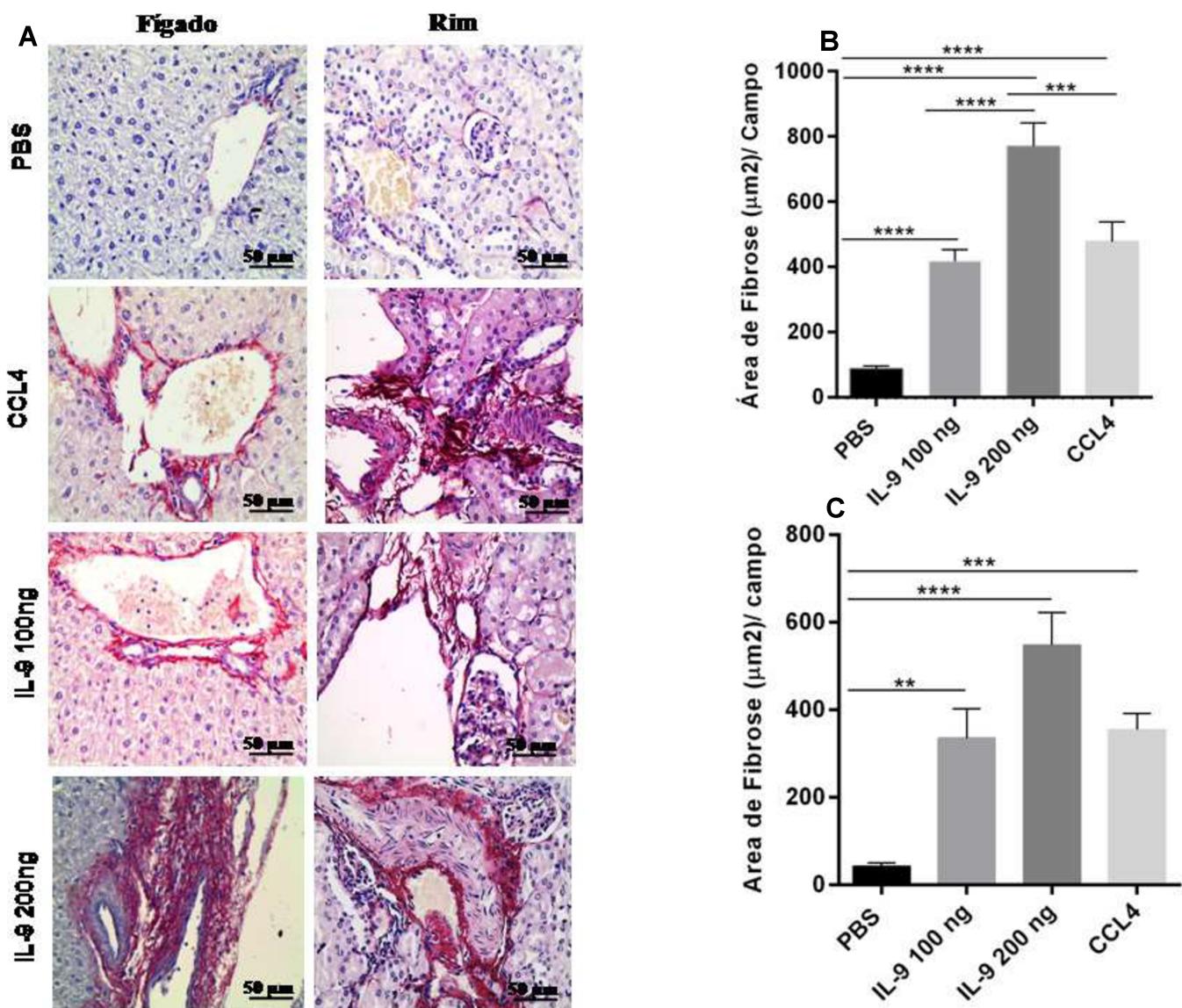


Figura 4: Tratamento com IL-9 levou a fibrose hepática e renal nos camundongos C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 100ng (subgrupo 1) e 200ng (subgrupo 2) e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, o fígado e o rim foram analisados quanto a área ocupada pelas fibras colágenas totais (B e C). Fotomicrografias representativas da área de fibrose ao redor dos capilares sinusoidais no fígado, e ao redor dos túbulos e glomérulo no rim (A). *Significância estatística entre os grupos tratados. (** P = 0,0012), (***) P = 0,0005), (**** P< 0,0001) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

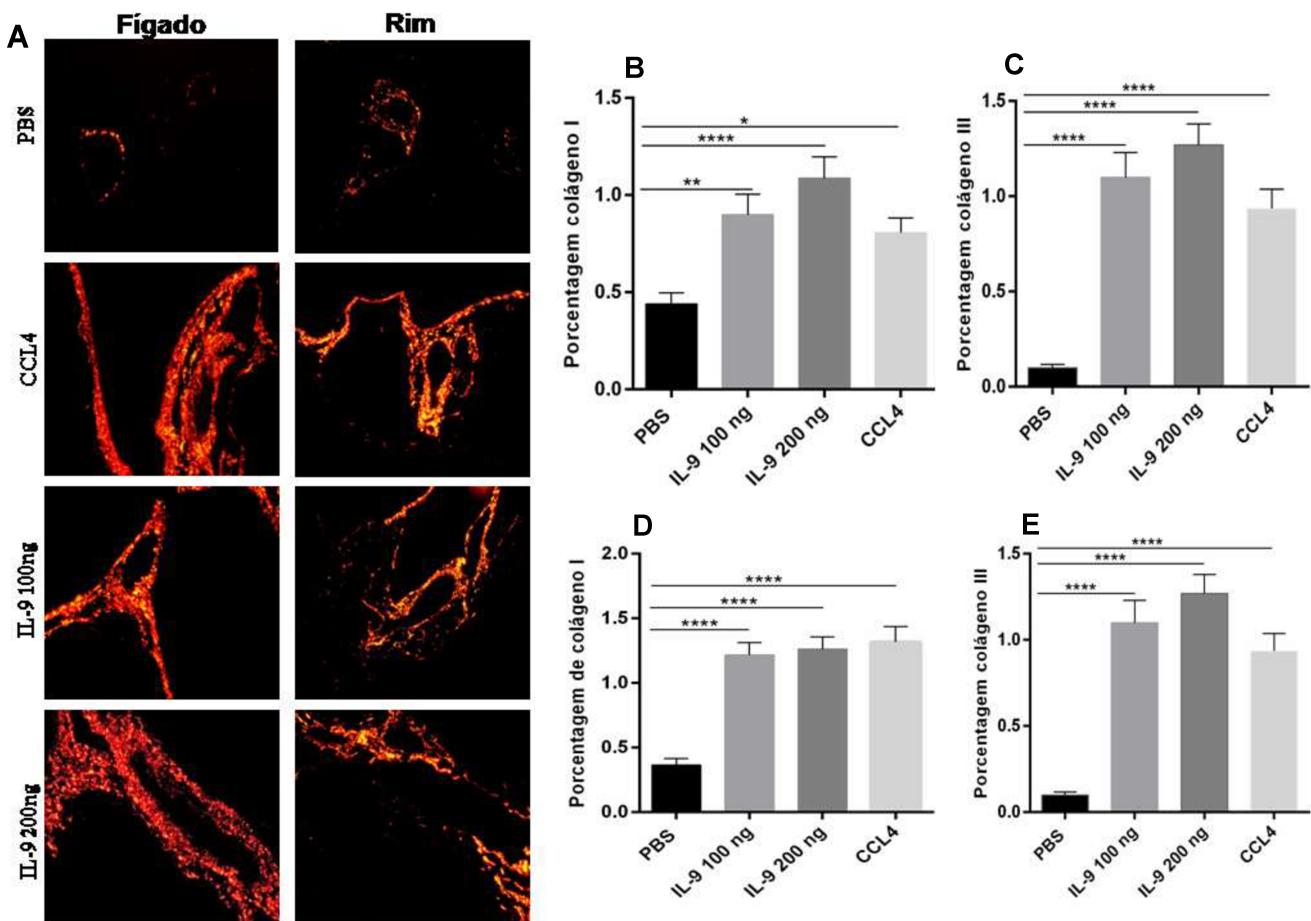


Figura 5: Tratamento com IL-9 aumentou a expressão de colágeno I e III em tecido hepática e renal nos camundongos C57/BL6. Fotomicrografias do colágeno I é visto em vermelho e III em pontos amarelos, devido a sobreposição dos dois colágenos (A). Porcentagem de colágeno I e III no fígado (B e C) e no rim (D e E). As imagens digitais foram obtidas em 20 campos aleatórios de cada corte/animal no aumento de 20X, sendo posteriormente, analisada a intensidade em pixel de fibras colágenas I e III através de *Threshod* pelo software Image J. *Significância estatística entre os grupos tratados. (* P = 0,0255), (** P = 0,0029), (**** P< 0,0001) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

5.2 A IL-9 não alterou a quantidade de mastócitos no rim dos camundongos C57BL/6

No presente estudo não foi encontrado mastócitos no tecido hepático de nenhum grupo avaliado. No rim, foi observada a presença dessas células, principalmente, na cápsula renal. Os animais tratados com IL-9 apresentaram número de mastócitos similar ao grupo controle (**Figura 6**).

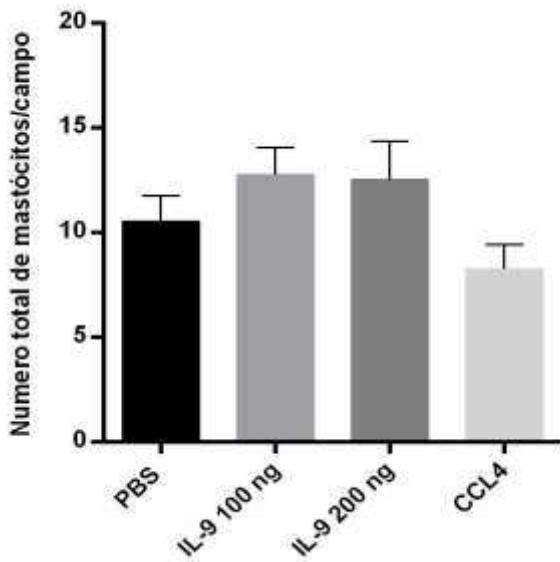


Figura 6.: Análise histológica no número de mastócitos no tecido renal. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 100ng (subgrupo 1) e 200ng (subgrupo 2) e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, o rim foi analisado quanto a quantidade de mastócitos totais por campo (20 campos) em cada corte/animal em objetiva de 40X.

5.3 A IL-9 induziu uma inflamação nos tecidos hepáticos e renais dos camundongos C57BL/6.

As alterações histopatológicas no fígado e no rim tratados com IL-9 em diferentes concentrações, bem como nos respectivos grupos controles foram examinados com intuito de determinar se essa interleucina provocaria uma resposta inflamatória nesses tecidos, consequentemente, com o recrutamento de leucócitos.

Observou-se que as lesões hepáticas dos animais tratados com IL-9 100ng e 200ng foram intensas e frequentes constituídas de amplo infiltrado inflamatório no espaço portal e no ácido. Esta resposta inflamatória levou o recrutamento leve (+) de neutrófilos, macrófagos e células plasmáticas, bem como o aumento moderado (++) de linfócitos tanto no grupo experimental, quanto no grupo tratado com CCL₄ (**Figura 7**). Não foram encontradas células gigantes de corpo estranho e nem adipócitos em nenhum dos grupos avaliados. A IL-9 ocasionou uma leve (+) necrose tecidual no fígado, semelhante ao controle positivo (CCL₄), bem como de induziu uma moderada (++) degeneração hidrópica (**Tabela 1**).

Resultados semelhantes foram encontrados no tecido renal. IL-9 a 100ng e 200ng levou a uma resposta inflamatória na zona cortical, entretanto, somente IL-9 a

200ng induziu uma inflamação na zona medular. Apesar de levar uma inflamação tecidual, não ocorreu recrutamento de neutrófilos, células plasmáticas e nem células gigantes de corpo estranho em nenhum grupo avaliado. Contudo, houve um leve (+) aumento de macrófagos e linfócitos, sendo que no grupo tratado com IL-9 200ng o recrutamento de linfócitos foi moderado (++) (Figura 8). Concomitante com a presença de inflamação e infiltrado de leucócitos, a IL-9 em diferentes concentrações ocasionou necrose tecidual (+) (Tabela 2), mas não levou a degeneração hidrópica como observado no fígado.

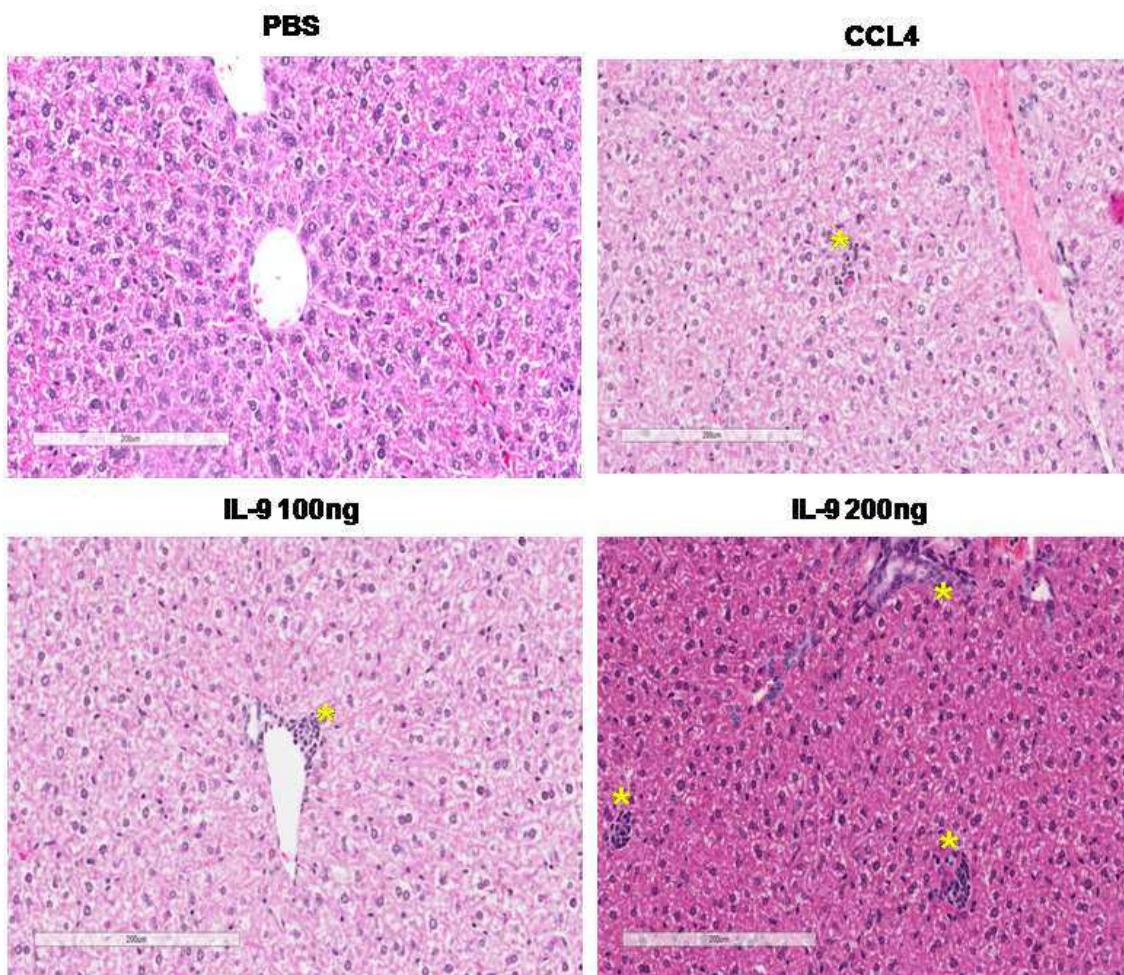


Figura 7: Fotomicrografias, dados apresentados na tabela1, referentes a regiões típicas e representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, provenientes do tecido hepático dos camundongos tratados com PBS, CCL₄, IL-9 100ng e 200ng. Foco inflamatório é indicado com asterisco amarelo. Aumento de 200X.

Tabela 1: Análise qualitativa do infiltrado de células no tecido hepático de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL₄.

Critério histológico	PBS	IL-9 100ng	IL-9 200ng	CCL ₄
Arquitetura ácino clássica	P	P	P	P
Resposta inflamatória no trato portal	-	P	P	P
Resposta inflamatória no lóbulo/ácino	-	P	P	-
Neutrófilos	-	+	+	+
Macrófagos	-	+	+	+
Linfócitos	-	++	++	++
Célula plasmática	-	+	+	+
Célula gigante do corpo estranho	-	-	-	-
Necrose tecidual	-	+	+	+
Edema	-	-	-	-
Adipócito	-	-	-	-
Degeneração hidrópica	+	++	++	++

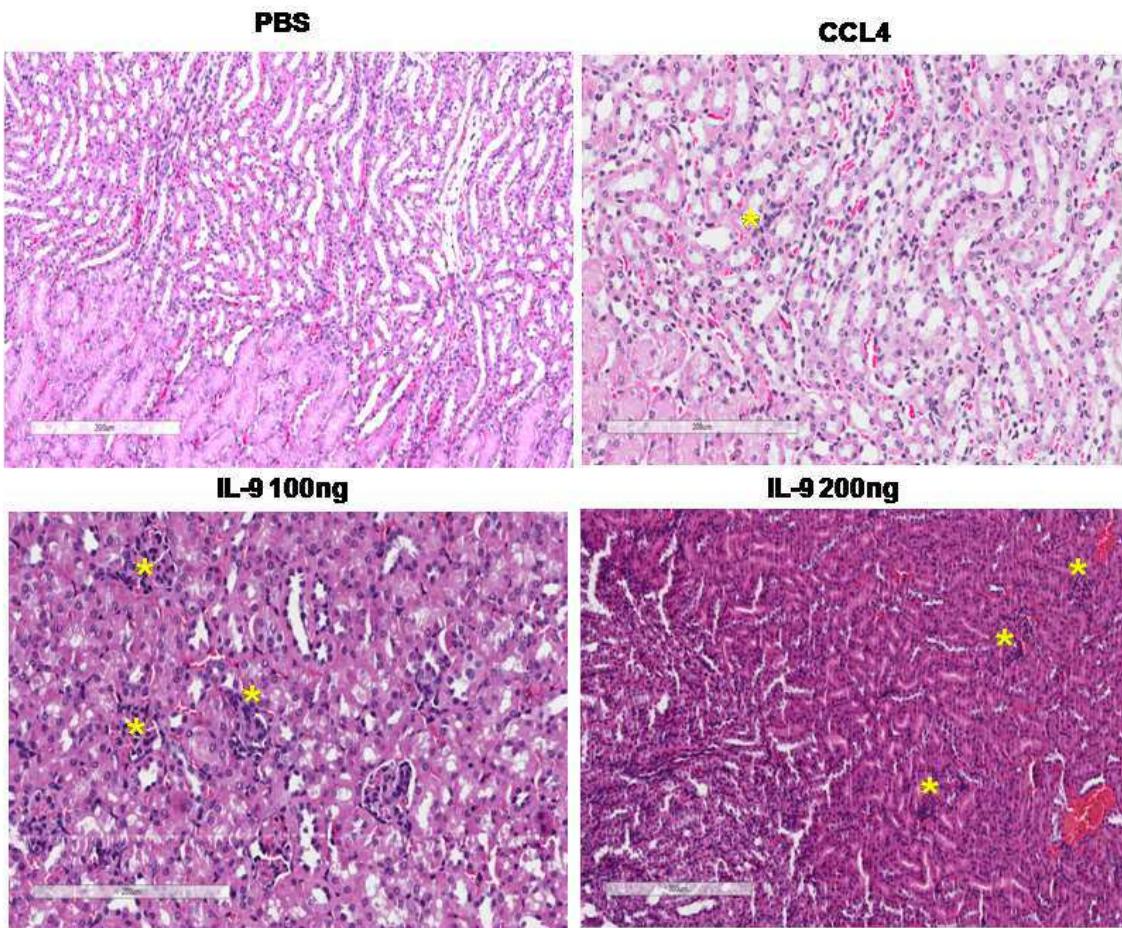


Figura 8: Fotomicrografias, dados apresentados na tabela2, referentes a regiões típicas e representativas dos cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina, provenientes do tecido renal dos camundongos tratados com PBS, CCL₄, IL-9 100ng e 200ng. Foco inflamatório na zona cortical é indicado com asterisco amarelo. Aumento de 200X.

Tabela 2: Análise qualitativa do infiltrado de células no tecido renal de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL₄.

Critério histológico	PBS	IL-9 100ng	IL-9 200ng	CCL ₄
Resposta inflamatória na zona cortical	-	P	P	P
Resposta inflamatória na zona medular	-	-	P	-
Neutrófilos	-	-	-	-
Macrófagos	-	+	+	+
Linfócitos	-	+	++	+
Célula plasmática	-	-	-	-
Célula gigante de corpo estranho	-	-	-	-
Necrose tecidual	-	+	+	+
Edema	-	-	-	-
Adipócito	-	-	-	-
Degeneração hidrópica	-	-	-	-

5.4 Tratamento com IL-9 induziu hepatite com fibrose em estágio inicial

A hepatite resulta de uma inflamação que persiste por vários dias, no qual pode ser avaliada utilizando parâmetros patológicos que permitem classificá-la em diferentes estágios de acordo com a intensidade da lesão (ISHAK et al., 1995). A partir dessa análise constatou-se que a necrose presente no fígado dos animais tratados com IL-9 é do tipo lítica focal e não confluente, que se encontra no estágio 1. Igualmente, a inflamação portal, bem como a fibrose está no mesmo estágio, gravidade semelhante aos animais tratados com CCL₄ (**Tabela 3**).

Tabela 3: Grau histológico e estágio da hepatite crônica de animais tratados com PBS, IL-9 100ng, 200ng e CCL₄.

Modificação do grau IAH: escore necroinflamatório	PBS	IL-9 100ng	IL-9 200ng	CCL₄
Interface periseptal	0	0	0	0
Necrose confluente	0	0	0	0
Necrose lítica focal, apoptose e inflamação focal	0	1	1	1
Inflamação portal	0	1	1	1
Fibrose e cirrose	0	1	1	1

5.5 O tratamento com IL-9 regulou a expressão gênica de TGF-β1 e α-SMA em tecido hepático e renal

Como foi observado maior inflamação tecidual no fígado e rim nos animais tratados com IL-9, a atividade de TGF-β1 e α-SMA pode ser indicativo de ativação das células Ito no fígado e de miofibroblastos renais que gera uma resposta inflamatória, bem como inicia a síntese de colágeno (OAKLEY et al., 2005; BOOR; FLOEGER, 2012). Diante disso foi quantificada a expressão gênica de TGF-β1 e α-SMA.

Observou-se que no fígado dos animais tratados com IL-9 a 200ng não apresentou alteração significativa nos níveis de expressão de TGF-β1 comparado com

PBS, sendo que no grupo CCL₄ essa expressão foi maior (**Figura 9A**). No rim essa citocina apresentou expressão semelhante ao grupo PBS, efeito semelhante ocorreu com o grupo CCl₄ (**Figura 9B**). Já a proteína α -SMA teve uma baixa expressão significativa no fígado (**Figura 9C**) e no rim (**Figura 9D**) dos animais tratados com IL-9 quando comparada com o PBS.

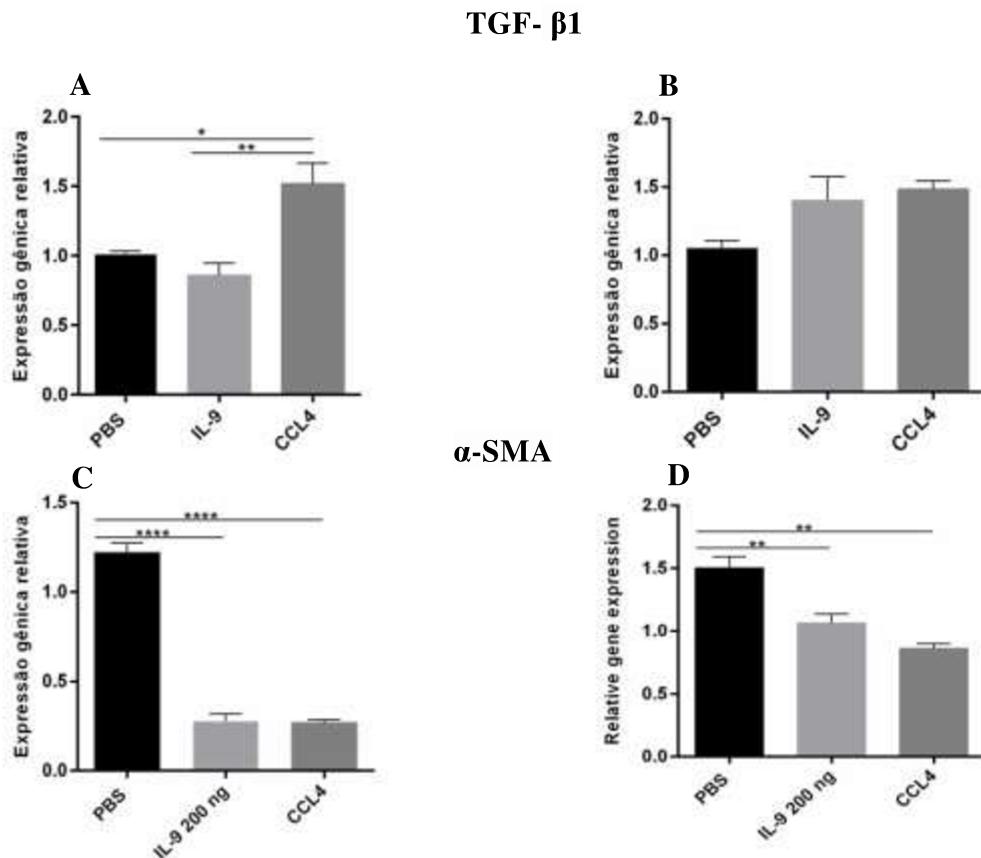


Figura 9: O tratamento com IL-9 alterou a expressão de TGF- β 1 e α -SMA no rim. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, foi avaliada a expressão gênica de TGF- β 1 e α -SMA no fígado (A e B) e no rim (C e D) através de RT-PCR. *Significância estatística entre os grupos tratados. (* P= 0,0253), (** P = 0,0075), (**** P< 0,0001) (One- way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

5.6 IL-9 alterou o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em tecido hepático e renal

Devido o aumento da área de fibrose, bem como o desencadeamento de uma resposta inflamatória nos animais tratados com IL-9, hipotetizamos que houvesse algum

desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas antioxidantes, o que explicaria tal fenômeno.

Em relação aos biomarcadores não enzimáticos do estresse oxidativo (Proteína carbonilada, sulfidrila, glutationa reduzida e peroxidação lipídica), foi observado que o tecido hepático dos animais tratados com IL-9 a 200ng tiveram uma diminuição significativa na carbonilação proteica comparado com o grupo PBS, assim como ocorreu diminuição significativa no CCL₄ em relação ao controle CCL₄ (**Figura 10A**). Entretanto, não houve diferença entre os grupos quando analisada no tecido renal (**Figura 10B**). A sulfidrila foi diminuída significativamente no tecido hepático e renal do grupo tratado com IL-9 em relação ao grupo PBS o que caracterizada uma oxidação dos grupos tióis dessas proteínas. Entretanto, no fígado do grupo tratado com CCL₄ ocorreu aumento significativo em relação controle negativo (**Figura 11A e 11B**).

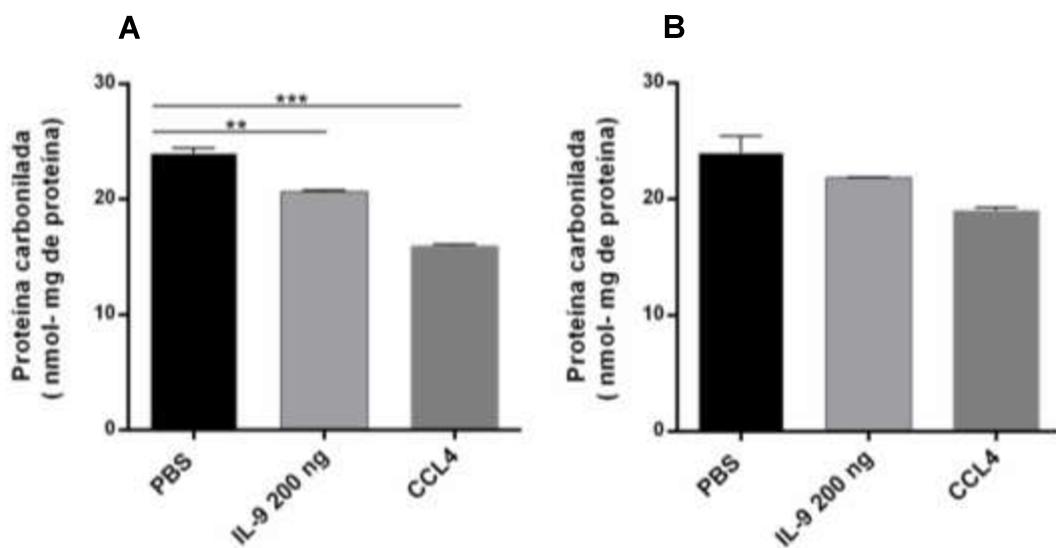


Figura 10: IL-9 diminuiu a carbonilação das proteínas hepáticas. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da carbonilação protéica, a partir da reação das proteínas oxidadas com o reagente DNPH. *Significância estatística entre os grupos tratados. (**P= 0,0080), (** P= 0,0007) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

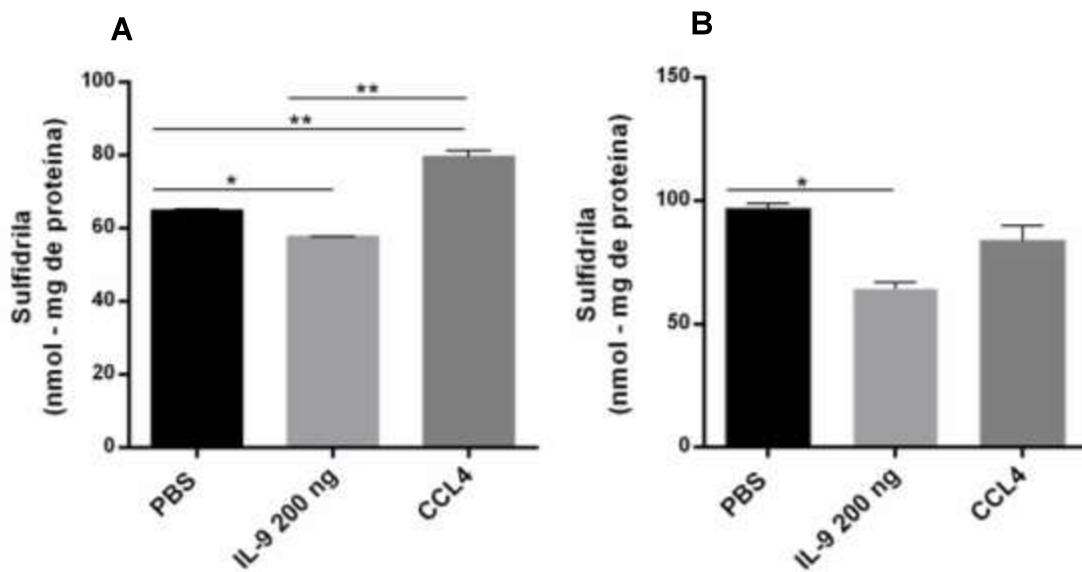


Figura 11: IL-9 diminuiu a atividade das sulfidrilas tanto no fígado quanto no rim. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL4 (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da oxidação do grupo tiol das proteínas sulfidrilas. *Significância estatística entre os grupos tratados. (*P= 0,0146), (** P= 0,0033) (One- way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

Foi observada uma diminuição nos níveis de GSH no grupo IL-9, comparado com o PBS, tanto no fígado quanto no rim (**Figura 12A e 12B**). Esse efeito foi semelhante ao observado no grupo CCL4 que também reduziu em relação ao controle PBS. Em relação à peroxidação lipídica, houve uma diminuição de sua peroxidação no fígado nos animais tratados com IL-9 e também nos tratados com CCl4 (**Figura 13A**). Entretanto, no rim houve aumento de forma significativa na peroxidação lipídica no grupo IL9 ao comparado com PBS e diminuição no grupo CCl4 (**Figura 13B**).

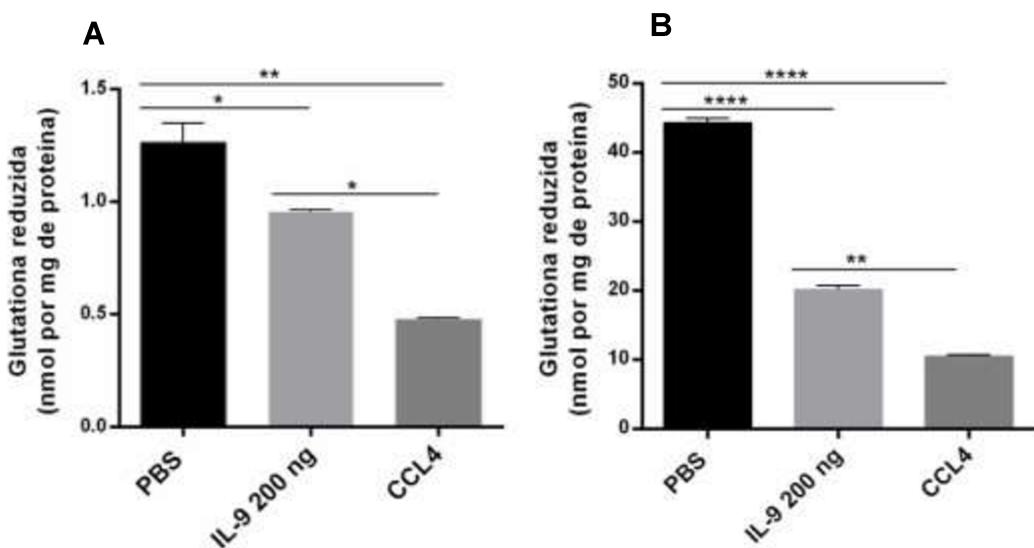


Figura 12: O tratamento com IL-9 a 200ng alterou os níveis de GSH tanto no fígado quanto no rim.
Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da atividade da proteína antioxidante GSH. *Significância estatística entre os grupos tratados. (*P= 0,0454), (** P= 0,0033), (**** P< 0,0001) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

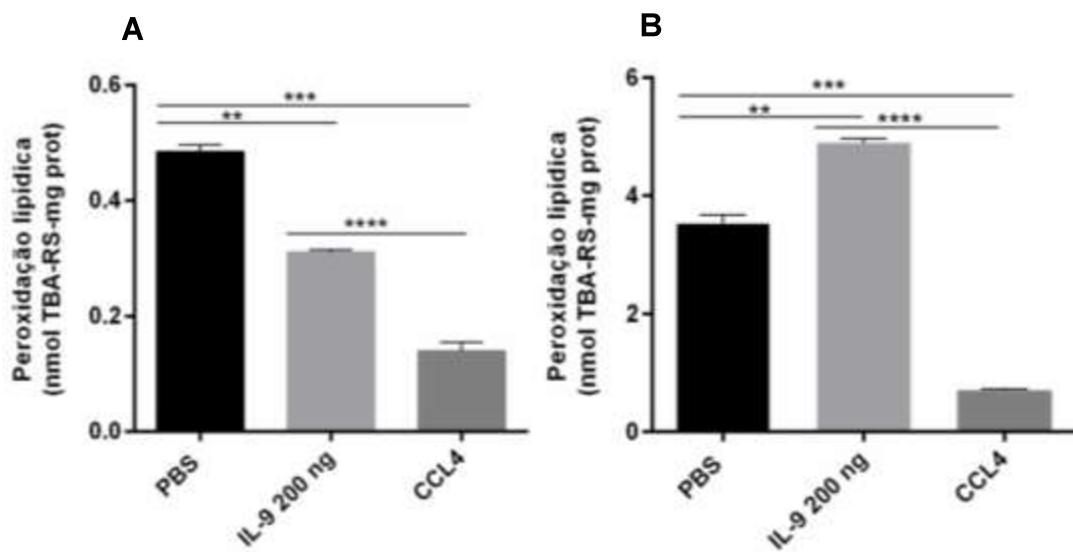


Figura 13: O tratamento com IL-9 a 200ng alterou os níveis de peroxidação lipídica no fígado no rim.
Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da peroxidação lipídica. *Significância estatística entre os grupos tratados. (**P= 0,0042), (** P= 0,0005), (**** P< 0,0001) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

Já as enzimas antioxidantes, observou-se que a catalase teve sua atividade aumentada no fígado dos animais tratados com IL-9-200ng comparado com o PBS, efeito semelhante ao encontrado no grupo CCL₄ (**Figura 14A**). Entretanto, no rim a atividade dessa enzima foi reduzida, mas não houve diferença estatística entre PBS e CCL₄ (**Figura 14B**).

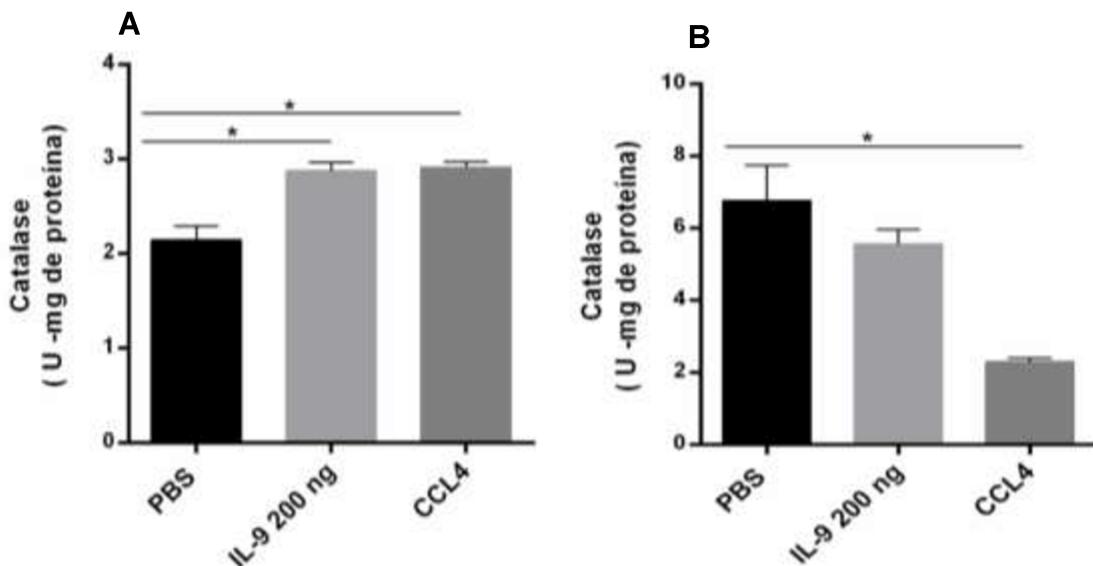


Figura 14: Catalase teve sua atividade aumentada no fígado dos animais tratados com IL-9 200ng.
Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da atividade antioxidant da enzima catalase. *Significância estatística entre os grupos tratados. (*P= 0,0042) (One-way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

A atividade da superóxido dismutase não sofreu nenhuma alteração estatisticamente significante no fígado do grupo IL-9 (**Figura 15A**), mas no rim no grupo da IL-9 e CCL₄ houve uma redução significativa nos níveis dessa enzima comparados com o PBS (**Figura 15B**). Finalmente, o tratamento com IL-9 interferiu na resposta antioxidante total no fígado e no rim, visto que houve uma diminuição significativa da redução do ferro no grupo IL-9 comparado com o grupo PBS (**Figura 16A, 16B**).

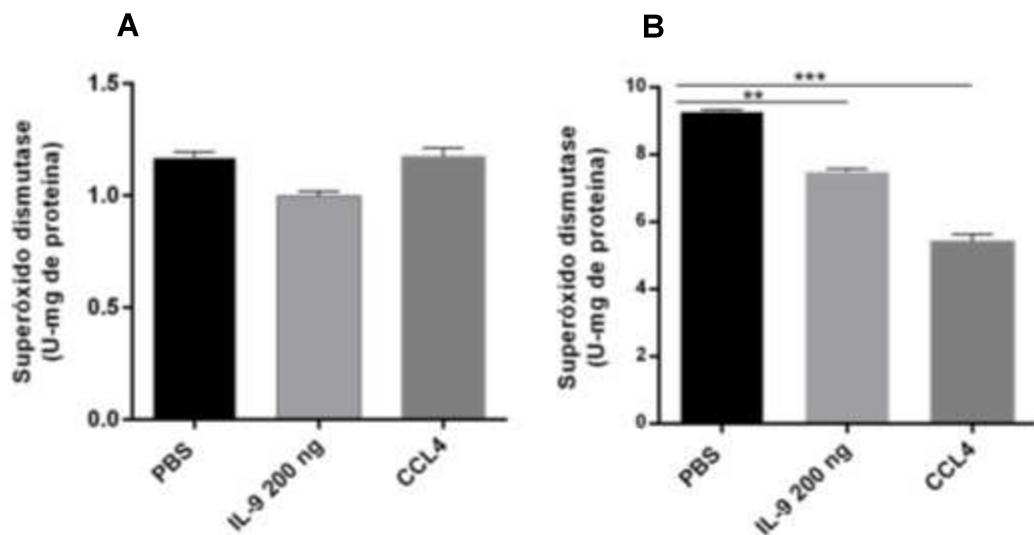


Figura 15: Superóxido dismutase teve sua atividade alterada no rim dos animais tratados com IL-9 200ng. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da atividade antioxidante da enzima SOD. *Significância estatística entre os grupos tratados. (**P= 0,0056), (***(P= 0,0006) (One- way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

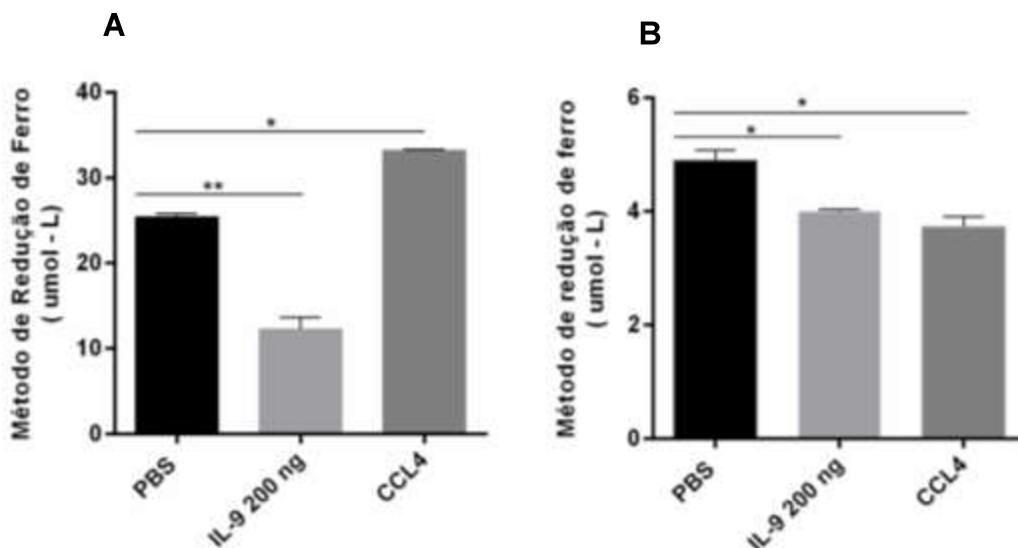


Figura 16: O tratamento com IL-9 alterou o equilíbrio antioxidante total no fígado e no rim. Os camundongos C57BL/6 foram tratados com 100uL de IL-9 a 200ng e com 160 uL PBS (controle negativo) e CCL₄ (controle positivo) durante 40 dias. Após 40 dias de tratamento, amostras de fígado (A) e rim (B) foram processadas para avaliação da capacidade antioxidante total. *Significância estatística entre os grupos tratados. (*P= 0,0460), (**P= 0,0032) (One- way ANOVA, teste Turkey de múltiplas comparações, p<0,05).

6 DISCUSSÃO

A fibrose hepática é a principal consequência da injúria hepática crônica, devido à exposição a substâncias tóxicas, que leva a um processo inflamatório com secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (KERSHENOBICH; WEISSBROD, 2003). Esse processo inflamatório persiste quando o dano local é intenso resultando em uma regeneração hepática com a formação de cicatrizes que se caracterizam com o aumento da deposição de colágeno (ALBILLROS et al., 2014). Mecanismo semelhante ocorre durante a patogênese da doença renal crônica que induz progressivo declínio na função dos rins, bem como acumulo de ECM, difundindo a fibrose (KISSELEVA; BRENNER, 2008).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a IL-9 é uma importante citocina chave no desencadeamento e desenvolvimento da fibrose no fígado e no rim, visto que a mesma levou a formação de fibrose no estágio 1, com aumento de colágeno I e III em ambos os órgãos avaliados.

O colágeno é a principal proteína da ECM dos mamíferos, sendo o colágeno do tipo I, II, III e IV os mais encontrados no tecido conectivo (BRETT, 2008). Diversos trabalhos têm mostrado que durante a progressão do estágio do fígado normal para cirrose, bem como a evolução do rim saudável para o fibrótico, ocorre aumento de 10 vezes na quantidade total de colágeno na ECM desses tecidos (MURATA et al., 1984; CHEN et al., 2014; SOYLEMEZOGLU et al., 1997).

Durante a fibrogênese hepática ocorre aumento de todos os tipos de colágenos, mas não são aumentados na mesma quantidade e nem nos mesmos estágios, pois cada colágeno exerce função diferenciada na ECM (CHEN et al., 2014).

O colágeno I por ser o mais abundante no corpo, é um importante componente no processo de cicatrização de feridas, sendo encontrado drasticamente elevado em todas as fases de progressão da fibrose hepática e renal (YOSHIOKA et al., 1990; CHEN et al., 2014; DECARIS et al., 2015). Por isso está associado a uma variedade de patologias, o que tem levado a ser extensivamente caracterizado, marcando como possível alvo para o desenvolvimento de terapias anti-fibróticas (WYNN, 2008).

Entretanto, o colágeno do tipo III por ser uma fina fibrila, está mais elevado nos estágios iniciais da fibrose tecidual, particularmente, no estágio 1. Durante esse período, também ocorre aumento de colágeno IV e V, mas em quantidades diferentes em relação aos outros colágenos (CHEN et al., 2014).

Yoshioka et al. (1990), mostrou em seu trabalho a distribuição do colágeno I e III no tecido renal doente, observando que ambos os tipos de colágenos sofrem aumento, bem como se co-localizam na região glomerular. Outro estudo constatou elevação dos níveis urinários de colágeno, principalmente do tipo III, em pacientes com nefropatia, no qual foi acompanhado com aumento da extensão da fibrose renal (SOYLEMEZOGLU et al., 1997).

Aumento de colágeno I e III no tecido hepático e renal nos animais tratados com IL-9 a 100ng e 200ng, mostra que essa interleucina tem atividade fibrogênica, podendo ser uma molécula chave na ativação de importantes células envolvidas na síntese de colágeno nesses órgãos.

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Qin et al. (2016), onde constatou elevação na quantidade de IL-9 em amostras de sangue de pacientes com cirrose hepática, bem como com hepatite B. Igualmente, foi observado que essa interleucina estava aumentada em tecido hepático de camundongos com fibrose em estágio inicial e avançado. Há medida que a fibrose se intensificava, a expressão da IL-9 aumentava. Efeito contrário foi constatado, nessa mesma pesquisa, quando camundongos com fibrose hepática eram tratados com anticorpo anti-IL9 durante diferentes dias. Esses animais tiveram atenuação da deposição de colágeno, bem como diminuição da resposta inflamatória, mostrando que a IL9 tem papel deletério na patologia hepática.

Entretanto, Arras et al. (2001) observou que IL-9 reduzia a formação de fibrose no pulmão de camundongos tratados com partículas sílicas cristalinas, através da expansão da população de linfócitos B. Efeito semelhante foi encontrado por Alves (2015), no qual sugere efeito benéfico dessa interleucina na infecção por *Trypanosoma cruzi* no coração, uma vez que ocorreu diminuição da fibrose cardíaca, bem como da parasitemia nos animais tratados com IL-9. Além disso, a IL-9 elevou os níveis séricos das citocinas de perfil Th1; IL-2, IFN- γ e TNF- α , que estão relacionados com a imunidade protetora contra o *Trypanosoma cruzi*.

Essas variadas atividades biológicas da IL-9 em cada órgão estão relacionadas com a característica pleiotrópica dessa citocina, que interfere de forma direta ou indireta em diversos tipos celulares. Consequentemente tem sido associada a diversos tipos de doenças, principalmente, autoimunes, inflamatórias intestinais e asma, através do recrutamento de mastócitos (GOSWAMI; KAPLAN, 2011; HOPPENOT et al., 2015).

Os mastócitos estão envolvidos na resposta imunológica inata, bem como atuam na formação do tecido conjuntivo, secretando mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos que estão relacionados com a síntese de colágeno (JORDANA, 1993; GARBUZENKO et al., 2002).

Alguns estudos têm elucidado o importante papel que os mastócitos exercem no processo de cicatrização de feridas, no qual seu acúmulo e a secreção de histamina, VEGF e mediadores lipídicos atraem diferentes tipos de células inflamatórias, resultando na formação de fibrose (TAKATO et al., 2012; WELLER et al., 2006). Além disso, os mastócitos secretam diversas citocinas pró-fibrogênica: TGF- β , IL-13, CCL2, CCL5, IL-4, PDGF; que atuam na proliferação e migração de fibroblastos que são responsáveis pela síntese de colágeno (POSTLETHWAITE et al., 1987). Igualmente, as proteases secretadas pelos mastócitos, por exemplo, triptase e quimase podem estimular a síntese de colágeno I pelos fibroblastos, bem como ativar metaloproteinase, levando a rigidez da ECM (CAIRNS; WALLS, 1997; GRUBER et al., 1997; TCHOUGOUNOVA et al., 2005).

Entretanto, não foi encontrada a presença de mastócitos no tecido hepático em nenhum grupo avaliado no presente trabalho. Resultado semelhante foi relatado por Armbrust et al. (1997), no qual não encontrou mastócitos em fígado saudável de humano e de rato, e mesmo em fígado com injúria aguda, não houve alteração no número dessas células em relação aos grupos avaliados. Contudo, em fígados humanos e de ratos que manifestavam quadro de cirrose, foi constatado aumento significante de mastócitos na região portal e no septo fibroso desses tecidos.

Esses dados mostram que os mastócitos estão relacionados mais intensamente em estágio mais avançado da fibrogênese hepática, o que justifica a inexistência dessa célula no presente estudo, uma vez que a fibrose presente no grupo da IL-9 e do CCL₄ encontra-se em fase inicial.

Outro motivo seria a diferença na distribuição de mastócitos no fígado de diferentes espécies de roedores. Sugihara et al. (1999), evidenciou que ratos com fibrose hepática induzida por CCL₄ apresentavam elevação no número de mastócitos nesse órgão comparado com o grupo saudável. Entretanto, a densidade dessas células foi extremamente baixa no fígado dos camundongos C57BL/6 saudáveis, bem como nos animais tratados com CCL₄ (<1).

Em relação ao rim, nossos resultados evidenciaram a presença de mastócitos nesse órgão, mas sem diferença estatística entre os grupos. Esse evento pode estar

relacionado com o fato do número de mastócitos aumentar, proporcionalmente, com a extensão da fibrose, ou seja, quanto maior a área de deposição de colágeno, mais mastócitos são recrutados para o local da lesão (ROBERTS; BRENCHLEY, 2000). Isso corrobora com os nossos resultados, uma vez que a área de fibrose no rim era mais local, e não foi tão extensiva, devido, principalmente, pelo fato da IL-9 ter desencadeado uma inflamação mais aguda nesse tecido.

Alguns estudos vêm descrevendo a importante atuação dos mastócitos no desenvolvimento da fibrose renal, principalmente, quando se encontram na borda do tecido, corroborando com que foi observado na presente pesquisa (ROBERTS; BRENCHLEY, 2000; VEERAPPAN et al., 2012). Acredita-se que os mastócitos nas bordas sejam importantes para mediação da inflamação local, visto que induz o recrutamento de leucócitos, por exemplo, neutrófilos, bem como contribuem para o aumento da permeabilidade vascular (WELLER et al., 2006; TAKOTA et al., 2011).

A resposta inflamatória no fígado é dividida em dois componentes, inflamação na região portal com variáveis extensões nas regiões periportal adjacentes e o lóbulo hepático. Esses diferentes padrões da inflamação refletem as diversas vias utilizadas pelas células inflamatórias para chegar ao fígado (SALMI et al., 1998). Nossos resultados mostram que IL-9 em ambas as concentrações desencadeou inflamação na região portal e nos lóbulos, indicando que as células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas migraram para essas áreas contribuindo para o desencadeamento da fibrogênese.

O grau de inflamação portal não se correlaciona com a presença ou ausência de inflamação lobular. Entretanto, está associado a uma reação nos ductos biliares com predomínio de células inflamatórias e estromas, que se desenvolvem quando a regeneração dos hepatócitos é prejudicada (BRUNT et al., 2009; CLOUSTON et al., 2009). A presença de inflamação portal está diretamente relacionada com a severidade da doença, ou seja, o grau de fibrose (GADD et al., 2014), vindo de encontro com os resultados do presente estudo, visto que ambos estão no estágio 1, conforme a análise necroinflamatória realizada. Já a inflamação lobular (inflamação no parênquima) está correlacionada com o desenvolvimento da fibrose parenquimal, acompanhada de necrose (DESMET et al., 1994).

Além disso, nossos resultados mostram que a IL-9 desencadeou uma hepatite lobular, visto que essa doença é caracterizada pela manifestação de inflamação na região portal e lobular, bem como necrose hepática (WEINBREN; STIRLING, 1972).

Essa resposta inflamatória induzida pela IL-9 pode ter ocorrido através da interação entre essa citocina e as células de Ito. As células de Ito são muito responsivas para citocinas pró-inflamatórias, resultando na ativação da via de sinalização pró-inflamatória como fator nuclear kappa B (NF-KB) e proteína ativadora 1 (AP-1), que induz a secreção de quimiocinas e citocinas, consequentemente, dano celular (HELLERBRAND et al., 1998; QIN et al., 2016).

No rim, a resposta inflamatória esteve presente na zona do córtex em todos os animais tratados com IL-9 100ng e 200ng e CCL₄, entretanto, somente o grupo IL-9 200ng apresentou lesão na zona medular. Resultado semelhante foi elucidado por Ogeturk et al. (2005), no qual CCL4 induziu inflamação ao redor do córtex, mas na zona medular foi bem reduzida. O recrutamento de células monoclonais no córtex pode levar alteração tubular e glomerular, bem como contribuir para deposição de colágeno nessa região (OZTURK et al., 2003; OGETURK et al., 2005). Outra justificativa pela manifestação de resposta inflamatória nessa área pode ser pelo fato que no córtex predomina o citocromo P450 que tem afinidade pelo CCL₄, bem como outras enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias, podendo ter algum envolvimento com a IL-9, mas que necessita ser melhor elucidado (RUSH et al., 1984; RONIS et al., 1998).

Infiltrados de linfócitos ocorrem em respostas a diversos insultos desencadeados por dano tóxico mediado por álcool, doença autoimune e hepatite viral (LALOR; ADAMS, 1999). Os linfócitos estão localizados principalmente na região do trato portal no fígado saudável, aumentando o infiltrado a partir da resposta inflamatória, uma vez que desempenha papel crítico na regulação da resposta imune/inflamatória alcoólica (PROBERT et al., 1997). O aumento de linfócitos é característica de doença hepática alcoólica, visto que o tipo e a distribuição dessa célula determinam a natureza da inflamação. Por exemplo, quando há predominância da inflamação na região parenquimal é caso de hepatite alcoólica, já o frequência de infiltrado portal atribuísse ao quadro de cirrose (HAYDON et al., 2002). Efeito semelhante acontece no rim, sendo elucidado na literatura como importante modulador da resposta inflamatória inata e adaptativa em modelos de injúria aguda renal. Camundongos knockout para ambas as células T CD4 e CD8 apresentaram resposta protetora contra isquemia de injúria no rim, entretanto, quando células T eram transferidas, os animais manifestavam lesão nesse órgão (RABB et al., 2000; RABB, 2002).

Os macrófagos estão relacionados com a patogênese de injúria crônica, influindo inflamação e fibrose (HEINRICHS et al., 2011), o que justificaria o aumento leve do

infiltrado dessas células no fígado e rim dos camundongos tratados com IL9 100ng e 200ng e CCL₄. Além disso, os macrófagos ativam fatores pró-inflamatório, através da fagocitose de células hepáticas necrosadas, resultando na secreção de citocinas que intensificam a inflamação (DULTZ et al., 2015). Esse fato vem ao encontro com os resultados da presente pesquisa, uma vez que foi observada necrose hepática em ambos os grupos que receberam tratamentos.

Os neutrófilos exercem papel importante, juntamente com os linfócitos e macrófagos, na resposta inflamatória durante injuria hepática e renal. Infiltrado de neutrófilos está vinculado com a liberação de espécies reativas de oxigênio que leva ao dano celular, podendo ser uma das vias que teria desencadeado estresse oxidativo no tecido hepático nos animais tratados com IL-9 (JIN et al., 2000).

Apesar dos neutrófilos estarem relacionados com a resposta inflamatória no rim, no presente trabalho não foi encontrado a presença dessas células em nenhum dos grupos avaliados, necessitando de mais estudos para compreender esse fenômeno.

Finalmente, as células plasmáticas têm sido relatadas na literatura como importante moduladora da fibrose hepática através da interação com as células de Ito, entretanto, é desconhecido o mecanismo de atuação (NOVOBRANTSEVA et al., 2005). Além disso, a mesma manifesta papel pró-inflamatório em doença hepática necroinflamatória induzida por CD40, no qual depende da presença de macrófagos, e não de células T (KIMURA et al., 2006). Thapa et al. (2015), demonstrou que através da secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células plasmáticas ocorre recrutamento das células monoclonais, levando a amplificação do processo fibrótico.

Já no rim, as células plasmáticas estão relacionadas com injúria crônica nesse órgão, principalmente, associada com desencadeamento de gamopatia monoclonal, amiloidose mediada por IgG, ambos assintomáticos ou sintomáticos para mieloma múltiplo, levando a insuficiência renal (KYLE et al., 2006). Entretanto, o presente trabalho não encontrou nenhuma correlação positiva entre as células plasmáticas e fibrose renal, precisando ser melhor elucidado.

Em relação à degeneração hidrópica que foi moderadamente presente no tecido hepático dos camundongos tratados com IL-9, resultado dano celular, no qual é consequência direta do acúmulo de água e sódio na célula. Esse fenômeno ocorre devido alteração na bomba de sódio-potássio produzido pela diminuição de adenosina trifosfato. Além disso, é consequência do vazamento de enzimas hidrolíticas

lisossomais que leva a degeneração citoplasmática, bem como acumulo de macromoléculas (DEL MONTE, 2005). O inchaço vacuolar do citoplasma dos hepatócitos pode indicar uma injúria aguda e subaguda hepática desencadeada pela IL-9 (ABDELHALIM; JARRAR, 2011).

A partir da análise necroinflamatória relacionada à hepatite foi observado que a exposição crônica dos animais com IL-9 a 100ng e 200ng, bem como com CCL₄ desencadeou a necrose focal lítica, caracterizada pela alteração histopatológica não-específica. A necrose focal está localizada predominantemente em região dos hepatócitos inter-lobulares, onde o espalhamento varia de acordo com o nível da atividade da hepatite crônica (KARIN et al., 2014). Assim, a necrose focal limitada encontrada no presente estudo está relacionada com a manifestação de uma hepatite leve.

Durante a inflamação ocorre a secreção de importantes citocinas, por exemplo, TGF- β que são responsáveis pelo desencadeamento e intensificação da fibrogênese. TGF- β é uma citocina multifuncional que regula o crescimento, diferenciação, adesão e apoptose de vários tipos de células, bem como fibrose tecidual (ROBERTS; SPORN, 1990). Essa citocina é responsável por ativar as células de Ito no fígado estimulando-a a diferenciar em miofibroblastos com a expressão da proteína α -SMA, induzindo a síntese de componentes da ECM, principalmente, colágeno do tipo I e III (INAGAKI et al., 2001). Processo semelhante ocorre no rim, uma vez que TGF- β 1 induz a expressão de genes mesenquimais que estimulam a transição das células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos renais a diferenciar em miofibroblasto- α -SMA (MACK; YANAGITA, 2015).

QIN et al., 2016 observou que camundongos com fibrose hepática induzida por CCL₄, apresentavam aumento da expressão de TGF- β 1 e α -SMA. Quando esses animais eram tratados com anticorpo anti-IL-9, a expressão gênica de ambas as proteínas era diminuída, sendo acompanhada com a diminuição da fibrose.

Entretanto, nos nossos resultados observamos uma diminuição da expressão gênica de TGF- β 1 e α -SMA no fígado dos animais tratados com IL-9 a 200ng, sugerindo que ambas estavam sendo bastante secretadas, induzindo ativação das células de Ito. Contudo, o grau de ativação da via de sinalização de TGF- β 1 é constantemente regulada por diversos agonistas e antagonistas intracelulares e extracelulares, incluindo decorin, Smad7, Smurf, SARA, com intuito de gerar a homeostase no organismo (ZHU et al., 1999). Consequentemente com a regulação negativa da expressão de TGF- β 1,

leva a supressão de α -SMA, pois essa citocina é responsável por ativar a transcrição dessa proteína através da ativação de um complexo sistema de sinalização, no qual participa proteína kinase ativada por mitogeno (MAPK) e Smad (SEBE et al., 2008; BIA et al., 2014).

O desencadeamento do estresse oxidativo no tecido hepático e renal devido à exposição crônica com IL-9, sugerindo que a mesma pode interagir com células residentes nesses tecidos, interferindo no mecanismo de defesa antioxidant, gerando ROS, no qual inicia uma resposta inflamatória.

ROS afetou principalmente o grupamento sulfidrila (grupo tiol) presentes nas proteínas hepáticas e renais. Tiol está presente na composição estrutural de diversas proteínas, sendo requerido para atividade de numerosas enzimas. Em um ambiente oxidante, ocorre à formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol, oxidando as mesmas. Com a oxidação, ocorre a perda do grupo tiol levando a diversos danos, entre eles erro no dobramento, inativação catalítica e perdas de funções específicas, como ligação a metais e aminoácidos sulfurados (GILBERT; LEAN et al., 1990). Além disso, o estresse oxidativo pode gerar através do grupo tiol modificações no complexo I presente na membrana da mitocôndria, levando a disfunção mitocondrial, bem como desequilíbrio na atividade inflamação-imune, desencadeando resposta pró-inflamatória (TOMPKINS et al., 2006; COPPO; GHEZZI, 2011).

Igualmente, as proteínas podem ser oxidadas através da produção do grupo carbonila (CO) nas cadeias laterais dos aminoácidos prolina, arginina, lisina, resultando na disfunção enzimática e na função celular (DALLE-DONNE et al., 2003). Diversos estudos vêm mostrando a relação entre aumento da carbonilação protéica e a manifestação de doença hepática alcoólica aguda e crônica, bem como no consumo intenso de etanol (SMATHERS et al., 2011; FRITZ et al., 2011; SHEARN et al., 2014). No rim, o aumento nos níveis do grupo carbonila proporciona avanço na oxidação protéica, principalmente, no plasma de pacientes com distúrbio renal crônico. Esse aumento do “stress carbonila” pode induzir injuria renal, consequentemente, desencadear fibrose tecidual (WITKO-SASAT et al., 1998).

Entretanto, nos nossos resultados ocorreu uma diminuição do grupo carbonila tanto no tecido hepático quanto renal nos animais tratados com IL-9, mostrando essa citocina provocou um “stress carbonila”, mas que o organismo gerou uma resposta antioxidant a essa oxidação, levando a uma descarbonilização (SUZUKI et al., 2010). Isso sugere que o mecanismo celular regulador da carbonilação protéica é muito

complexo, no qual requer medidas de promoção e eliminação de proteína carbonila (WONG et al., 2008).

Para controlar todo esse cenário de estresse oxidativo, bem como limitar os danos ocasionados pelas ROS, a célula desenvolveram mecanismo de proteção através da regulação da expressão de genes antioxidantes. Entre as moléculas antioxidantes intracelulares mais importantes se destaca GSH, um tiol intracelular livre muito abundante. GSH reduz peróxido de hidrogênio e lipídeo peroxidação através da enzima glutationa peroxidase (LIU; GASTON, 2010). Outro importante mecanismo ocorre na redução de resíduos de cisteina tiolato (Cys –S⁻), altamente sensíveis a oxidação, juntamente com a reação catalizada de glutaredoxina. Durante a oxidação, os resíduos de cisteína, podem ser oxidados em ácido sulfênico (RSOH), sulfínico (RSO₂H) e sulfônico (RSO₃H). Ácido sulfênico pode reagir com GSH, e formar glutationilatio, sendo reduzida de volta a forma de tiol livre, revertendo à oxidação (BITEAU et al., 2003).

Esses dados corroboram com os resultados da nossa pesquisa, mostrando que devido à diminuição da atividade GSH no fígado e rim dos animais tratados com IL-9, levou a oxidação das proteínas ricas em grupo tiol, resultando na diminuição da atividade das sulfidrilas, bem como proporcionou o aumento da peroxidação lipídica. Além disso, alguns estudos vêm mostrando que baixa concentração de GSH, induz o desenvolvimento de fibrose tecidual (ROUM et al., 1985; TIROUVANZIAM et al., 2006).

O aumento de ROS desencadeia diversas reações metabólicas, muitas prejudiciais ao organismo, principalmente, afetando os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares formando hidro e lipoperóxidos que muito são reativos. A peroxidação lipídica causa alterações na permeabilidade e do fluxo iônico nas membranas celulares, podendo levar a necrose ou apoptose, consequentemente, dano nos tecidos e nos órgãos (BENZIE, 1996). Além disso, pode alterar a função mitocondrial, através da oxidação dos nucleotídeos piridina e consequentemente alteração na absorção de cálcio, bem como afeta algumas atividades enzimáticas do retículo endoplasmático, no qual altera a atividade de glicose-6-fosfatase, citocromo P-450 e a capacidade de seqüestros de cálcio (POLI et al., 1987).

O aumento da peroxidação lipídica está muito relacionado com aumento do estresse oxidativo, principalmente, durante o desenvolvimento de fibrose hepática e renal (GEORGE et al., 2003; CHO et al., 2012), tendo uma correlação positiva com os

resultados da presente pesquisa. Conforme dados obtidos neste estudo, a diminuição da peroxidação lipídica no fígado dos animais tratados com IL-9 está de acordo com o aumento da atividade da catalase. A catalase é uma importante enzima antioxidante responsável por converter peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em molécula de água e oxigênio, evitando possíveis danos celulares e teciduais (SPERANZA et al., 1993). De acordo com Imre et al. (1984), a elevação da atividade da catalase e diminuição do SOD está correlacionada com a baixa quantidade de H_2O_2 , dando de acordo com os nossos resultados.

A atividade de catalase no rim do grupo dos animais tratados com IL-9 foi baixa, juntamente com o SOD, contribuindo para o acúmulo de ânio superóxido (O^{2-}), e H_2O_2 provocando aumento da peroxidação lipídica e da oxidação protéica.

Além disso, o estresse oxidativo desencadeado pela IL-9 diminuiu a resposta antioxidante total no fígado e no rim avaliado por FRAP, sugerindo que mesmo a atividade da catalase estando elevada no fígado não foi suficiente para evitar oxidação das proteínas, consequentemente, dano celular. Isso indica que a produção de ROS foi maior que a resposta antioxidante, o que desencadeou uma exacerbação do estresse oxidativo (SZYMONIK-LESIUK et al., 2003).

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a IL-9 é capaz de promover a fibrose hepatorrenal e desregular os mecanismos anti-oxidantes desses órgãos. Nós imaginamos que a detecção da IL-9 no soro e na urina pode ser um importante potencial fator de mau prognóstico para desordens hepatorrenais. Além disso, a IL-9 apresenta-se como intervenções terapêuticas.

8 REFERÊNCIAS

- ABDELHALIM, M.A.; JARRAR, B.M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids in Health and Disease**, v.166, p.2-6, 2011.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.
- ALBILLAS, A.; LARIO, M.; ÁLVAREZ-MON, M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. **Journal Hepatology**, v. 61, p.1385-1396, 2014.
- ALVES, R.N. Efeito do tratamento com IL-3, IL-7 ou IL-9 em camundongos experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*. **Tese (Doutorado)** – Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, MG, 96f. 2015.
- ARMBRUST,T.; BATUSIC,D.; RINGE,B.; RAMADORI,G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis.**Journal Hepatology**, v. 26, p.1042-1054, 1997.
- ARRAS, M.; HUAUX, F.; VINK, A.; DELOS, M.; COUTELIER, J.P. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. **American Journal Respiration Cell Molecular Biology**, v. 24, p.368–75, 2001.
- BARNES JL, GORIN Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NADPH oxidases. **Kidney International**, v.79, p. 944-956. 2011.
- BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27, 1999.

BENZIE, I.F.F; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochimica**, v.239, p.70-76, 1996.

BEUTLER, E.; DURON O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p.882-90, 1963.

BIAN, E.B.; HUANG, C.; WANG, H.; CHEN, X.X.; ZHANG, L. et al. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. **Toxicology Letter**, v. 224, p.175–185, 2014.

BIHORAC A, BASLANTI TO, CUENCA AG, HOBSON CE, ANG D, EFRON PA, MAIER RV, MOORE FA, MOLDAWER LL. Acute kidney injury is associated with early cytokine changes after trauma. **Journal Trauma Acute Care Surgery**, v.74, p.1005-10013, 2013.

BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M.B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. **Nature**, v. 425, p.980–984, 2003.

BORDER, W.A; NOBLE, N.A. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. **National England Journal Medicine**, v.331, p.1286-1292, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRETT D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. **WOUNDS**, v.20, p.347-356, 2008.

BRUNT E.M.; KLEINER, D.E.; WILSON, L.A.; UNALP, A. BEHLING, C.E. Portal Chronic Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Histologic Marker of Advanced NAFLD—Clinicopathologic Correlations from the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. **Hepatology**, v.49, p.809-820, 2009.

BUTCHER, D.T.; ALLISTON, T.; WEAVER, V.M. A tense situation: Forcing tumour progression. **Nature Review Cancer**, v.9, p.108–122, 2009.

CAIRNS J. A., WALLS A. F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagenin human lung fibroblasts. **Journal Clinical Investigation**, v.99, p.1313–1321, 1997.

CHAUDIÈRE J, FERRARI-ILIOU R. Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food Chemical Toxicology**, v.37, p.949–62, 1999.

CHEN, P.; TORRALBA, M.; TAN, J.; EMBREE, M.; ZENGLER, K. et al. Supplementation of Saturated Long-Chain Fatty Acids Maintains Intestinal Eubiosis and Reduces Ethanol-induced Liver Injury in Mice. **Gastroenterology**, v.148, p.203–214, 2015.

CHO, M.H.; JUNG, K.J.; JANG, H.S.; KIM, J.I.; PARK, K.M. Orchectomy attenuates kidney fibrosis after ureteral obstruction by reduction of oxidative stress in mice. **American Journal Nephrology**, v.35, p.7-16, 2012.

CLOUSTON A. D., POWELL E. E., WALSH M. J., RICHARDSON M. M., DEMETRIS A. J., JONSSON J. R., et al. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. **Hepatology**, v. 41, p.809–818, 2005.

COPPO, L.; GHEZZI, P. Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines and innate immunity: protein S-thiolation as a novel molecular mechanism. **Biochemical Society Transactions**, v.39, p.1268–1272, 2011.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chemica Acta**, v.329, p.23-38, 2003.

DAVIS, G.L.; ALBRIGHT, J.E.; COOK, S.F.; ROSENBERG, D.M. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **Liver Transplant**, v.9, p.331–338, 2003.

DE LIMA PEREIRA, S.A.; DOS SANTOS, V.M.; RODRIGUES, D.B.R.; DA CASTRO, E.C.C.; DOS REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Medicine et Maladies Infectious**, v.37, p.229-233, 2007.

DECARIS, M.L.; EMSON, C.L.; KELVIN, L.; GATMAITAN, M.; LUO, F. Turnover Rates of Hepatic Collagen and Circulating Collagen-Associated Proteins in Humans with Chronic Liver Disease. **Plos One**, v.10, p.1-13, 2015.

DEL MONTE, U. Swelling of hepatocytes injured by oxidative stress suggests pathological changes related to macromolecular crowding. **Medical Hypotheses**, v.64, p.818–825. 2005.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; DRÜEKE, T.; WITKO-SARSAT, V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 14, p.193–199, 2001.

DESMET, V.J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J.H.; MANNS, M.; SCHEUER, P.J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, v.19, p.1513-1520, 1994.

DJAMALI, A.; VIDYASAGAR, A.; ADULLA, M.; HULLETT, D.; REESE, S. Nox-2 Is a Modulator of Fibrogenesis in Kidney Allografts. **American Journal Transplant**, v.9, p.74-82, 2009 .

DRÖGE, W . Oxidative stress and aging. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.543, p.191-200, 2003.

DUFFIELD, J.S.; FORBES, S.J.; CONSTANDINOU, C.M.; CLAY, S.; PARTOLINA, M.; VUTHOORI, S.; WU, S.; LANG, R.; IREDALE, J.P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. **Journal Clinical Investigation**, v.115, p.56-65, 2005.

DULTZ, G., PIPER, A.; ZEUZEM, S.; KRONENBERGER, B.; WAIDMANN, O. Proton pump inhibitor treatment is associated with the severity of liver disease and increased mortality in patients with cirrhosis. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.10, 1-9, 2015.

EDDY, A.A. Interstitial macrophages as mediators of renal fibrosis. **Experimental Nephrology**, v.3, p.76–79, 1995.

FALLOWFIELD, J.A.; MIZUNO, M.; KENDALL, T.J.; CONSTANDINOU, C.M.; BENYON, .RC.; DUFFIELD, J.S. et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. **Journal Immunology**, v.178, p. 5288–5295, 2007.

FERNANDES, C.G.; BORGES, C.G.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A.U.;KNEBEL, L.A. et al. Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.31, p. 1-9, 2011.

FRANTZ C, STEWART KM, WEAVER VM. The extracellular matrix at a glance. **Journal Cell Scientific**, v.123, p. 4195–4200, 2010.

FREITAS-FILHO, G.A.; SILVA, M.F.R.; BELETTI, M.E.; MACHADO, E.R.; SILVA, N.S. Efeito da irradiação laser de baixa potência Arsianeto de Gálio Alumínio (ASGAAL) de 784 nm sobre a cicatrização de lesão muscular: estudo experimental. **Revista UNIVAP**, v.13, p. 53-60, 2006.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology**, v.134, p. 1655–1669, 2008.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis - from bench to bedside. **Journal Hepatology**, v. 38, p. 38–53, 2003.

FRITZ, K.S.; GALLIGAN, J.J.; SMATHERS, R.L.; ROEDE, J.R.; SHEARN, C.T. et al. 4-Hydroxynonenal inhibits SIRT3 via thiol-specific modification. **Chemical Research Toxicology**, v.24, p.651–662, 2011.

GABBIANI, G.; MAJNO, G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. **American Journal Pathology**,v.66, p.131–146,1972.

GADD,V.L.; SKOIEN,R.; POWELL,E.E.; FAGAN, K.J.; WINTERFORD, C. The Portal Inflammatory Infiltrate and Ductular Reaction in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v.59, p.1393-1405.

GAO, B.; RADAЕVA, S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. **Biochim Biophysica Acta**, v.183, p.1061-1090, 2013.

GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKHOLTZ, D.; GILLERY, P.; REICH, R.; MAGUART. F.; LEVI-SCHAFFER, F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v.32, p.237-246, 2002.

GEORGE, J.; PERA, N.; PHUNG, N.; LECLERCQ, I.; YUN HOU, J.; FARRELL, G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. **Journal Hepatology**, v.39, p.756-764, 2003.

GIELING, R.G.; WALLACE, K.; HAN, Y.P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. **American Journal Physiology Gastrointestine Liver Physiology**, v.296, p.1324-1331, 2009.

GILBERT, H.F.; MC, L. V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances Enzymology Related Areas Molecular Biology**, v.63, p.169-172, 1990.

GO, A.S.; CHERTOW, G.M.; FAN, D.; MCCULLOCH, CE.; HSU, C.Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **The New England Journal of Medicine**, v. 351,p.1296 -1305, 2004.

GOSWAMI, R.; KAPLAN, M.H. A brief history of IL-9. **Journal Immunology**, v.186, p.1-14, 2011.

GREGERSEN, I.; SKIELLAND, M.; HOLM, S.; HOLVEN, K.; KROGH-SORENSEN, K. Increased Systemic and Local Interleukin 9 Levels in Patients with Carotid and Coronary Atherosclerosis. **Plos One**, v.8, p.1-6, 2012.

GRUBER B. L., KEW R. R., JELASKA A., MARCHESE M. J., GARLICK J., REN S., et al. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. **Journal Immunology**, v.158, p. 2310–2317, 1997.

GU, Z.W.; WANG, Y.X.; CAO, Z.W. T-Helper Type 9 Cells Play a Central Role in the Pathogenesis of Respiratory Epithelial Adenomatoid Hamartoma. **Medicine**, v.94, p. 1-9, 2015.

HAMMAN, K.; GRABBE, J.; WELKER, P.; HAAS, N.; ALGERMISSEN, B.; CZARNETZKI, B.M. Phenotypic evalution of cultured human mast and basophilic cells and of normal human skin mast cells. **Archives of Dermatological Research**, v.286, p.380-385,1994.

HAYDON,G.; LALOR, P.F.; HUBSCHER, S.G.; ADAMS, D.H. Lymphocyte recruitment to the liver in alcoholic liver disease. **Alcohol**, v.27,p. 29–36, 2002.

HEINRICHSA, D.; KNAUEL, M.; OFFERMANNSA, C.; BERRESA, M.L.; NELLENA, A. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. **PNAS**, v.108, p. 17444–17449, 2011.

HELLERBRAND,C.; JOBIN, C.; IIMURO, Y.; LICATO, L.; SARTOR, B.; BRENNER, D.A. Inhibition of NF κ B in Activated Rat Hepatic Stellate Cells by Proteasome Inhibitors and an I κ B Super-Repressor. **Hepatology**, v.27, p.1285-1295, 1998.

HEWITSON, T.D. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. **American Journal Physiology**, v. 296, p.1239–1244, 2009.

HOPPENOT,D.; MALAKAUSKAS,K.; LAVINSKIENĖ,S.; BAJORIŪNIENĖ,I.; KALINAUSKAITĖ, V.; SAKALAUSKAS, R. Peripheral blood Th9 cells and eosinophil apoptosis in asthma patients. **Medicine**, v. 51, p.10-17, 2015.

HULMES, D.J.S. Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. In: FRATZL, P. **Collagen: Structure and Mechanics**. New York: Springer, 2008. p.15-47.

HYNES, R.O. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, p.1-11, 2009.

IDE, M.; KUWAMURA, M.; KOTANI, T.; SAWAMOTO, O.; YAMATE, J. Effects of gadolinium chloride (GdCl₃) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p. 92–102, 2005.

IMRE, S.; TÓTH, F.; FACHET, J. Superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in liver of young mice of different ages. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.28, p.297-304,1984.

INAGAKI, Y.; MAMURA, M.; KANAMARU, Y.; GREENWELL, P.; NEMOTO, T.; TAKEHARA, K.; NAKAO, A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. **Journal Cell Physiology**, v. 187, p.117-123, 2001.

IRADELE, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 539- 548. 2007.

ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA F, DE GROOTE J. et al. Histologic and staging of chronic hepatitis. **Journal Hepatologic**, v. 24, p.289-293, 1995.

IWANO, M.; PLIETH, D.; DANOFF, T.M; XUE, C; OKADA, H; NEILSON, EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. **Journal Clinical Investigation**, v.110, p.341–350, 2002.

JENNINGS, P.; CREAN, D.; ASCHAUER, L.; LIMONCIEL, A.; MOENKS, K. Interleukin-19 as a translational indicator of renal injury. **Archives Toxicology**, v.89, p.101-108, 2015.

JIN, H.; XU, Q.; ZHOU, P.; DING, Y.; ZHANG, Z.; YU, P. Impaired GP-91^{PHOX} gene expression and dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients maintaining hemodialysis. **Chinesis Medical Journal**,v.113, p.120–123,2000.

JORDANA, M. Mast cells and fibrosis – who´s on first? **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.8, p.7-8, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemistry Journal**, v.11, p.447-55, 1979.

KADLER, K.E.; CLAIR, B.; JORDI, B.; RAYMOND, P.; BOOT-HANDFOR, D. Collagens at a glance. **Journal of Cell Science**, v.120, p.1955-1958, 2007.

KANAMARU Y, SCANDIUZZI L, ESSIG M, BROCHETTA C, GUÉRIN-MARCHAND C,et al.**Journal Immunology**, v. 176, p. 5607-5615, 2006.

KARIN M, BEVANDA M, BABIĆ E, MIMICA M, BEVANDA-GLIBO D. Correlation between biochemical and histopathological parameters in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon and ribavirin. **Psychiatria Danubina**, v.26, p.364–369, 2014.

KARLMARK, K.R.; WEISKIRCHEN, R.; ZIMMERMANN, H.W.; GASSLER, N.; GINHOUX, F.; WEBER, C. et al. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. **Hepatology**, v.50, p.261–274, 2009.

KERSHENOBICH, S. D.; WEISSBROD, A.B. Liver fibrosis and inflammation. Review. **Annals of Hepatology**, v.4, p. 63-159, 2003.

KIM, J.; SEOK, Y.M.; JUNG, K.; PARK, K.M. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.297, p.461-470, 2009.

KIMURA, K.; WAKAMATSU, A.; SUZUKI, Y.; OTA, T.; NISHIKAWA, T. et al. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. **Genome Research**, v.16, p.55–65, 2006.

KIRMAZ, C.; TERZIOGLU, E.; TOPALAK, O.; BAYRAK, P.; YILMAZ, O.; ERSOZ, G. et al. Serum transforming growth factorbeta1(TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. **European Cytokine Network**, v.15, p. 112-116, 2004.

KISSELEVA,T.; BRENNER, D.A. Fibrogenesis of parenchymal organs. **Proceedings of the Thoracic Society**, v. 5, p.338-342. 2008.

KITAMOTO, K.; MACHIDA, Y; UCHIDA, J; IZUMI, Y.; SHIOTA, M.N. et al. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. **Journal Pharmacology Science**,v.111, p.285–292, 2009.

KNIGHT, V.; TCHONGUE, J.; LOURENSZ, D.; TIPPING, P.; SIEVERT, W. Protease-activated receptor 2 promotes experimental liver fibrosis in mice and activates human hepatic stellate cells. **Hepatology**, v.55, p.879-87, 2012.

KOCH, S.; SOPEL, N.; FINOTTO, S. Th9 and other IL-9 producing cells in allergic asthma. **Seminars in Immunopathology**, v.39, p. 55-68, 2016.

KRUGER, T.; BENKE, D.; EITNER, F.; LANG, A.; WIRTZ, M. et al. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. **Journal American Society Nephrology**, v.15, p.613–621, 2004.

KYLE RA, THERNEAU TM, RAJKUMAR SV, LARSON DR, PLEVAK MF, OFFORD JR, DISPENZIERI A, KATZMANN JA, MELTON LJ. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. **National England Journal Medicine**, v.354, p.1362–1369, 2006.

LALOR, P.F.; ADAMS, D.H. Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. **Molecular Pathology**, v. 52, p.214-219, 1999.

LAZO, M.; HERNAEZ, R.; BONEKAMP, S.; KAMEL, I.R.; BRANCATI, F.L.; GUALLAR, E. et al. Non alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. **British Medical Journal**, v. 343, p. 1-9. 2011.

LEBLEU, V.; TADURI, G.; CONNELL, J.; TENG, Y.; VESSELINA, G. Origin and Function of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. **Nature Medicine**, v.19, p.1047–1053, 2013.

LI, Y.; KIM, B.G.; QIAN, S.; LETTERIO, J.J.; FUNG, J.J.; LU, L. et al. Hepatic Stellate Cells Inhibit T Cells through Active TGF- β 1 from a Cell Surface Bound Latent TGF- β 1/GARP Complex. **Journal of Immunology**, v.195, p.2648-2656, 2015.

LIAW, Y.F.; SUNG, J.J.; CHOW, W.C.; FARRELL, G.; LEE, C.Z. et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v.351, p. 1521-1531, 2004.

LIN, S. L., CASTAÑO, A. P., NOWLIN, B. T., LUPHER, M. L. JR & DUFFIELD, J. S. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. **Journal Immunology**, v. 183, p.6733–6743, 2009.

LIU Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. **Journal American Sociedad Nephrology**, v.15, p.1–12, 2004.

LIU, R.M.; GASTON, P. K.A. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. **Free Radical Biology Medicine**, v.48, p.1-15, 2010.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature**, v.7, p. 684-696, 2011.

LONNEMANN, G.; SHAPIRO, L.; ENGLER-BLUM, G. et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis, I: interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. **Kidney International**, v. 47, p.837–844,1995.

LUEDDE, R.F.; SCHWAB,E. NF-kappaB in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nature Review Gastroenterology Hepatology**, v.8, p.108–118, 2011.

MACK, M.; YANAGITA, M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. **Kidney International**, v. 87, p.297–307, 2015.

MELHEM, N.; MUHANNA, A.; BISHARA, C.E.; ALVAREZ, Y.T.; BISHARA, A.; HORANI, M. et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. **Journal Hepatology**, v.45, p. 60–71. 2006.

MISSERI, R.; MELDRUM, D.R; DINARELLO, C.A. et al. TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. **American Journal Physiology Renal**, v.288, p.406–411,2005.

MOKDAD, A.A.; LOPEZ, A.D.; SHAHRAZ, S.; LOZANO, R.; MOKDAD, A.H.; STANAWAY, J. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Medicine**, v. 12, p.1-9, 2014.

MUHANNA, N.; DORON, S.; WALD, O.; HORANI, A.; EID, A.; PAPPO, O. et al. Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: a novel pathway of fibrogenesis. **Hepatology**, v. 48, p.963–977. 2008.

MURATA, K.; KUDO, M.; ONUMA, F.; MOTOYAMA, T. Changes of collagen types at various stages of human liver cirrhosis. **Hepatogastroenterology**, v. 31, p.158-161, 1984.

NELSON, P.J; REES, A.J; GRIFFIN, M.D; HUGHES, J.; KURTS, C.; DUFFIELD, J. et al. The renal mononuclear phagocytic system. **Journal American Sociedad Nephrology**, v. 23, p.194–203, 2012.

NIEDERMEIER, M.; REICH, B.; RODRIGUEZ, G.M; DENZEL, A.; SCHMIDBAUER, K.; GOBEL N. et al. CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, p.17892–17897, 2009.

NORTON, W.H.J.; LEDIN, J.; GRANDEL, H.; NEUMANN, C.J. HSPG synthesis by zebrafish Ext2 and Extl3 is required for Fgf10 signalling during limb development. **Development**, v.132, p. 4963–4973, 2005.

NOVOBRANTSEVA, T.I.; MAJEAU, G.R.; AMATUCCI, A.; KOGAN, S.; BRENNER, I.; CASOLA, S. et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. **Journal Clinical Investigation**, v.115, p. 3072-3082.

OAKLEY, F.; MESO, M.; IREDALE, J.P.; GREEN, K.; MAREK, C.J.; ZHOU, X. et al. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. **Gastroenterology**, 128, p. 300-310, 2005.

OGAWA, M.; MORI, T.; MORI, Y.; UEDA, S.; AZEMOTO, R.; MAKINO, Y. et al. Study on chronic renal injuries induced by carbon tetrachloride: selective inhibition of the nephrotoxicity by irradiation. **Nephron**, v. 60, p.68-73, 1992.

OGETURK, M.; KUS, I.; KAVAKLI, A.; ONER, J.; KUKNER, A.; SARSILMAZ, M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. **Cell Biochemistry and Function**, v.23, p.85-92, 2005.

OKUNO, T.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; ARAKI, Y.; FUJIVAMA, Y.; FUJIVAMA, M. et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.37, p. 317–32, 2002.

OZTURK A.; BALTAZI, A.K.; MOGULKOC, R.; OZTEKIN, E.; SIVRIKAYA, A.; KURTOGLU, E.; KUL, A. Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. **Biology Trace Element Research**, v.94, p.157-166.

PELLICORO, A.; AUCOTT, R.L.; RAMACHANDRAN, P.; ROBSON, A.J.; FALLOWFIELD, J.A.; SNOWDON, V.K. et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. **Hepatology**, v.55, p.1965–1975. 2012.

PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J.P.; FALLOWFIELD, J.A. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p.181-194, 2014.

PERRY, G.; NUNOMURA, A.; HIRAI, K.; TAKEDA, A.; ALIEV, G.; SMITH, M.A. Oxidative damage in Alzheimer's disease: the metabolic dimension. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p. 417-421, 2000.

POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.117-142, 1987.

POONKHUM,R.; PRADIDARCHEEP, W.; NILBU-NGA, S.; CHAUNCHAIYAKUK, S. Distribution of Hepatic Myofibroblasts and Type I and III Collagen in Rat Liver Cirrhosis Induced by Thioacetamide. **International Journal Morphologie**, v.29, p.501-508, 2011.

POSTLETHWAITE, A.E.; KESKI-OJA, J.; MOSES, H. L.; KANG, A.H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. **Journal Experimental Medical**, v. 165, p. 251–256, 1987.

PRADERE, JP.; KLUWE, J.; DE MINICIS, S.; JIAO, J.J.; GWAK, G.Y.; DAPITO, D.H. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 58, p.1461–1473, 2013.

PROBERT, C.S.; CHRIST, A.D.; SAUBERMANN L.J.; TURNER, J.R.; CHOTT, A.; CARR-LOCKE, D. Oligoclonality, T cell clonal persistence, and epithelial cell recognition. **Journal Immunology**, v.158, p.1941-1948, 1997.

QIN, S.Y.; LU, D.H.; GUO, X.Y; LUO, W.; HU, B.L. et al. A deleterious role for Th9/IL-9 in hepatic fibrogenesis. **Scientific Reports**, v. 6, p.1-12.

RABB, H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney. **Kidney International**, v. 61, p.1935-1946, 2002.

RABB, H.; DANIELS, F.; O'DONNELL, M.; HAQ, M.; SABA, SR.; KEANE, W.; TANG, WW. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-

reperfusion injury in mice. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v.279, p. 525-531, 2000.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v.233, p.357-363; 1994.

RICARDO, S.D; GOOR, H.V; EDDY, A.A. Macrophage diversity in renal injury and repair. **Journal Clinical Investigation**, v.118, p.8-11, 2008.

ROBERTS, A. B.; SPURN, M.B. 1990. The transform!n~ growth factor-is. **In Peptide Growth Factors and Their Receptors I**. Springer-Verlag, New York, 1990.

ROBERTS, I.S.D; BRENCHLEY, P.E.C. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. **Journal Clinical Pathology**, v. 53, p.858-862, 2000.

RONIS, M.J., HUANG, J., LONGO, V., TINDBERG, N., INGELMAN-SUNDBERG, M., BADGER, T.M. Expression and distribution of cytochrome P450 enzymes in male rat kidney: effects of ethanol, acetone and dietary conditions. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p.123–129, 1998.

ROUM JH, BUHL R, MCELVANY NG, BOROK Z, CRYSTAL RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. **Journal of Applied Physiology: Respiration, Environmental and Exercise Physiology**, v.75, p.2419–2424, 1993.

RUSH, G.F., SMITH, J.H., NEWTON, J.F., HOOK, J.B. Chemically induced nephrotoxicity: role of metabolic activation. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 13, p.99–160, 1984.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v.133, p.775–787, 2008.

SALMI M, ADAMS D, JALKANEN S. Cell adhesion and migration. IV Lymphocyte trafficking in the intestine and liver. **American Journal Physiology**, v.274, p.1-6, 1998.

SAMPSON, N.; KOZIEL, R.; ZENZMAIER, C.; BUBENDORF, L.; PLAS, E. et al. ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 503-515, 2011.

SÁNCHEZ-VALLE, V.; CHÁVEZ-TAPIA, N.C.; URIBE, M.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.4850–4860, 2012.

SCHIEPPATI A, REMUZZI G. Chronic renal diseases as a public health problem: Epidemiology, social, and economic implications. **Kidney International** 2005, v. 68, p. 7–10, 2005.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F.B.; ALZAHABI, B.; MCGOWAN, T.A. et al. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. **Diabetes**, v. 46, p. 854–859, 1997.

SHEARN, C.T.;MERCER,K.E.; ORLICKY, D.J.; HENNINGS, L.; SMATHERS-MCCULLOUGH, R.L. Short Term Feeding of a High Fat Diet Exerts an Additive Effect on Hepatocellular Damage and Steatosis in Liver-Specific PTEN Knockout Mice. **Plos One**, v.9, p.1-11, 2011.

SINGAL, A.K.; JAMPANA, S.C; WEINMAN, S. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. **Liver International**, 31, p.1432-144, 2011.

SMATHERS, R.L.; GALLIGAN, J.J.; STEWART, B.J.; PETERSEN, D.R. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. **Chemica Biology Interaction**, v. 192, p.107–112. 2011.

SOUSSI-GOUNNI, A; KONTOLEMOS, M.; HAMID, Q. Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. **Journal Allergy Clinica Immunology**, v.107, p.575–582. 2001.

SOYLEMEZOGLU, O.; WILD, G.; DALLEY, A.J.; MACNEIL, S.; MILFORD-WARD, A. Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.12, p.1883-1889, 1997.

SOYLEMEZOGLU, O.; WILD, G.; DALLEY, A.J.; MACNEIL, S.; MILFORD-WARD, C.B.; BROWN, A.M.; NAHAS, EL. Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.12, p.1883-1889, 1997.

SPERANZA,M.; BAGLEY, A.C.; LYNCH, R.E. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin, and paraquat. **Journal Biology Chemical**, v. 268, p.19039– 19043, 1993.

SUGIHARA, A.; TSUJIMURA, T.; FUJITA, Y.; NAKATA, Y.; TERADA, N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. **Journal Hepatology**, v.30, p.859-867, 1999.

SUZUKI,Y.S.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, A.D. Protein Carbonylation. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 12, p.323-325, 2010.

SZYMONIK-LESIUK S., CZECHOWSKA G., STRYJECKAZIMMER M., SLOMKA M., MADRO A. et al. Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. **Journal Hepatobiliary Pancreaty**, v.10, p. 309-315, 2003.

TAKATO H, YASUI M, ICHIKAWA Y, WASEDA Y, INUZUKA K, NISHIZAWA Y, ET AL. The specific chymase inhibitor TY-51469 suppresses the accumulation of neutrophils in the lung and reduces silica-induced pulmonary fibrosis in mice. **Experimental Lung Research** v.37, p.101–108, 2011.

TCHOUGOUNOVA E., LUNDEQUIST A., FAJARDO I., WINBERG J. O., ABRINK M., PEJLER G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. **Journal Biology Chemistry**, v.280,p.9291–9296, 2005.

TEPEL, M.D; GIET, M.D; SCHWARZFELD. C.; LAUFER, M.D; LIERMANN, D. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **The New England Journal of Medicine**, v.18, p.180-184, 2000.

THAPA, M.; CHINNADURAI, R.; VELAZQUEZ, V.M.; TEDESCO, D.; ELROD, E.; HAN J.H.; SHARMA, P.; IBEGBU, C.; GEWIRTZ, A.; ANANIA, F.; PULENDRAN, B.; SUTHAR, M.S.; GRAKOUI, A. Liver fibrosis occurs through dysregulation of MyD88-dependent innate B-cell activity. **Hepatology**, v. 61, p.2067-2079, 2015.

THERRIEN, F.J; AGHARAZII, M.; LEBEL, M; LARIVIÈRE, R. Neutralization of tumor necrosis factor-alpha reduces renal fibrosis and hypertension in rats with renal failure. **American Journal Nephrology**, v.36, p.151-61, 2012.

TIROUVANZIAM R, CONRAD CK, BOTTIGLIERI T, HERZENBERG LA, MOSS RB. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.** v.103, p.4628–4633, 2006.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia norma e patológica.** São Paulo: Editora Manole, 2003.331p.

TOMPKINS, A.J.; BURWELL, L.S.; DIGERNESS, S.B.; ZARAGOZA, C.; HOLMAN, W.L.; BROOKES, P.S. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. **Biochimica e Biophysica Acta.** v.1762, p. 223-231, 2006.

TSUTSUI, H.; NISHIGUCHI, S. Importance of Kupffer Cells in the Development of Acute Liver Injuries in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p. 7711-7730, 2014.

TUNG-HUNG, S.; JIA-HORNG, K.; CHUN-JEN, L. Molecular mechanism and treatment of viral hepatitis-related liver fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.10578–10604, 2014.

VANDERKERKEN, K.; BOUWENS, L.; DE NEVE, W.; VAN, D.B.K; BAEKELAND, M.; DELENS, N. et al. Origin and differentiation of hepatic natural killer cells (pit cells). **Hepatology**, v.18, p. 919–925. 1993.

VEERAPPAN, A.; REID, A.C.; CONNOR, N.; MORO, R.; BRAZIN, J.A. et al. Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 302, p.192–204, 2012.

WANG, L.; LIU, XH.; CHEN, H.; CHEN, Z.Y.; WENG, X.D.; QIU, T.; LIU, L. Picroside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF- κ B pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, p.1253-1258, 2015.

WEHR, A.; BAECK, C.; HEYMANN, F.; NIEMIETZ, P.M.; HAMMERICH, L.; MARTIN, C. et al. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. **Immunology Journal**, v.190, p.5226-5236, 2013.

WEINBREN, K.; STIRLING, G. A.: Pathology of viral hepatitis. **British Medical Bulletin**,v. 28, p.125-130, 1972.

WELLER K., FOITZIK K., PAUS R., SYSKA W., MAURER M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The FASEB Journal**, v.20, p.1-12, 2006.

WELLER, K.; FOITZIK, K.; PAUS, R.; SYSKA, W.; MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **The FASEB Journal**, v.20, p.2366-2368, 2006.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN, K.T.; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A.T.; et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal Immunology**, v. 161, p.2524- 2532, 1998.

WOLTMAN, A.M.; DE FIJTER, J.W.; ZUIDWIJK, K.; VLUG, A.G.; BAJEMA, I.M.; VAN, S.W; VAN, V.; VAN, C. Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. **Kidney International**, v.71, p.1001–8, 2007.

WONG, C.M.; CHEEMA, A.K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y.J. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. **Circulation Research**,v.102, p.310–318. 2008.

WU, J. F.; ZENG, G.L.; SHEN, W.; YANG, M.; WANG, F.; TIAN, L. et al. Up-regulation of major histocompatibility complex class I-related molecules A (MICA) induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v.17, p. 675–678, 2009.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology** v. 214, p. 199–210, 2008.

WYNN, T.A. Fibrotic disease and the Th1-Th2 paradigm. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p. 583-594, 2004.

YAGI, K. Simples assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**, v.108, p.101-106, 1998.

YOSHIOKA, K.; TOHDA, M.; TAKEMURA, T.; AKANO, N.; MATSUBARA, K. et al. Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. **Journal Pathology**, v.162, p.141-148, 1990.

YOSHIOKA,K.; TAKEMURA,T.; MURAKAMI,K.; OKADA,M.; HINO,S.; MIYAMO. O. H.; MAKI, S. Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in

normal and diseased human kidneys. **Laboratory Investigation**, v. 68, p. 154-163, p.1993.

ZHOU, S.Y.; XIAO, W.; PAN, X.J.; ZHU, M.X.; YANG, Z.H.; ZHENG, C.Y. Thrombin promotes human lung fibroblasts to proliferate via NADPH oxidase/reactive oxygen species/extracellular regulated kinase signaling pathway. **Chinese Medical Journal**, v. 123, p. 2432-2439. 2010.

ZHOU, W.; ZHANG, Q.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World Journal of gastroenterology**, v.20, p.7312-7324, 2014.

ZHU, H., KAVSAK, P., ABDOLLAH, S., WRANA, J.L.; THOMSEN, G.H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. **Nature**, v. 400,p.687–693,1999.

ZIMMERMANN, H.W.; TRAUTWEIN, C.; TACKE, F.. Functional Role of Monocytes and Macrophages for the Inflammatory Response in Acute Liver Injury. **Frontiers in Physiology**, v.3, p. 1-18, 2012.

ANEXO 1

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 082/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 006/16

Projeto Pesquisa: "Papel da citocina il-9 no processo de fibrose hepática".

Pesquisador Responsável: Claudio Vieira da Silva.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 06 de maio de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU