



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

THIAGO DE ALMEIDA OLIVEIRA

Dissertação de mestrado intitulada:

Efeito do receptor PPAR α na modulação da produção de proteínas de fase aguda e de fatores do complemento em cultivo primário em hepatócitos bovinos *in vitro*

Juiz de Fora

2017

| | | |
|-----------------|--|-------------|
| ICB/UFJF | THIAGO DE ALMEIDA OLIVEIRA Efeito do receptor PPAR α na modulação da produção de proteínas de fase aguda e de... | 2017 |
|-----------------|--|-------------|

THIAGO DE ALMEIDA OLIVEIRA

**EFEITO DO RECEPTOR PPAR α NA MODULAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E DE FATORES
DO COMPLEMENTO EM CULTIVO PRIMÁRIO EM HEPATÓCITOS
BOVINOS *IN VITRO***

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas - Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Marco Antônio Machado
Coorientadora: Dra. Wanessa Araújo Carvalho

Juiz de Fora

2017

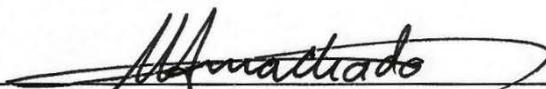
THIAGO DE ALMEIDA OLIVEIRA

**EFEITO DO RECEPTOR PPAR α NA MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA E DE FATORES DO COMPLEMENTO EM
CULTIVO PRIMÁRIO EM HEPATÓCITOS BOVINOS *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 28/06/2017.

BANCA EXAMINADORA:



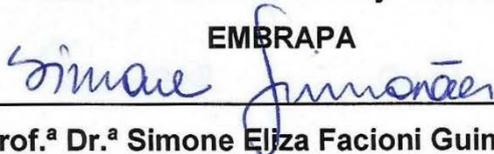
Prof. Dr. Marco Antônio Machado

EMBRAPA



Prof.ª Dr.ª Wanessa Araújo Carvalho

EMBRAPA



Prof.ª Dr.ª Simone Eliza Facioni Guimarães

Universidade Federal Viçosa

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

A Deus, que me permitiu iniciar e encerrar essa etapa da minha vida;

Ao Dr. Marco Antônio Machado, por estar sempre disposto a tirar dúvidas e orientar em todos os momentos;

À Dra. Wanessa Araújo Carvalho, pela confiança depositada e por dispor de seu tempo para ensinar e despertar curiosidade pela ciência;

À minha família e namorada, por compreenderem as dificuldades durante esse período e sempre apoiarem minhas decisões;

Ao laboratório de Genética molecular da Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, por todo o auxílio durante a concretização do Mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia) da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG, por me conceder essa oportunidade única;

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora-MG, por sempre se mostrarem dispostos a ajudar;

À Embrapa, FAPEMIG, CAPES, CNPq e MCTI/CNPq/INCT - Ciência Animal pela ajuda financeira para concretização do projeto.

RESUMO

A modulação da resposta imune inata é uma ferramenta capaz de melhorar a capacidade do sistema imune em combater a infecção por patógenos e outros estímulos externos. A utilização de vias sinalizadoras com a participação de alguns receptores específicos, como o *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) surgiria como importante hipótese para modular a produção de proteínas de fase aguda (PFA) e de fatores do sistema complemento em células de fígado bovino, órgão principal envolvido na produção dessas moléculas em nível sistêmico. Desse modo, objetivou-se estabelecer um protocolo de cultivo primário de hepatócitos bovinos que possibilitasse uma análise das vias de sinalização intracelulares, além de verificar a expressão gênica e produção das proteínas relacionadas ao sistema imune inato. Nesse sentido, foram coletados hepatócitos bovinos, provenientes de cinco animais, que foram isolados, cultivados e ativados com um ligante desse receptor nuclear (fenofibrato), tanto sozinho quanto em associação com estímulos pró-inflamatórios, em diferentes concentrações. Após 48 horas de cultivo as células tiveram seu ácido ribonucleico (RNA) extraído e quantificado, seguindo-se à síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) e realização das reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), a fim de verificar a expressão e produção de proteínas de fase aguda e do sistema complemento nas células dos bovinos com os diversos estímulos. Os sobrenadantes de cultura também foram avaliados após esse período de tempo, onde foram dosadas as mesmas proteínas, por meio da técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Os resultados demonstraram que o isolamento e o cultivo dos hepatócitos se provou pouco eficiente, uma vez que o RNA obtido apresentou baixa concentração e integridade comprometida, indicando que mais estudos devem ser feitos para aprimorar a padronização dessa técnica. Considerando-se as baixas quantificações e qualidade do RNA, não foi possível acessar o papel do receptor PPAR α na expressão gênica e na produção dos fatores de complemento e das proteínas de fase aguda analisadas, frente ativação pelo seu ligante específico (fenofibrato). Dessa maneira, o desenvolvimento das metodologias de isolamento e cultivo de hepatócitos deve ser continuado para permitir uma melhor avaliação das vias de sinalização intracelulares e a busca de novas moléculas capazes de modular expressão gênica e síntese de proteínas, relacionadas ao sistema imune em bovinos.

Palavras-chave: Bovino. PPAR α . Proteínas de fase aguda. Sistema complemento. Imunomodulação.

ABSTRACT

The innate immune modulation is a tool capable of improve the immune system capacity to fight infections by pathogens and other external stimuli. The use of signaling paths with participation of some specific receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) arises as an important hypothesis to modulate the acute phase proteins (APP) and complement proteins in bovine liver cells, where most of these molecules are produced in a systemic level. In this way, this work aimed to establish a protocol of primary culture of bovine hepatocytes suitable to analyze intracellular signaling paths and genetic expression and synthesis of proteins related to innate immune system. For that, bovine hepatocytes from five different animals were isolated, cultivated and activated by a receptor ligand - fenofibrate, both alone and associated with proinflammatory stimuli, in different concentrations. After 48 hours of culture, ribonucleic acid (RNA) was extracted and quantified, complementary deoxyribonucleic acid was synthesized and real-time polymerase chain reactions were setup to verify the acute phase and complement proteins expression and synthesis. The culture supernatant was used to analyze the protein dosage by *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). The results showed that the hepatocytes isolation and culture were not very effective, since the extracted RNA showed low concentration and bad integrity, indicating that more studies must be performed to standardize this technique. Considering the low quantification and bad quality of RNA, it was not possible to access the role of the receptor PPAR α in complement factors and acute phase proteins genetic expression and production, when activated by its specific ligand (fenofibrate). Thus, the development of isolation and culture techniques for bovine hepatocytes must continue to be developed in order to better evaluate the intracellular signaling pathways and the search for new molecules capable to modulate proteins related to the immune system in bovines.

Keywords: Bovine. PPAR α . Acute phase proteins. Complement system. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** As três vias de ativação da cascata do sistema complemento com as respectivas proteínas envolvidas (ABBAS *et al.*, 2012).....21
- Figura 2.** A ativação do PPAR- α e atuação no núcleo para regulação de alguns genes (FRUCHART *et al.*, 2009).....26
- Figura 3.** Mecanismos de modulação da regulação de respostas inflamatórias mediados pelos receptores PPAR (DAYNES & JONES, 2002).....29
- Figura 4.** Esquema resumido do delineamento experimental utilizado para determinação do efeito imunomodulador de PPAR α sobre fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos *in vitro*.....34
- Figura 5.** Número absoluto de células viáveis logo após o isolamento de hepatócitos bovinos com diferentes concentrações de colagenase (0,1%; 0,05%; 0,02%; 0,01%). Eixo y: Número absoluto de células x 10⁶. Eixo x: Concentrações distintas de colagenase utilizada para o isolamento.....45
- Figura 6.** Viabilidade de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro* com utilização de três diferentes metodologias e com dois meios de cultivo distintos após 48 horas de cultivo. No eixo y: Viabilidade de hepatócitos calculado pela divisão do número de células viáveis pelo número total contado na câmara de Neubauer. No eixo x: Diferentes metodologias de isolamento e meios de cultivo utilizados. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; HMM: *Hepatocyte Maintenance Medium* ($p > 0,05$).....47
- Figura 7.** Viabilidade de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro* com quatro diferentes tempos de cultivo no meio HMM. No eixo y: Viabilidade de hepatócitos calculado pela divisão do número de células viáveis pelo número total contado na câmara de Neubauer após diferentes tempos de cultivo. No eixo x: Diferentes tempos de cultivo utilizados ($*p < 0,05$).....47
- Figura 8.** Cultivo primário de hepatócitos bovinos. Fotografias representativas do isolamento primário de hepatócitos nos tempos de 0 e 48 horas no aumento de 40x (A, B), respectivamente. As setas representam hepatócitos.....48
- Figura 9.** Quantificação de RNA extraído com utilização de três diferentes quantidades iniciais de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro*. No eixo Y: Quantificação de RNA em ng/ μ L. No eixo X: três diferentes quantidades iniciais aplicadas para extração ($*p < 0,05$).....49
- Figura 10.** Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e de proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos frente estímulos com DMSO e fenofibrato nas concentrações de 100, 200 e 400 μ M após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina ($p > 0,05$, n=5 animais).....52

Figura 11. Concentração de proteínas do complemento (C1q) e de proteínas de fase aguda (SAA e α 1-AGP) em ng/mL em sobrenadantes de cultura de hepatócitos bovinos. Foram avaliadas células não estimuladas, incubadas com fenofibrato (200 e 400 μ M) e com DMSO (veículo) após 48 horas de cultivo juntamente com as respectivas análises de regressão linear, correlacionando a concentração das proteínas e a do fenofibrato. A e B: Proteína C1q; C e D: Proteína SAA; E e F: proteína α 1-AGP ($p > 0,05$, $n = 3$ animais).....54

Figura 12. Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos frente estímulos com DMSO e fenofibrato nas concentrações de 100, 200 e 400 μ M juntamente com associação de interleucinas pró-inflamatórias após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina; IL: associação de IL-1 β + IL-6 + TNF α ($p > 0,05$, $n = 5$ animais).....55

Figura 13. Concentração de proteínas do complemento (C1q) e de proteínas de fase aguda (SAA e α 1-AGP) em ng/mL em sobrenadantes de cultura de hepatócitos bovinos. Foram avaliadas células estimuladas com IL-1 β + IL-6 + TNF α , estimuladas com diferentes concentrações de fenofibrato (200 e 400 μ M), e com DMSO (veículo), associados ao controle pró-inflamatório IL-1 β + IL-6 + TNF α , após 48 horas de cultivo juntamente com as respectivas análises de regressão linear, correlacionando a concentração das proteínas e a do fenofibrato associado a IL-1 β + IL-6 + TNF α . A e B: Proteína C1q; C e D: Proteína SAA; E e F: proteína α 1-AGP ($p > 0,05$, $n = 3$ animais).....56

Figura 14. Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos estimulados com DMSO e diferentes concentrações de fenofibrato (100, 200 e 400 μ M) associado ao LPS após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina; Veículo: DMSO; LPS: lipopolissacarídeo ($p > 0,05$, $n = 5$ animais).....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências utilizadas para a reação de qPCR, concentrações de *primer* utilizadas, temperatura de ligação utilizada em cada reação e valor da eficiência de cada um dos genes. F: sequência *forward* do *primer*; R Sequência *reverse* do *primer*; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; RPLP0: *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*.....40

Tabela 2. Quantificação média de RNA extraído de hepatócitos isolados de fígado bovino e tratados com diversos estímulos, bem como as razões médias de 260/280 e 260/230. ILs: associação de IL-1 β , IL-6 e TNF α ; LPS: lipopolissacarídeo; DMSO: dimetilsulfóxido (n=5 animais).....50

Tabela 3. Viabilidade celular, quantificação média e qualidade de RNA extraído de hepatócitos isolados de fígado bovino em diferentes tempos (*p<0,05).....51

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E ACRÔNIMOS

| | |
|-----------------|---|
| α 1- AGP | <i>Alpha 1-acid glycoprotein</i> (Alfa 1-glicoproteína Ácida) |
| ANOVA | Análise de Variância |
| AP-1 | <i>Activator Protein 1</i> (Proteína Ativadora 1) |
| BACT | Beta actina |
| °C | Graus Célsius |
| C1 | Proteína do complemento 1 |
| C1q | Proteína do complemento 1 subunidade q |
| C2 | Proteína do complemento 2 |
| C3 | Proteína do complemento 3 |
| C4 | Proteína do complemento 4 |
| C5 | Proteína do complemento 5 |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| C/EBP β | CCAT box/enhancer-binding protein β |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CNA | Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil |
| cDNA | Ácido Desoxirribonucleico complementar |
| Ct | Threshold Cycle |
| CRP | Proteína C reativa |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |

| | |
|---------|--|
| DTT | <i>Dithriothreitol</i> (Ditiotreitol) |
| E | Eficiência |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático de Ligação à Enzima |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária |
| EUA | Estados Unidos da América |
| g | Gravidade |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GM | Gabinete do Ministro |
| GRIPI | <i>Glucocorticoid receptor-interacting protein 1</i> |
| h | Horas |
| HMM | <i>Hepatocyte Maintenance Medium</i> |
| HP | Haptoglobina |
| HPRT | <i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i> |
| IκB | Inibidor de kappa B |
| IL | Interleucina |
| INCT | Instituto Nacional de ciência e Tecnologia |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| μL | Microlitros |
| μm | Micrômetro |
| μM | Micromolar |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |

| | |
|-------|---|
| MAC | Complexo de Ataque à Membrana |
| MBL | <i>Mannose Biding Lectin</i> (Lectina Ligadora de Manose) |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno) |
| MASP | <i>Mannan biding lectin serino protease</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NCoR | Correpressor nuclear |
| NFAT | Fator de transcrição específico de células T |
| NF-κB | Fator Nuclear kappa B |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetros |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| PFA | Proteína de fase aguda |
| PKB | Proteína quinase B |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-activated receptor |
| qPCR | Reação em Cadeia de Polimerase quantitativo |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RNAm | Ácido Ribonucleico mensageiro |
| RPLP0 | <i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i> |
| RT | <i>Reverse Transcriptase</i> (Transcriptase Reversa) |
| RXR | <i>Retinoid Receptor X</i> (Receptor Retinoide X) |

| | |
|--------------|--|
| SAA | <i>Serum Amyloid A</i> (Amilóde Sérica A) |
| SAS | Statistical Analysis System |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| sLeX | <i>Syalil Lewis X</i> (Sialil Lewis X) |
| STAT-1 | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina |
| Th | Linfócito T <i>helper</i> |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento Endotelial Vascular) |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 2.1. A RESPOSTA IMUNE INATA..... | 19 |
| 2.1.1. <i>Proteínas do sistema complemento</i> | 20 |
| 2.1.2. <i>Proteínas de fase aguda</i> | 21 |
| 2.2. CULTIVO DE HEPATÓCITOS PARA ESTUDO DA RESPOSTA DE FASE AGUDA EM ANIMAIS..... | 24 |
| 2.3. OS RECEPTORES PPAR..... | 26 |
| 2.4. RECEPTORES PPAR E SUA ATUAÇÃO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MAMÍFEROS VERTEBRADOS..... | 27 |
| 2.5. O RECEPTOR PPAR α E SEU ENVOLVIMENTO NA RESPOSTA IMUNE..... | 29 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL..... | 32 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 32 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DE HEPATÓCITOS BOVINOS..... | 33 |
| 4.1.1. <i>Isolamento de hepatócitos</i> | 33 |
| 4.1.2. <i>Análise da viabilidade celular</i> | 36 |
| 4.1.3. <i>Estímulos</i> | 36 |
| 4.2. EXTRAÇÃO DE RNA DOS HEPATÓCITOS..... | 37 |
| 4.2.1. <i>Isolamento do material genético</i> | 37 |
| 4.2.2. <i>Quantificação do RNA e análise de integridade</i> | 38 |
| 4.3. SÍNTESE DE cDNA..... | 38 |
| 4.4. REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4.1. Desenho de primers..... | 39 |
| 4.4.2. Padronização das reações de qPCR..... | 39 |
| 4.4.3. Reações de qPCR para estudo da expressão dos genes candidatos.. | 41 |
| 4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO COMPLEMENTO E DE FASE AGUDA NO SOBRENADANTE DE CULTURA..... | 42 |
| 5. RESULTADOS..... | 45 |
| 5.1. ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIA DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS BOVINOS PARA ESTUDO DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR <i>IN VITRO</i> | 45 |
| 5.2. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE RNA..... | 48 |
| 5.3. EFEITO MODULADOR DA ATIVAÇÃO ESPECÍFICA DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR α SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES DO COMPLEMENTO E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM HEPATÓCITOS BOVINOS..... | 51 |
| 5.3.1. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos não ativados..... | 52 |
| 5.3.2. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com citocinas pró-inflamatórias..... | 53 |
| 5.3.3. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com LPS..... | 57 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 58 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 62 |
| 8. PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 63 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |
| ANEXO..... | 74 |

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é um mecanismo de alta importância no que diz respeito ao combate e eliminação de patógenos que ameaçam a homeostase do organismo. A imunidade inata, como parte desse sistema, induz ações altamente eficientes e a curto prazo, possuindo várias proteínas e células participantes do combate a microrganismos (ABBAS *et al*, 2012).

Um importante parasita relacionado com resposta imune em bovinos é o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, carrapato responsável por grandes perdas econômicas na pecuária brasileira. A fixação do carrapato no bovino desencadeia respostas inflamatórias no hospedeiro, cujo sistema complemento desempenha papel fundamental, mediando, inclusive, a resistência ao parasita (SILVA *et al.*, 2016). O fígado é o principal órgão produtor de fatores do complemento além de ser responsável pela resposta de fase aguda e atividades metabólicas que atuam diretamente na modulação de processos inflamatórios (MOUTHIER *et al.*, 2005; MANSOURI *et al.*, 2008).

Estudos realizados pela equipe dos laboratórios de Genética Molecular e de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, avaliando a resistência ao carrapato em bovinos de leite, sugerem que o receptor PPAR α interage em várias vias de sinalização intracelular (CARVALHO *et al.*, 2014). Esse receptor é capaz de atuar em processos de metabolismo lipídico e que envolvem modulação de respostas imunes (KIDANI & BENSINGER, 2012). Desse modo, possui importância na modulação da expressão de alguns genes relacionados à imunidade inata, entre eles os que codificam proteínas do sistema complemento e de proteínas de fase aguda (PFA) em humanos e murinos (CORTON *et al.*, 1998; RAKHSHANDEHROO *et al*, 2012). Dada as diferenças fisiológicas entre monogástricos e ruminantes faz-se necessário verificar se o receptor PPAR α também atuaria na modulação da imunidade inata em bovinos.

Uma das maneiras de se estudar a interação entre PFA e fatores do complemento e expressão gênica é por meio de cultivo celular, técnica muito desenvolvida em humanos e camundongos, mas ainda bem limitada em

bovinos. O cultivo primário de hepatócitos bovinos para estudos de sinalização intracelular constitui um desafio, já que não existem linhagens imortalizadas e, pela própria fisiologia da célula, ocorre alto índice de mortalidade e aumento significativo da presença de corpúsculos lipídicos em seu citoplasma (MELO & WELLER, 2016). Mesmo com estas dificuldades, é imperativo que sejam realizados experimentos com células bovinas, no sentido de se validar os modelos desenvolvidos para interação de moléculas participantes do sistema imune, como aqueles descritos em humanos e camundongos.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de cultivo primário de hepatócitos bovinos e avaliar a participação do receptor PPAR α na expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento e de fase aguda, em hepatócitos bovinos, *in vitro*. Esses resultados serão de fundamental importância para ajudar no entendimento do complexo mecanismo envolvido na resposta imune em bovinos, o que poderia facilitar o desenvolvimento de ferramentas que visem o controle do carrapato bovino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A RESPOSTA IMUNE INATA

O sistema imune de mamíferos vertebrados possui dois tipos de resposta: inata e adquirida (ABBAS *et al.*, 2012). Esses dois padrões de resposta são ativados concomitantemente, sendo que a imunidade inata tem um papel crítico no controle inicial da invasão de patógenos, bem como na indução das células da resposta adaptativa, enquanto a imunidade adaptativa possui uma ação direta e de longa duração para o controle de patógenos e também pode aperfeiçoar os mecanismos imunes da resposta inata, envolvendo a participação de linfócitos B e T (BLUESTONE *et al.*, 2009).

A imunidade inata é um mecanismo de defesa imediato, altamente conservado entre as espécies (KIMBRELL & BEUTLER, 2001), iniciado pela invasão de microrganismos e/ou lesões sendo determinante para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva e protetora, (KIMBRELL & BEUTLER, 2001). A imunidade inata conta com a participação de alguns componentes solúveis, como peptídeos, proteínas de fase aguda, proteínas do sistema complemento, citocinas e quimiocinas (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002), além de componentes celulares como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas, primeiras células que se dirigem ao local da infecção e que são capazes de fagocitar microrganismos que penetram no organismo (ABBAS, *et al.*, 2012). Receptores que reconhecem os patógenos estão presentes e variam de acordo com o domínio proteico, servindo como indicadores de infecções (KUMAR, *et al.*, 2011).

As respostas imunes inata e adaptativa atuam conjuntamente e de maneira complementar por meio da produção de moléculas capazes de responder efetivamente em casos de infecções e/ou infestações: moléculas do sistema complemento (DUNKELBERGER & SONG, 2010) e proteínas de fase aguda (CRAY *et al.*, 2009). Essas proteínas são complexas e possuem papel altamente protetor no que diz respeito ao combate de microrganismos, endo e ectoparasitas (DUNKELBERGER & SONG, 2010; JAIN *et al.*, 2011).

2.1.1. Proteínas do sistema complemento

O sistema complemento, um dos principais agentes atuantes da imunidade inata, engloba receptores de membrana e proteínas solúveis, que são ativadas por três vias proteolíticas de iniciação diferentes: via clássica, via alternativa e via da lecitina ligadora de manose (ABBAS *et al.*, 2012). A via clássica é ativada por anticorpos ligados a antígenos presente na superfície de patógenos através do componente C1; a via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 que culmina na ativação de C5 e a via das lecitinas é iniciada pela formação de complexos de lecitina ligante de manose (*mannose-binding lectin*, MBL) e proteases 1 e 2 (MASP-1 e MASP-2) que levam à ativação de C4. Todas as vias dirigem-se para ativação de C3 e C5 culminando na ativação celular e formação do complexo de ataque de membrana (*membrane attack complex*, MAC), responsável pela destruição da integridade da membrana de células infectadas e de patógenos, provocando morte dos microrganismos (ABBAS *et al.*, 2012; Figura 1). A ativação dessa via também leva à amplificação do sinal inflamatório, por meio do estímulo de células por receptores específicos de membrana (MARKIEWSKI & LAMBRIS, 2007).

Proteínas do sistema do complemento do hospedeiro são produzidas majoritariamente pelo fígado e macrófagos residentes e atuam na destruição de patógenos, provocando a lise e opsonização de microrganismos, além de ativar células do sistema imune por meio de receptores específicos provocando quimiotaxia celular e inflamação local e/ou sistêmica (MASTELLOS & LAMBRIS, 2002). Esse sistema é de grande importância no combate aos carrapatos, principalmente quando se trata da via alternativa de ativação (WIKEL, 1979).

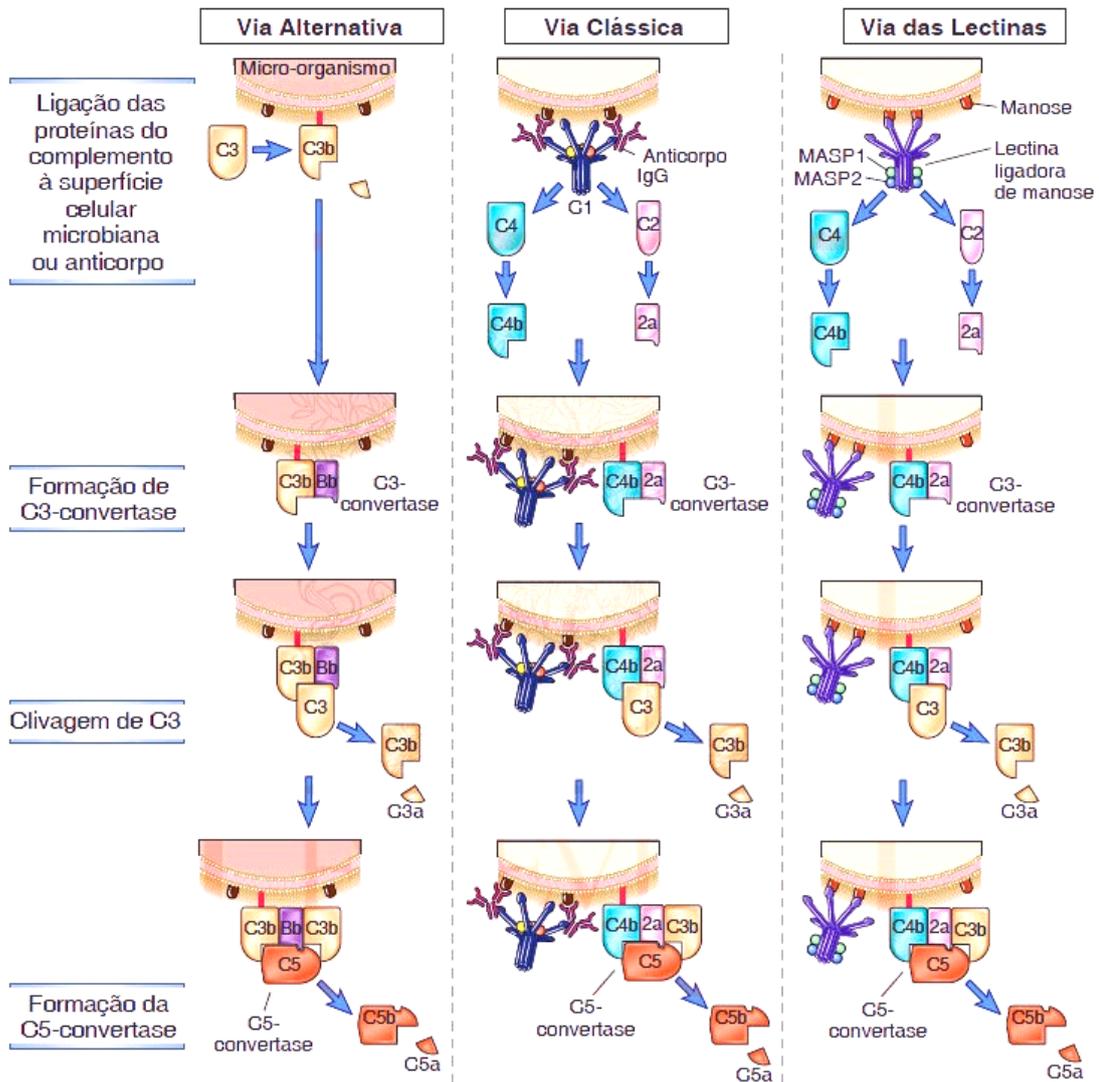


Figura 1. As três vias de ativação da cascata do sistema complemento com as respectivas proteínas envolvidas (ABBAS *et al.*, 2012).

2.1.2. Proteínas de fase aguda

O processo de destruição da matriz extracelular leva à injúria tecidual, o que gera a ativação de células residentes, como macrófagos e monócitos, por meio do sistema complemento e outros mecanismos de resposta, culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α (GRUYS *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2011). Essas citocinas caem na circulação iniciando a resposta de fase aguda, caracterizada pela ativação de hepatócitos e secreção de PFA (CRAY *et al.*, 2009; GRUYS *et al.*, 2005). Tanto

a IL-1 quanto a IL-6 e TNF α atuam como mensageiros entre o local da lesão e hepatócitos, principais células que sintetizam PFA e proteínas do complemento (JAIN *et al.*, 2011).

As PFA são liberadas sistemicamente e controlam o desenvolvimento da resposta imune atuando, por exemplo, sobre a migração de leucócitos pela α -1 glicoproteína ácida (*α -1 acid glycoprotein*, α 1-AGP) (HOICHEPIED *et al.*, 2003) e de células mononucleares, eosinófilos, basófilos e linfócitos por meio da amiloide sérica A (*serum amyloid A*, SAA) (XU *et al.*, 1995) demonstrando o importante papel da imunidade inata e resposta de fase aguda sobre o orquestramento de uma resposta rápida e efetiva contra agentes infecciosos e parasitários.

PFA são bem documentadas em infecções clínicas. Duas PFA de bovinos, amiloide sérica A (SAA) e haptoglobina (HP) se mostraram aumentadas em bovinos com distúrbios tóxicos (ECKERSALL, 1995), infecções virais (ECKERSALL, 1995, HEEGAARD *et al.*, 2000; PETERSEN *et al.*, 2004), parasitárias (ECKERSALL, 1995) e bacterianas (PETERSEN *et al.*, 2004).

Níveis plasmáticos de PFA estão correlacionados com infecções e são marcadores biológicos de inflamação (SUFFREDINI *et al.*, 1999). A concentração máxima de PFA é alcançada geralmente de 24 a 48 horas após início da resposta imune. Após término da infecção e de estímulos, os níveis normalizam dentro de 4 a 7 dias. Uma vez que as PFA atuam na diferenciação e migração celular conclui-se que estas possuem papel primordial no início da resposta adquirida (SUFFREDINI *et al.*, 1999).

A amiloide sérica A (SAA) é uma proteína da família das apolipoproteínas, produzida pelo fígado e secretada durante a fase aguda da inflamação. Essa proteína é capaz de se ligar em receptores de formil peptídeo, constituintes de uma família de receptores acoplados a proteína G, e que são expressos em basófilos, monócitos e neutrófilos (LE *et al.*, 2001; DE PAULIS *et al.*, 2004). O papel dessa proteína é extenso, dentre eles está o transporte de colesterol para o fígado para secreção na bile, recrutamento de células imunes para o local da inflamação e indução de enzimas capazes de degradar matrizes (ZACHO *et al.*, 2008). Existem vários tipos de SAA descritos: em camundongos, três isoformas foram encontradas, denominadas

SAA1, SAA2 e SAA3 (HUSBY *et al.*, 1994); no soro de humanos, foi encontrada a SAA4 (HUSBY *et al.*, 1994); em coelhos, foi encontrada a SAA3, não presente no sangue e produzida por sinoviócitos, fibroblastos e macrófagos (MITCHELL *et al.*, 1993). Já em bovinos, são descritas as isoformas 1 e 2, além de uma outra proteína capaz de reagir com soro anti-SAA (ZACHO *et al.*, 2008). A glândula mamária desses animais é uma fonte conhecida de uma variante de SAA3 (ECKERSALL *et al.*, 2001), descrita no colostro e no leite durante a mastite, que possui benefícios para a mucosa intestinal do filhote (MCDONALD *et al.*, 2001). Durante a infecção pelo vírus sincicial respiratório bovino, uma importante causa de problemas respiratórios no gado, observam-se altas concentrações de SAA, iguais ou maiores quando há infecção bacteriana (LE *et al.*, 2001). A mastite bovina causa aumento de SAA, tanto no soro quanto no leite (PYORALA, 2003).

A haptoglobina (HP) está presente no plasma e se liga à hemoglobina livre liberada de eritrócitos, inibindo atividade oxidativa. É produzida principalmente por hepatócitos, mas também pela pele, pulmões e rins. No processo de ligação com a hemoglobina, a haptoglobina sequestra o ferro presente nessa molécula, prevenindo a utilização desse ferro pelas bactérias (JAIN *et al.*, 2011). O vírus sincicial respiratório bovino pode levar ao aumento de HP, sendo que a magnitude e duração de resposta da haptoglobina se correlacionam com a severidade dos sinais clínicos (LE *et al.*, 2001). Vacas com mastite apresentam altas concentrações de HP (PYORALA, 2003).

A α 1-glicoproteína ácida (α 1-AGP) é uma PFA pertencente ao grupo das lipocalinas. Durante a resposta de fase aguda, a concentração plasmática dessa proteína aumenta várias vezes. É altamente glicosilada e carrega cinco oligossacarídeos (VAN DER LINDEN *et al.*, 1998). A AGP se liga em monócitos, granulócitos polimorfonucleares e em linfócitos via cadeias de carboidrato (SHIYAN *et al.*, 1997). Entre vários efeitos imunomodulatórios da AGP, os mais relatados são os de diminuição do estado inflamatório e de proteção de apoptose celular (VAN MOLLE *et al.*, 1997). Em murinos, a AGP inibiu a estimulação de linfócitos e inibiu a geração de ânion superóxido por neutrófilos (BENNET & SCHMID, 1980), além de potencializar a produção de

citocinas secretadas a partir de estímulo com LPS (SU *et al.*, 1999). Também é descrito que AGP é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por agentes ativadores de plaquetas, como colágeno e trombina (COSTELLO *et al.*, 1979). Em bovinos, a AGP pode aumentar de duas a quatro vezes durante estados patológicos (ECKERSALL *et al.*, 2001). Existem relatos de que vacas com linfoma maligno, leucemia bovina, pneumonia ou hepatite apresentam níveis plasmáticos altos de AGP (ITOH *et al.*, 1989; IWATA *et al.*, 1988).

A α 1-AGP também se liga com moléculas de sialil LewisX (sLeX), impedindo a formação do complexo sLeX/E-selectina, importante para a adesão de leucócitos nos locais de inflamação (JORGENSES *et al.*, 1998). Em humanos e em camundongos demonstrou possuir papel em infecções bacterianas, principalmente em doenças que acometem o pulmão (ATHAMNA *et al.*, 1996; HOICHEPIED *et al.*, 2000), tendo sua expressão aumentada nesses casos.

2.2. CULTIVO DE HEPATÓCITOS PARA ESTUDO DA RESPOSTA DE FASE AGUDA EM ANIMAIS

Para se estudar o desenvolvimento de resposta de fase aguda em hepatócitos são utilizados desafios diretos em animais experimentais ou plataformas de estudos *in vitro* por meio do uso de linhagens celulares imortalizadas ou isolamento primário de células. A escolha geralmente é baseada nos custos e na disponibilidade de uso de animais bem como nas hipóteses a serem avaliadas. Assim, o uso de algumas linhagens de hepatócitos humanos é descrito largamente na literatura, como HepG2 e HepaRG (DONATO *et al.*, 2008; GRIPON *et al.*, 2002) e de hepatócitos murinos, como AML12 (WU *et al.*, 1994). No entanto, não existem linhagens comerciais de hepatócitos bovinos, o que dificulta bastante o estudo nesse modelo experimental, visto que em cultivo primário os hepatócitos apresentam grande instabilidade quando se trata da morfologia e da viabilidade celular (DONATO *et al.*, 2008).

Para o isolamento primário de hepatócitos são utilizados protocolos enzimáticos (SPOTORNO *et al.*, 2006) e não enzimáticos (KRAVCHENKO *et al.*, 2002). O protocolo enzimático consiste na utilização da colagenase, especialmente do tipo IV (JIANG *et al.*, 2013), utilizadas para digestão da matriz extracelular e liberação de hepatócitos, que consistem em 60-80% da celularidade do fígado (MALARKEY *et al.*, 2005). A metodologia enzimática pode ser desempenhada tanto através da perfusão do órgão, bastante utilizada em modelo murino (LI *et al.*, 2010; SEVERGNINI *et al.*, 2012), quanto através do tratamento de fragmentos de fígado com a colagenase (SPOTORNO *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2013), consistindo em uma alternativa para órgãos de maior tamanho, como os da espécie bovina (EHRNHARDT & SCHMICKE, 2016). Apesar da alta viabilidade obtida por meio desse protocolo, sua utilização é inviável quando se avaliam as vias de sinalização intracelular, pois o uso da colagenase está associado com a ativação do sistema de estresse oxidativo de hepatócitos após 4 a 6 horas de cultivo (TIRMENSTEIN *et al.*, 2000). Uma vez que a atividade enzimática também pode interferir com a viabilidade celular, alguns protocolos utilizam gradientes de centrifugação para separar células viáveis, mortas e contaminantes como hemácias (adaptado de GONÇALVES *et al.*, 2007).

Sabe-se que a viabilidade dos hepatócitos em cultura primária é de cerca de 70% em humanos e em camundongos (TOSTÕES *et al.*, 2012), e cerca de 60% em bovinos (EHRHARD & SCHMICKE, 2016). No entanto, o cultivo de hepatócitos bovinos é bastante prejudicado pela fisiologia do organismo ruminante, pois seu metabolismo se baseia na utilização de ácidos graxos (NOBLE, 1978) cujo principal órgão metabolizador é o fígado. Isso sugere que as células de bovinos possuem maior quantidade de corpúsculos lipídicos, estruturas ricas em lipídeos presentes no citoplasma de células (MELO & WELLER, 2016). Resumindo, as dificuldades encontradas para o cultivo primário de hepatócitos bovinos são muitas, principalmente nos casos de estudo de sinalização intracelular como a mudança da morfologia, atividades bioquímicas e baixa viabilidade (BROPHY *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 1994; ASANO *et al.*, 1989).

2.3. OS RECEPTORES PPAR

Os receptores *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) pertencem à superfamília de receptores nucleares hormonais e atuam regulando vários genes de importância para o metabolismo celular. A família de PPARs abrange três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ (GRYGIEL-GÓRNIK, 2014). Esses receptores são altamente expressos em órgãos e tecidos com elevada atividade metabólica, como fígado, coração, músculo esquelético e mucosa intestinal (FRUCHART *et al.*, 2001).

Os receptores PPAR possuem um domínio na porção N-terminal ligante de DNA e um domínio de ligação C-terminal. Interação com agonistas, como ácidos lipofílicos naturais e sintéticos, induz translocação para o núcleo, onde ocorre heterodimerização com outro receptor nuclear, o receptor retinoide X (RXR) (BERGER & MOLLER, 2002; Figura 2). Regiões específicas do DNA se ligam aos receptores PPAR e ocorre a transcrição de diversos genes envolvidos em processos fisiológicos (WILLSON *et al.*, 2000).

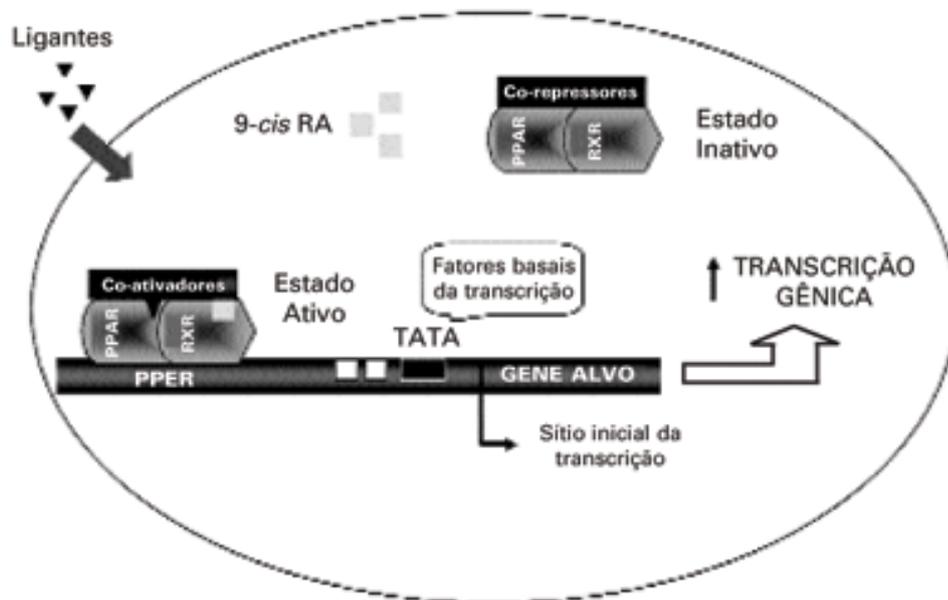


Figura 2. A ativação do PPAR- α e atuação no núcleo para regulação de alguns genes (FRUCHART *et al.*, 2009).

O PPAR β/δ é expresso principalmente em células do intestino, atuando como regulador da homeostasia nesse órgão e modulador de inflamação

(PETERS *et al.*, 2008). Possui papel importante na absorção de lipídeos, controlando os níveis de ácidos graxos no organismo (POIRIER *et al.*, 2001), sendo predominante no músculo esquelético (HOLST *et al.*, 2003). A ativação desse receptor também está envolvida com redução da suscetibilidade à apoptose de queratinócitos (TAN *et al.*, 2001), bem como com processos de cicatrização (MICHALIK *et al.*, 2001)

Expresso em adipócitos, macrófagos, placenta e em outros tecidos, o PPAR γ está relacionado à proliferação celular e diferenciação. Também é importante na adaptação do tecido adiposo em diversas situações do ambiente (ROSEN *et al.*, 2000). O PPAR γ reduz o efluxo de ácidos graxos livres de adipócitos pela regulação de alguns genes, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicerol quinase (TORJDMAN *et al.*, 2003). Tiazolidinedionas ou glitazonas é um grupo de medicamentos capaz de ativar o PPAR γ , sendo muito usado no tratamento de *diabetes mellitus* (TANIGUCHI *et al.*, 2001; FRUCHART *et al.*, 2001).

2.4. RECEPTORES PPAR E SUA ATUAÇÃO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM MAMÍFEROS VERTEBRADOS

Os receptores PPAR possuem uma série de ligantes que podem ser sintéticos ou naturais. Ácidos graxos essenciais são capazes de se ligar a esse receptor, levando à transcrição de genes envolvidos com homeostase de glicose e lipídios (KREY *et al.*, 1997). Além dos ácidos graxos essenciais, eicosanoides também são capazes de ativar esse receptor nuclear, sendo um exemplo o leucotrieno B₄ (KREY *et al.*, 1997). Cada isotipo possui ligantes sintéticos específicos. Como exemplo, ligantes capazes de ativar o PPAR α são principalmente os fibratos (clofibrato, fenofibrato, benzafibrato e genfibrozil), muito utilizados na medicina clínica para tratamento de dislipidemia (TANIGUCHI *et al.*, 2001; FRUCHART *et al.*, 2001).

Mudanças do estado de fosforilação também podem modificar a atividade desses receptores. A via de ativação da proteína quinase A é capaz de aumentar a atividade de todos os três isotipos, ação que ocorre provavelmente

pela fosforilação da função de transativação dependente de ligantes, uma região que se encontra na porção C-terminal do PPAR α (LAZENEEC *et al.*, 1962). A cascata de sinalização da insulina ativa a fosforilação do domínio A/B, o que pode estimular a atividade principalmente do PPAR α e PPAR γ (JUGE-AUBRY *et al.*, 1999). Por fim, a via p38 MAPK também é capaz de ativar o PPAR α (BARGER *et al.*, 2001).

As ações desses receptores são associadas majoritariamente à sua capacidade de inibir a atividade de alguns fatores transcricionais. Por exemplo, a ligação do PPAR α com o coativador GRIP1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein-1*) inibe a atividade do C/EBP β (*CCAT box/enhancer-binding protein- β*). Esse mecanismo é capaz de suprimir a expressão de fibrinogênio em hepatócitos, um fator de coagulação induzido por citocinas pró-inflamatórias (GERVOIS *et al.*, 2001). O PPAR γ se mostrou capaz de inibir a expressão de óxido nítrico sintase por meio da interferência com os fatores de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B), transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT-1) e proteína ativadora 1 (AP-1), pelo mecanismo de competição com o coativador CBP (*CREB-binding protein*) (LI *et al.*, 2010; RICOTE *et al.*, 1998). A ligação com alguns fatores de transcrição também é um mecanismo que leva à modulação da resposta imune, impedindo a ação desses fatores. Ao se ligar com subunidades do NF- κ B, o PPAR γ inibe a produção de IL-12, e ao se ligar ao fator de transcrição específico de células T, o NFAT, é capaz de suprimir expressão de IL-2 (GERVOIS *et al.*, 2004). O PPAR α também é capaz de se ligar a alguns fatores de transcrição, como AP-1 e p65-NF- κ B, o que resulta na diminuição da secreção de IL-6 (DELERIVE *et al.*, 1999) e inibição da expressão de proteína C reativa por meio do impedimento da formação do complexo p50-NF- κ B-C-EBP β (KLEEMAN *et al.*, 2003).

Mecanismos de transrepressão envolvem alguns membros da cascata proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), onde fosforilação de p38 MAPK em linfócitos T demonstrou a diminuição do fator de transcrição dessas células (T-bet) (JONES *et al.*, 2003). Além desse modelo, o PPAR γ demonstrou supressão da atividade de p38 MAPK em um modelo de inflamação de cólon (DESREUMAUX *et al.*, 2001). Esses receptores nucleares também regulam positivamente a expressão de I κ B α , um inibidor de NF- κ B (MARX *et al.*, 1999), e

negativamente a expressão da subunidade p50 do NF- κ B e do C/EBP β , como visto em um estudo com fígado de camundongos alimentados com fenofibrato (KLEEMAN *et al.*, 2003).

O PPAR γ pode atuar pelo mecanismo de transrepressão por meio da SUMOilação do domínio de ligação desse receptor. Isso faz com que o correpressor nuclear (NCoR) não seja retirado da região do DNA e mantém os genes alvo em um estado de repressão (PASCUAL *et al.*, 2006; Figura 3).

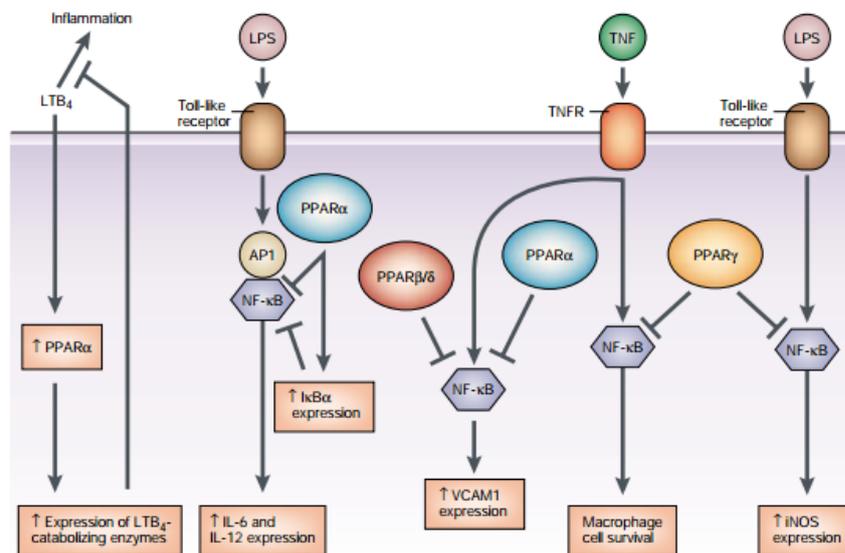


Figura 3. Mecanismos de modulação da regulação de respostas inflamatórias mediados pelos receptores PPAR (DAYNES & JONES, 2002).

2.5. O RECEPTOR PPAR α E SEU ENVOLVIMENTO NA RESPOSTA IMUNE

Nas últimas décadas os receptores nucleares ativadores de PPAR α têm surgido como potentes imunomoduladores correlacionando o metabolismo de lipídeos e desenvolvimento de diferentes padrões de resposta imune (KIDANI & BENSINGER, 2012).

Uma função importante do PPAR α relacionada com a imunidade inata é a capacidade de regeneração de tecidos (TAN *et al.*, 2001, KOMUVES *et al.*, 2000), além de atuar na síntese de peptídeos com função microbicida por meio da sinalização do NF- κ B (TSUTSUMI-ISHII & NAGAOKA, 2002). Esse receptor

também é capaz de modular a diferenciação, proliferação e apoptose de queratinócitos (KOMUVES *et al.*, 2000).

Foi demonstrado também que o PPAR α interage com p-65 e c-Jun, inibindo a inflamação vascular (DELERIVE *et al.*, 1999). Ligantes desse receptor podem impossibilitar a migração celular endotelial por meio da inibição da fosforilação de proteína quinase B (PKB), promovida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GOETZE *et al.*, 2002).

Ao se ligar ao PPAR α , agonistas específicos diminuem a sua translocação para o núcleo, o que resulta na diminuição de expressão de múltiplos genes envolvidos na inflamação (KLEEMAN *et al.*, 2004), ressaltando sua importância na resposta de fase aguda. Estudos *in vivo* em camundongos demonstraram que a ativação do PPAR α por fenofibrato regula negativamente a produção de PFA, como amiloide sérica A, proteína C reativa, fibrinogênio e α 1-glicoproteína ácida (CORTON *et al.*, 1998; GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

Outro estudo também realizado com camundongos demonstrou que o PPAR α é importante na diminuição do tempo de resposta inflamatória ocasionada por leucotrieno B₄, provando que o PPAR α é capaz de aumentar a expressão de genes responsáveis pelo catabolismo desse ácido graxo (DEVCHAND *et al.*, 1996).

O PPAR α também se mostrou importante em uma série de doenças relacionadas com a inflamação, como aterosclerose, fibrose hepática, doenças inflamatórias do intestino e cicatrização (CUNARD *et al.*, 2002, 2002, MICHALIK *et al.*, 2001).

Pacientes tratados com fibratos, ligantes específicos do PPAR α , demonstraram diminuição nos níveis plasmáticos de interleucina 6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ), fator de necrose tumoral α (TNF α), fibrinogênio e proteína C reativa, demonstrando a relação do PPAR α com a modulação de processos inflamatórios (STAELS *et al.*, 1998).

Recentemente foi relatado a atividade de PPAR α sobre o aumento da produção de C3 (MOGILENKO *et al.*, 2013) e MBL (RAKHSHANDEHROO *et al.*, 2012) em linhagens e em cultura primária de hepatócitos humanos, respectivamente. Além disso, evidências apontam para uma possível intervenção

da ativação de PPAR α sobre a resposta de fase aguda em modelo murino e em humanos (ZAMBON *et al.*, 2006; BELFORT *et al.*, 2010).

Sabe-se que o sistema imune inato é altamente conservado em mamíferos vertebrados (KIMBRELL & BEUTLER, 2001). Desse modo, frente a estímulos inflamatórios, o bovino responde de maneira semelhante a outras espécies (KIMBRELL & BEUTLER, 2001). No entanto, algumas características podem diferir. Isso ocorre pelo fato de que bovinos, por serem ruminantes, apresentam fonte de energia distinta de outras espécies que são monogástricas (NOBLE, 1978). Redes gênicas usando genes diferencialmente expressos mostraram alta atividade do metabolismo lipídico em bovinos, o que parece estar relacionado com processos que levam à inflamação, fagocitose e quimiotaxia (CARVALHO *et al.*, 2014).

Sabendo-se que existem tais diferenças, é possível supor que vias celulares divergem entre organismos com fisiologias gastrintestinais desiguais, principalmente no que se refere ao metabolismo lipídico e resposta imune, visto que ambas estão correlacionadas, especialmente quando se analisam receptores nucleares (BENSINGER & TONTONNOZ, 2008; HONG & TONTONNOZ, 2008). Desse modo, nesse trabalho buscou-se verificar os efeitos da ativação do receptor nuclear PPAR α pelo fenofibrato, seu ligante sintético, em hepatócitos bovinos *in vitro*, e analisar se tal estímulo interfere nas vias celulares modulando a produção de PFA e de fatores do complemento, da mesma maneira que acontece em murinos e em humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito imunomodulador da ativação específica do receptor nuclear PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda (PFA), em cultivo primário de hepatócitos bovinos *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia de cultivo primário de hepatócitos bovinos para estudo de sinalização intracelular;
- Avaliar o efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão gênica e produção de proteínas do complemento e de fase aguda em hepatócitos bovinos não ativados;
- Avaliar o efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão gênica e produção de proteínas do complemento e de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com citocinas pró-inflamatórias;
- Avaliar o efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão gênica e produção de proteínas do complemento e de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com LPS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Resumidamente, o delineamento experimental consistiu na padronização do isolamento de hepatócitos a partir de amostras de fígado bovino coletadas em abatedouro. Depois de estabelecidas as melhores condições de isolamento e cultivo dessas células, foram utilizadas amostras de fígado de cinco diferentes animais provenientes de abatedouro local (Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Embrapa Gado de Leite, sob o protocolo 31/2015). Os hepatócitos isolados foram submetidos a diferentes estímulos para avaliação do efeito da ativação do PPAR α sobre a produção de fatores do complemento e PFA (Figura 4).

4.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DE HEPATÓCITOS BOVINOS

4.1.1. *Isolamento de hepatócitos*

Para realização do isolamento de hepatócitos foram coletados cinco fígados bovinos no abatedouro Fripai (Juiz de Fora, Minas Gerais). Todos os cuidados com a paramentação foram adequados à Portaria GM nº 3214, de 08 de junho de 1978 (norma regulamentadora nº 6, anexo I) durante todas as coletas. O lobo caudal do fígado foi excisado com auxílio de um bisturi estéril e armazenado em gelo durante o deslocamento para a Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais), onde foi imediatamente processado. O tempo de transporte foi de aproximadamente 30 minutos. O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Embrapa Gado de Leite, sob o protocolo 31/2015.

Os protocolos de isolamento de hepatócitos testados foram adaptados a partir de procedimentos descritos com fígados humano e murino, já estabelecidos em literatura (KEGEL *et al.*, 2016; SEVERGNINI *et al.*, 2012). No estudo em questão foram avaliados dois protocolos principais, um enzimático e outro não enzimático, ambos sem perfusão devido ao tamanho do fígado bovino, que dificulta tal metodologia.

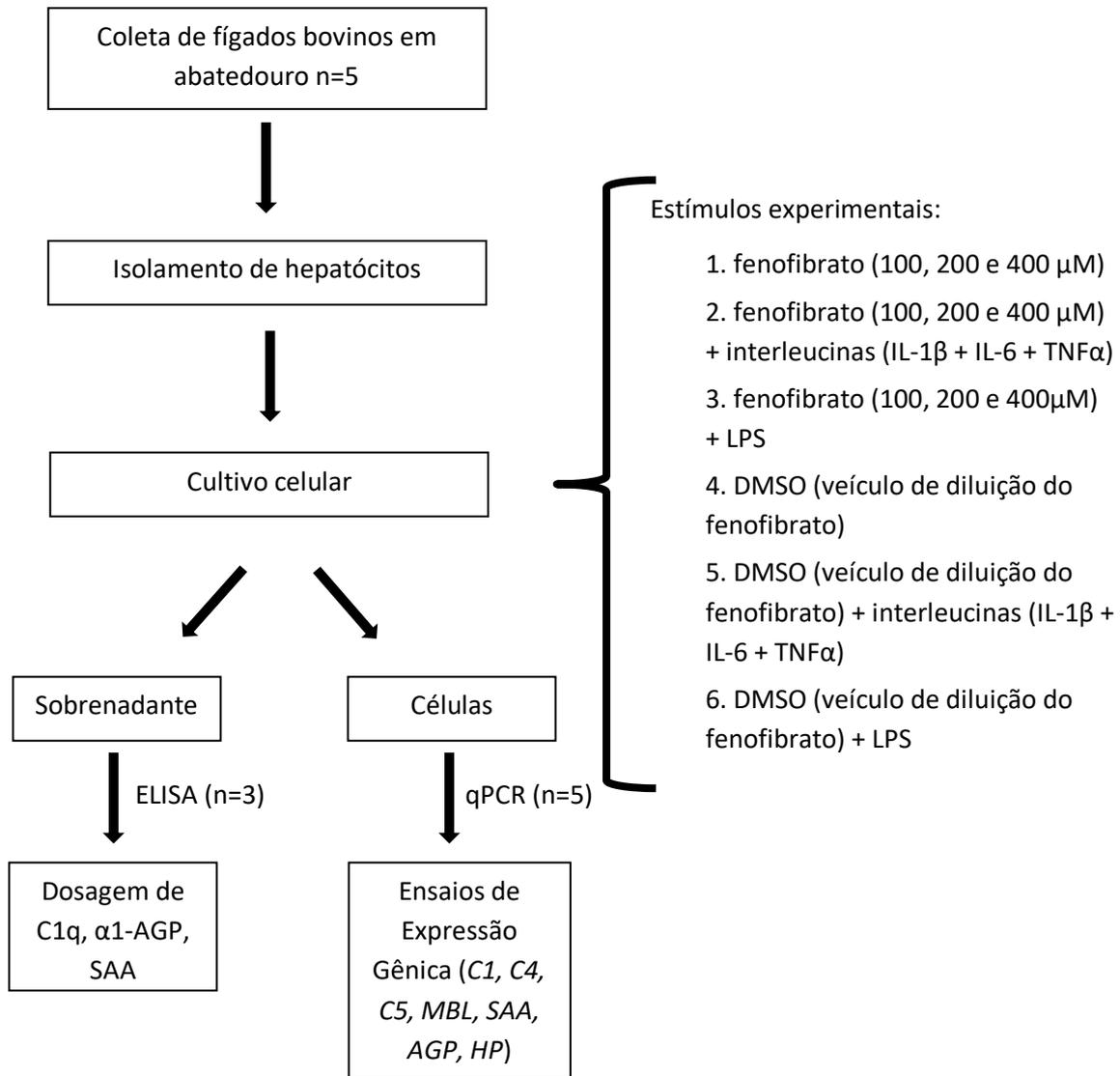


Figura 4. Esquema resumido do delineamento experimental utilizado para determinação do efeito imunomodulador de PPAR α sobre fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos *in vitro*.

O protocolo enzimático, foi adaptado de SPOTORNO *et al.*, (2006), e consistiu basicamente de utilização da enzima colagenase II (Worthington Industries, Ohio, EUA), que degrada o colágeno presente no tecido, liberando os hepatócitos, e outras células, para cultivo. O protocolo não enzimático, adaptado de KRAVCHENKO *et al.*, (2002), consistiu na moagem manual de aproximadamente 5 gramas do fragmento de fígado excisado do centro do lobo caudal. Foram feitas lavagens com 30mL de PBS 1X com penicilina e

estreptomicina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para proceder a filtração, que foi feita utilizando dois *cell strainers*, um de 70 µm e outro de 40µm (Corning, Nova York, EUA), ou apenas o de 70µm (Corning, Nova York, EUA), de acordo com o protocolo adaptado descrito por CHEN *et al.*, (2007).

Foi testada a utilização de um gradiente de separação celular de Percoll (1,07 g/mL; *GE Healthcare*, Little Chalfont, Reino Unido), adaptado de GONÇALVES *et al.*, (2007). Esse gradiente foi utilizado de modo a separar mais eficientemente as células mortas, das vivas e outras células contaminantes, como hemácias e macrófagos, que podem constituir até 20% da celularidade do fígado (MALARKEY *et al.*, 2005).

Após o isolamento e uso de gradiente os hepatócitos foram lavados com PBS 1X e centrifugados a 50g (5 minutos / 20°C), seguida de nova lavagem com PBS 1X e centrifugação a 150g (5 minutos / 20°C), conforme recomendado do protocolo descrito por KREAMER *et al.*, (1986).

Os hepatócitos isolados foram cultivados em dois meios diferentes para teste:

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; ThermoFisher, Massachusetts, EUA): meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, com antibiótico e antimicótico (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), L-glutamina 200µM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e aminoácidos não essenciais (MEM; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), de acordo com protocolo descrito por SHULMAN & NAHMIAS, (2013);

- *Hepatocyte Maintenance Medium* (HMM; Lonza, Basileia, Suíça): meio suplementado com SFB 2%, insulina, gentamicina, anfotericina e dexametasona, conforme especificação do kit e descrição da literatura (SELLARO *et al.*, 2010).

As células foram plaqueadas na quantidade de $2,5 \times 10^6$ células por poço em placas de 24 poços (*SPL Life Sciences*, Gyeonggi, Coreia do Sul) com 500 µL de meio e foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por diferentes tempos de cultivo (6, 24, 48 e 72 horas).

4.1.2. Análise da viabilidade celular

Para estabelecimento de melhor protocolo de cultivo entre as condições testadas foi avaliada a viabilidade celular com utilização de Azul de Tripán 0,2% em solução salina 0,85% (Casa da Química, Brasília, Brasil). As células viáveis e mortas foram contadas em Câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio invertido. O número absoluto de células foi obtido pela média da contagem de células nos quatro quadrantes da Câmara de Neubauer multiplicado pelo fator de correção da câmara (10^4) e respectiva diluição das células em Azul de Tripán para contagem. A viabilidade celular, em porcentagem, foi definida de acordo com a equação abaixo:

$$\frac{\text{Células vivas}}{\text{Total de células vivas + mortas}} \times 100$$

A viabilidade celular foi comparada entre os diferentes grupos usando *1-way-ANOVA* e pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade, no software *Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, Carolina do Norte, EUA).

4.1.3. Estímulos

Hepatócitos bovinos isolados de fígado de cinco animais foram estimulados, em duplicata, com:

A - Estímulos pró-inflamatórios mimetizantes de inflamação sistêmica (associação de três citocinas pró-inflamatórias recombinantes): IL-1 β (PeproTech, Nova Jersey, EUA) na concentração de 10 ng/mL, IL-6 (ThermoFisher, Massachussets, EUA), na concentração de 10 ng/mL e TNF α (PeproTech, Nova Jersey, EUA) na concentração de 50 ng/mL;

B - Estímulo pró-inflamatório mimetizante de infecção bacteriana: LPS (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na concentração de 100 ng/mL;

C - Sem estímulo para mimetizar células em estado não ativado: somente meio HMM 2% com suplementos (Lonza, Basileia, Suíça);

D - Fenofibrato (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) de acordo com recomendação do fabricante, nas concentrações de 100, 200 e 400 μM ;

E - Fenofibrato diluído em DMSO nas concentrações de 100, 200 e 400 μM combinado com os estímulos pró-inflamatórios A (IL-1 β + IL-6 + TNF α) e B (LPS);

F- DMSO puro como controle do veículo de diluição do fenofibrato.

Após 48h de cultura, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado, individualmente aliquoteado e armazenado a -80°C até o uso para dosagem de fatores do complemento e PFA pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As células foram imediatamente ressuspensas em 600 μL de RNA *Protect Cell Reagent* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e congeladas a -20°C , como sugerido pelo fabricante, para posterior extração de RNA total e ensaios de qPCR.

4.2. EXTRAÇÃO DE RNA DOS HEPATÓCITOS

4.2.1. Isolamento do material genético

Para a extração de RNA dos hepatócitos cultivados foi utilizado o *SV RNA Isolation System kit* (Promega, Wisconsin, EUA). As células foram lisadas com o tampão de lise disponível no kit de extração. Também foram utilizadas agulha 22G e seringa, para clivagem do DNA genômico e para aumentar a eficiência da lise celular, como descrito no protocolo do kit. Três diferentes quantidades iniciais de hepatócitos foram avaliadas: 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ e 4×10^6 , conforme recomendações do fabricante do kit. Após lise das células, foram adicionados 200 μL de etanol 95% (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) na solução de lise. O lisado foi transferido para coluna de eluição e centrifugado a 12.000g por 1 minuto. Foram adicionados 600 μL da solução de lavagem do kit e centrifugou-se novamente a 12.000g por 1 minuto. A enzima DNase I foi adicionada à solução no volume de 50 μL para clivagem de DNA

presente. Após 15 minutos uma solução para evitar a continuidade da ação da enzima foi adicionada e centrifugou-se a 12.000g por 1 minuto. Mais duas centrifugações foram feitas a 12.000g por 1 minuto, com 600 μ L e 250 μ L da solução de lavagem em cada uma delas. Foram adicionados 100 μ L de água RNase free e a centrifugação foi feita a 14.000g por 1 minuto para eluição do RNA.

4.2.2. Quantificação do RNA e análise de integridade

A quantidade do RNA extraído das amostras de hepatócitos foi analisada no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoFisher, Massachusetts, EUA), utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após esta etapa, o RNA foi alíquotado e armazenado em temperatura de -80°C até o momento da análise de integridade e síntese de DNA complementar (cDNA).

A integridade do RNA foi analisada por eletroforese capilar, utilizando o equipamento Bioanalyzer 2100 com o RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), com auxílio do 2100 *Expert Software* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A integridade foi avaliada por um valor determinado pelo próprio equipamento a partir do perfil obtido no eletroferograma, denominado RNA *Integrity Number* (RIN) que varia de 1 a 10, onde 1 indica RNA muito degradado e 10 indica RNA íntegro (SCHROEDER *et al.*, 2006). Nesse procedimento, foram utilizadas amostras de RNA de três animais para cada tratamento, escolhidos de forma aleatória.

4.3. SÍNTESE DE cDNA

As amostras utilizadas para a síntese de cDNA foram descongeladas em gelo e submetidas à reação para síntese de cDNA contendo componentes disponíveis no kit *SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction* (Invitrogen, Califórnia, EUA): 1 μ L de oligodT, 1 μ L de dNTP (10mM), 4

a 11 μL de RNA, dependendo da quantificação da amostra, e água livre de RNase e DNase com volume suficiente para 13 μL de reação.

Essa mistura foi centrifugada rapidamente em microcentrífuga e incubada em termociclador (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) por 5 minutos a 65°C. Após esse tempo, a mistura foi colocada em gelo por pelo menos 1 minuto, onde foram adicionados 4 μL de tampão, 1 μL de ditioneitol (DTT) (100mM), 1 μL de inibidor de RNase e 1 μL da enzima transcriptase reversa (200 U/ μL). Esse volume final de 20 μL foi centrifugado rapidamente em microcentrífuga e incubado a 55°C por 10 minutos, seguido de 80°C por 10 minutos. Após esse tempo a amostra foi colocada em gelo e acondicionada a -20°C até o uso para reação de qPCR.

4.4. REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

4.4.1. Desenho de primers

Os *primers* utilizados foram selecionados utilizando o *software Primer Express* (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) e obtidos de acordo com sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O critério de escolha levou em consideração o número de estruturas secundárias *hairpins*, ligações entre os *primers forward* e *reverse* e ligações na própria estrutura do *primer*. Desse modo, foram obtidos *primers* para genes relacionados com a resposta de fase aguda e produção de fatores do complemento. As sequências dos *primers* utilizadas, bem como as concentrações de *primer*, a temperatura de ligação e a eficiência de reação, estão demonstradas na Tabela 1.

4.4.2. Padronização das reações de qPCR

A análise da expressão gênica ocorreu por meio da avaliação das variações do *Cycle threshold* (Ct), valor obtido no gráfico de amplificação que indica o ciclo no qual o limiar da curva de amplificação é atingido (PFAFFL,

2004). Essa análise foi feita para cada um dos genes de interesse de acordo com os *primers* desenhados.

Tabela 1. Sequências utilizadas para a reação de qPCR, concentrações de *primer* utilizadas, temperatura de ligação utilizada em cada reação e valor da eficiência de cada um dos genes. F: sequência *forward* do *primer*; R Sequência *reverse* do *primer*; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; RPLP0: *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0*.

| Gene | Sequência do <i>primer</i> (5'-3') | Concentração <i>primer</i> (nM) | Temperatura de ligação (°C) | Eficiência da reação |
|--------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Proteína do complemento 1 | F: GGCCCGAGCGCATTGAT R: CCCTGACTCGTCCGTGAAGA | 75 | 60 | 1,104 |
| Proteína do complemento 4 | F:GGCTCCAGCCATGTCGATT R: CCCATAGCAGCAGGTGTAGCA | 50 | 60 | 0,911 |
| Proteína do complemento 5 | F: CAGACTCCAGGTGCCATCGT R: GCTGACCTTTAGGCGTTTTCA | 100 | 60 | 0,95 |
| Lecitina ligadora de manose | F: GCCTCTGATACCGCCTTCCT R: GCCTAGCCTTCCTCCAGTTACA | 50 | 63 | 1,04 |
| Amiloide sérica A | F: ACCTTTCCACGGGCATCAT R: CCCTTGACCAGCTTCCTTGA | 100 | 60 | 0,89 |
| α 1-glicoproteína ácida | F: GCTCTCTGGCAAGTGGTTTTATATT R: GCCGCCTGGATTGCTCTA | 100 | 63 | 1,13 |
| Haptoglobina | F: GTGGACCAGGTGCAGAGGAT R: CGTGGCTCCCAGATGAG | 50 | 63 | 0,94 |
| GAPDH | F: GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT | 50 | 60 | 0,969 |
| RPLP 0 | F:CAACCCTGAAGTGCTTGACAT R:AGGCAGATGGATCAGCCA | 100 | 60 | 0,902 |

As reações foram realizadas em duplicata para cada gene. O mesmo *pool* equimolar já preparado foi utilizado para a padronização das reações de cada um dos genes. Para obtenção da eficiência da reação, o uso de várias diluições de cDNA permitiu a construção de uma curva padrão. Assim, o cálculo da eficiência da amplificação (E) foi realizado de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$$

A eficiência de reação para cada gene (Tabela 1) foi calculada a partir do *software* REST (PFAFFL *et al.*, 2004). A análise de estabilidade dos genes endógenos foi calculada por meio do *software* *geNorm* a partir de um

valor (M), que é a variação média de determinado gene em relação aos outros testados. Quanto menor o valor de M, mais estável é a expressão do gene (VANDESOMPELE *et al.*, 2012).

4.4.3. Reações de qPCR para estudo da expressão dos genes candidatos

As reações de qPCR foram realizadas no aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (ThermoFisher, Massachusetts, EUA). Antes de realização do teste, as amostras de cDNA foram diluídas para a concentração de 1,75 ng/ μ L. A mistura de reação continha os *primers forward* e *reverse* (LabScience, Minas Gerais, Brasil), de acordo com o descrito na tabela 1 no item 4.4.1., *PowerUp SYBR Green Master Mix* (ThermoFisher, Massachusetts, EUA), água livre de RNase e as amostras de cDNA. A temperatura de ligação dos *primers* também variou (60°C ou 63°C) e foi definida em testes de padronização. O volume final da reação foi de 12,5 μ L.

Para verificar se houve diferença de expressão entre os estímulos, os valores de Ct, para cada amostra em cada tratamento, foram analisados no *software SAS (Statistical Analysis System Institute, Inc., Carolina do Norte, EUA)*, para avaliar se havia diferença de expressão gênica entre os diversos tratamentos, a partir de reação de qPCR (STEIBEL *et al.*, 2009) com utilização do teste t de Student (95% de confiança). O cálculo foi realizado a partir da expressão:

$$y_{ij} = GP_{ij} + I_{ij} + D_{ij} + e_{ij}$$

Onde y é o nível de expressão mensurado do gene i no animal j , GP é o efeito do tratamento na expressão de cada gene, I é o efeito residual de cada gene, D é o efeito dos animais utilizados no experimento, e e o erro inerente do experimento.

Para construção dos gráficos, foram obtidos os valores de Δ Ct, que foram calculados a partir do Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno, que no caso, foi a média geométrica dos genes GAPDH e RPLP0. Com esse valor, foram calculados os valores de $\Delta\Delta$ Ct, que resultaram da

subtração do ΔCt de cada tratamento pelo ΔCt das células não estimuladas em 48 horas de cultivo (amostra de referência). Obteve-se então o valor R, calculado da seguinte maneira: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Esse valor é utilizado para calcular o logR de acordo com o descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001), que, no gráfico, permite a visualização de expressão de cada gene com relação aos genes de referência (*fold change*), onde valores positivos indicam maior expressão e valores negativos indicam menor expressão de em relação aos genes GAPDH e RPLP0. Análises estatísticas foram realizadas por 1-way-ANOVA e pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade, no *Prism (GraphPad Software Inc., Carolina do Norte, EUA)*.

4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNAS DO COMPLEMENTO E DE FASE AGUDA NO SOBRENADANTE DE CULTURA

As dosagens de proteína do complemento 1 subunidade q, amiloide sérica A e $\alpha 1$ -glicoproteína ácida foram realizadas no sobrenadante da cultura celular pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Esse sobrenadante foi aliquotado e acondicionado a -80°C até o uso.

Amostras de três animais, dos cinco totais, foram selecionadas aleatoriamente e os sobrenadantes de cultivo foram aplicados em duplicata nas placas de ELISA provenientes em cada kit utilizado. A dosagem de proteínas do complemento e de PFA foi realizada com o sobrenadante das culturas de células com os seguintes tratamentos: 1) controle negativo (células não estimuladas), 2) DMSO (veículo de diluição do fenofibrato), 3) fenofibrato, 4) associação entre interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , 5) DMSO (veículo de diluição do fenofibrato) + interleucinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e 6) fenofibrato + interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , todas em 48 horas de cultivo. O fenofibrato foi avaliado nas concentrações de 200 e 400 μM .

A preparação de reagentes e metodologia foi realizada de acordo com o proposto pelo fabricante para cada kit. Para cada molécula analisada, os procedimentos realizados foram, resumidamente:

- α 1-AGP (*Bovine α 1-acid glycoprotein ELISA kit* - Cusabio, Hubei, China): foram adicionados 50 μ L do padrão (com intervalo de detecção entre 4000 ng/mL e 62,5ng/mL) e da amostra (não diluída), 50 μ L do conjugado e houve incubação por 60 minutos a 37°C. Após isso houve lavagem manual da placa e adição de 90 μ L do Substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados 50 μ L de *Stop Solution*.
- C1q (*Bovine Complement Component 1, Q Subcomponent B ELISA Kit* - MyBioSource, Califórnia, EUA): foram adicionados 50 μ L do padrão (com intervalo de detecção entre 100 ng/mL e 31,2 ng/mL) e 50 μ L da amostra (não diluída). Após isso, foram adicionados 100 μ L do conjugado e houve incubação por 60 minutos a 37°C. A placa foi tratada com tampão de lavagem e foram adicionados 50 μ L do cromógeno A, seguido por 50 μ L do cromógeno B. Incubou-se por 15 minutos a 37°C e foram adicionados 50 μ L de *Stop Solution*.
- SAA (*Multispecies SAA Elisa kit* - Tridelta, Texas, EUA): foram adicionados 50 μ L de conjugado em cada poço, seguidos de 50 μ L do calibrador (com intervalo de detecção entre 300ng/mL e 18,8ng/mL) ou da amostra (diluída na proporção de 1:10 em PBS 1X). A incubação foi a 37°C por 60 minutos e a placa foi lavada manualmente. Foram adicionados 100 μ L de TMB e incubou-se 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 100 μ L de *Stop Solution*.

Todas as placas foram submetidas à leitura (450nm) no espectrofotômetro de microplacas Eon (Bio Tek, Vermont, EUA). As concentrações das moléculas analisadas foram calculadas com base na equação linear gerada pela densidade óptica em função das diferentes concentrações do padrão de cada kit. As análises estatísticas foram feitas usando 1-way-ANOVA e pós-teste de Tukey a 5% de probabilidade, no *Prism 6* (GraphPad Software Inc., Carolina do Norte, EUA). Para verificar se houve

interferência do tratamento dos hepatócitos com o fenofibrato foi realizada uma análise de regressão linear em função das concentrações das proteínas e das concentrações do fenofibrato utilizadas. A interferência foi avaliada pelo valor de R^2 , obtidos a partir da função do gráfico (EVANS, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. ESTABELECIMENTO DE METODOLOGIA DE CULTIVO PRIMÁRIO DE HEPATÓCITOS BOVINOS PARA ESTUDO DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR *IN VITRO*

Para estabelecimento da melhor metodologia de isolamento e cultivo primário de hepatócitos bovinos foi avaliada a influência dos seguintes fatores sobre a viabilidade celular:

A - Uso de protocolo enzimático (colagenase) e não enzimático (*cell strainers* de 70 e 40 μm);

B - Uso de gradiente de Percoll (1,07 g/mL);

C - Uso de meio de cultivo DMEM e HMM;

D - Tempo de cultivo.

Para estabelecimento do protocolo enzimático foi necessário verificar a concentração ideal de colagenase por meio da avaliação do rendimento de células viáveis ao final da digestão dos fragmentos de fígado de tamanho e peso aproximados.

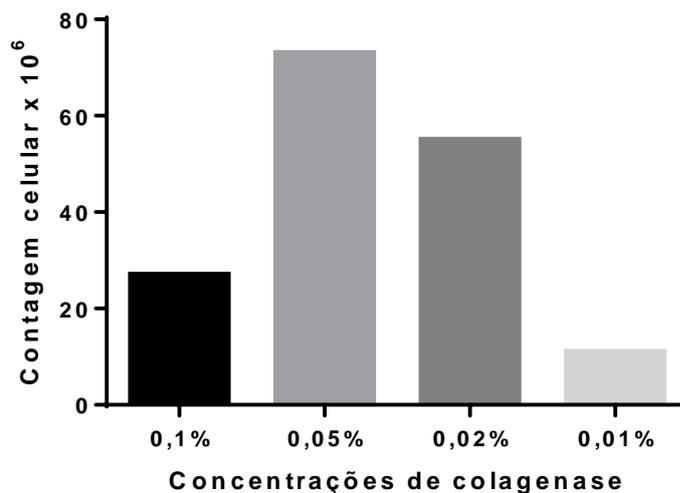


Figura 5. Número absoluto de células viáveis logo após o isolamento de hepatócitos bovinos com diferentes concentrações de colagenase (0,1%; 0,05%; 0,02%; 0,01%) no protocolo enzimático. Eixo y: Número absoluto de células x 10⁶. Eixo x: Concentrações distintas de colagenase utilizada para o isolamento.

Uma vez que a colagenase 0,05% demonstrou melhor rendimento celular, foi verificada qual seria a viabilidade dessas células após sete dias de cultivo, tempo necessário para estabilização das funções celulares (SHULMAN & NAHMIAS, 2013). Esses isolamentos resultaram em um baixo número de células que, conseqüentemente, inviabilizou a realização de experimentos de extração celular.

Para testes de protocolo não enzimático foram utilizados *cell strainers* de 70 e 40 μm para filtração do fígado macerado. Adicionalmente também foram utilizados, ou não, gradiente de Percoll (1,07g/mL) para testar o aumento do rendimento de hepatócitos viáveis. Essas células foram incubadas tanto com meio HMM completo, quanto com DMEM completo. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na viabilidade celular após os diferentes tratamentos (Figura 6). A metodologia com utilização de *cell strainer* de 70 μm sem uso de Percoll demandou menores tempos de isolamento e custo. O meio escolhido foi o HMM, por ser específico para cultivo de hepatócitos e apresentar viabilidade semelhante ao DMEM.

O tempo de cultivo dos hepatócitos isolados também foi avaliado para verificar se poderia interferir na viabilidade celular. Quatro diferentes tempos foram analisados (6, 24, 48 e 72 horas). Os resultados demonstraram queda significativa da viabilidade dos hepatócitos 72 horas após o isolamento e cultivo (Figura 7). Nesse sentido, já que a viabilidade não sofreu interferência nas primeiras 48 horas de cultivo, esse tempo foi utilizado para avaliação da modulação do receptor PPAR α sobre a produção de fatores do complemento e PFA em hepatócitos bovinos. Vale ressaltar que a literatura reporta alteração da expressão gênica para a maioria dos genes que codificam proteínas do sistema complemento e de fase aguda no período de 48 horas (AZUMA *et al.*, 2000).

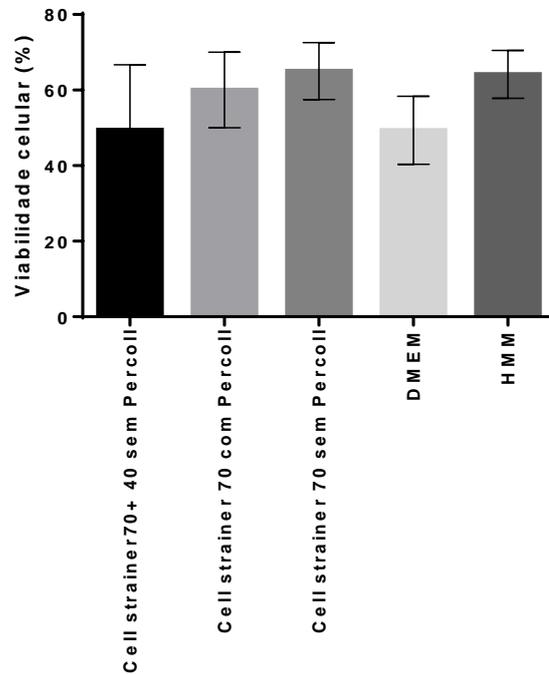


Figura 6. Viabilidade de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro* com utilização de três diferentes metodologias e com dois meios de cultivo distintos após 48 horas de cultivo. No eixo y: Viabilidade de hepatócitos calculado pela divisão do número de células viáveis pelo número total contado na câmara de Neubauer. No eixo x: Diferentes metodologias de isolamento e meios de cultivo utilizados. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; HMM: *Hepatocyte Maintenance Medium* ($p > 0,05$).

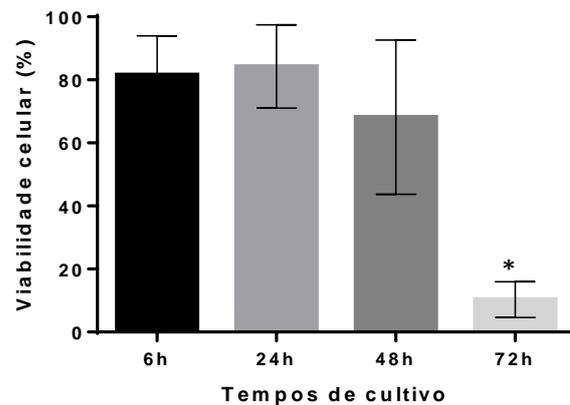


Figura 7. Viabilidade de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro* com quatro diferentes tempos de cultivo no meio HMM. No eixo y: Viabilidade de hepatócitos calculado pela divisão do número de células viáveis pelo número total contado na câmara de Neubauer após diferentes tempos de cultivo. No eixo x: Diferentes tempos de cultivo utilizados (* $p < 0,05$).

Uma vez que os hepatócitos são células aderentes, após 48 horas de cultivo foi possível observar alterações na morfologia (Figura 8), onde as setas indicam os hepatócitos que, após 48 horas de cultivo, apresentaram morfologia irregular e formação de grumos, o que pode estar relacionada tanto com o fenômeno de adesão quanto com a queda de viabilidade para $68,1\% \pm 24,5$ em 48 horas (Tabela 3).

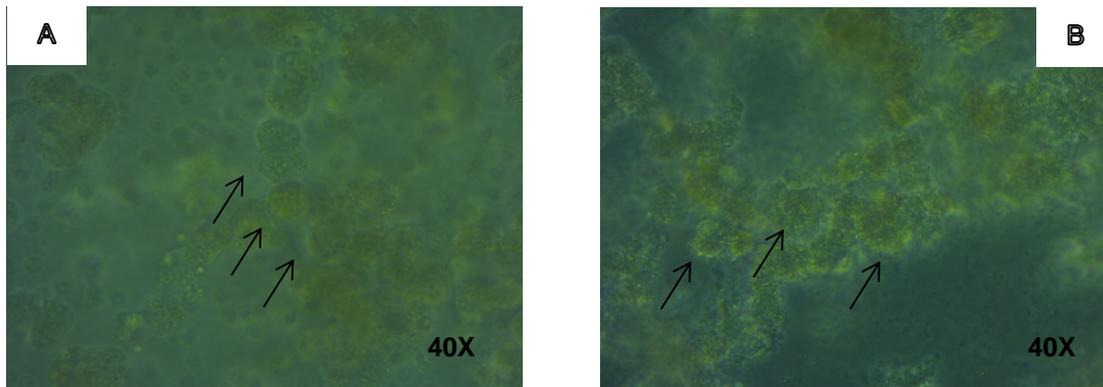


Figura 8. Cultivo primário de hepatócitos bovinos. Fotografias representativas do isolamento primário de hepatócitos nos tempos de 0 e 48 horas no aumento de 40x (A, B), respectivamente. As setas representam hepatócitos.

Analisando os resultados em conjunto foi possível estabelecer um protocolo de cultivo baseado na viabilidade celular e menor interferência de sinais químicos externos na sinalização intracelular. Basicamente, para os experimentos de modulação do receptor PPAR α , o tecido hepático foi divulsionado, filtrado em *cell strainer* de 70 μ m e as células plaqueadas na quantidade de $2,5 \times 10^6$ por poço em meio HMM com 2% SFB completo por 48 horas.

5.2. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DE RNA

Diferentes quantidades de células foram utilizadas para verificar o rendimento máximo de RNA extraído (Figura 9). As quantidades foram estabelecidas de acordo com a quantidade de tecido presente no lobo caudal

do fígado (aproximadamente 35 gramas), o rendimento de hepatócitos viáveis (aproximadamente 2×10^6 células/grama de tecido), e número máximo de células/poço (4×10^6) de forma a atender todos os tratamentos a serem testados (n=5, em duplicata).

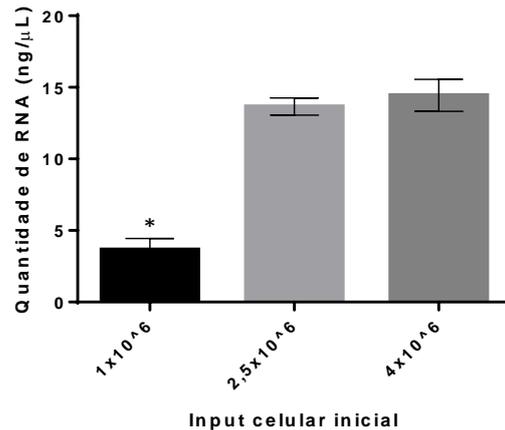


Figura 9. Quantificação de RNA extraído com utilização de três diferentes quantidades iniciais de hepatócitos bovinos isolados e cultivados *in vitro*. No eixo Y: Quantificação de RNA em ng/μL. No eixo X: três diferentes quantidades iniciais aplicadas para extração (*p<0,05).

Os resultados demonstraram que não houve aumento linear no rendimento de RNA utilizando-se $2,5 \times 10^6$ ($10,02 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 4,98$) ou 4×10^6 ($14,44 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 9,53$) hepatócitos totais, sendo uma queda significativa na quantificação apresentada quando se utilizaram 1×10^6 células ($3,65 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 2,87$; Figura 9). Desse modo, o número de células utilizadas nos procedimentos experimentais de extração RNA foi de $2,5 \times 10^6$ hepatócitos por estímulo.

A quantificação média de RNA em hepatócitos submetidos a diferentes estímulos não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 2), permitindo observar um rendimento médio de RNA de $14,4 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 8,53$.

Tabela 2. Quantificação média de RNA extraído de hepatócitos isolados de fígado bovino e tratados com diversos estímulos, bem como as razões médias de 260/280 e 260/230. ILs: associação de IL-1 β , IL-6 e TNF α ; LPS: lipopolissacarídeo; DMSO: dimetilsulfóxido (n=5 animais).

| Tratamento | Quantificação média (ng/μL) | Razão média 260/280 | Razão média 260/230 |
|-------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| Sem estímulo 48h | 14,75 \pm 6,33 | 1,87 \pm 0,08 | 1,76 \pm 0,7 |
| ILs | 11,21 \pm 1,74 | 1,96 \pm 0,12 | 1,82 \pm 0,65 |
| LPS | 11,84 \pm 3,6 | 2,02 \pm 0,21 | 1,48 \pm 0,68 |
| DMSO | 12,48 \pm 4,76 | 2,13 \pm 0,24 | 1,26 \pm 0,74 |
| Fenofibrato 100 μ M | 13,52 \pm 5,75 | 1,96 \pm 0,27 | 1,33 \pm 0,14 |
| Fenofibrato 200 μ M | 13,34 \pm 4,29 | 1,87 \pm 0,1 | 1,4 \pm 0,69 |
| Fenofibrato 400 μ M | 14,87 \pm 6,36 | 1,94 \pm 0,16 | 1,4 \pm 0,5 |
| DMSO + ILs | 11,74 \pm 4,84 | 2 \pm 0,08 | 1,21 \pm 0,66 |
| Fenofibrato 100 μ M + ILs | 13,34 \pm 3,13 | 2,08 \pm 0,29 | 1,56 \pm 0,58 |
| Fenofibrato 200 μ M + ILs | 14,61 \pm 4,63 | 1,98 \pm 0,19 | 1,57 \pm 0,58 |
| Fenofibrato 400 μ M + ILs | 16,74 \pm 4,88 | 1,98 \pm 0,18 | 1,23 \pm 0,65 |
| DMSO + LPS | 13,85 \pm 5,63 | 1,92 \pm 0,15 | 1,34 \pm 0,22 |
| Fenofibrato 100 μ M + LPS | 12,91 \pm 4,9 | 2,1 \pm 0,16 | 1,47 \pm 0,54 |
| Fenofibrato 200 μ M + LPS | 14,54 \pm 5,9 | 2,03 \pm 0,11 | 1,61 \pm 0,38 |
| Fenofibrato 400 μ M + LPS | 15,81 \pm 3,83 | 1,92 \pm 0,14 | 1,74 \pm 0,44 |

Uma vez que houve queda de viabilidade dos hepatócitos de 81,6% \pm 12,4 em 6 horas para 68,1% \pm 24,5 em 48 horas de cultivo (Figura 9), foi verificada se a baixa quantificação obtida teria correlação com a morte celular. Para tal, a quantidade e a qualidade do RNA foram analisadas logo após o isolamento e em diferentes tempos de cultivo (24 e 48 horas). Os resultados demonstraram que, apesar da queda de viabilidade não apresentar diferença significativa nos tempos analisados, a integridade do RNA foi influenciada por esse efeito biológico quando são avaliadas as células logo após o isolamento (Tabela 3). Conforme pôde ser observado, a quantificação e a integridade do RNA das células no tempo inicial do cultivo foram baixas, apesar de apresentar a viabilidade máxima utilizada nos ensaios (Tabela 3), o que pode estar relacionado com o metabolismo e a fisiologia dos bovinos (NOBLE, 1978).

Tabela 3. Viabilidade celular, quantificação média e qualidade de RNA extraído de hepatócitos isolados de fígado bovino em diferentes tempos. Tempo 0: tempo inicial do cultivo, logo após o isolamento celular (* $p < 0,05$).

| Tempo (h) | Viabilidade (%) | Quantificação (ng/ μ L) | Integridade (RIN) |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------------|
| 0 | 100,0 | 20,0 \pm 11,8 | 3,1 \pm 0,6 * |
| 24 | 84,2 \pm 13,2 | 10,1 \pm 8,7 * | 2,0 \pm 0,9 |
| 48 | 68,1 \pm 24,5 | 15,4 \pm 10,2 | 1,9 \pm 1,3 |

5.3. EFEITO MODULADOR DA ATIVAÇÃO ESPECÍFICA DO RECEPTOR NUCLEAR PPAR α SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES DO COMPLEMENTO E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM HEPATÓCITOS BOVINOS

Para verificar o efeito modulador da ativação específica do receptor nuclear PPAR α foram utilizados ensaios de qPCR e dosagem de PFA e complemento no sobrenadante de cultura de hepatócitos bovinos cultivados com as diferentes concentrações de fenofibrato (descrito no item 4.1.3.). Para cada estímulo celular, foi analisada a expressão dos genes relacionados com a produção de fatores do complemento (C1, C4, C5, MBL) e PFA (SAA, α 1-AGP e HP).

Como controles endógenos de expressão foram utilizados os genes GAPDH e RPLP0, que apresentaram melhor estabilidade ($M = 0,646$ e $0,750$, respectivamente). Como descrito no item 4.4.3., o *software* SAS foi utilizado para avaliar diferenças entre os valores de Ct dos genes candidatos e dos genes endógenos para avaliar diferenças de expressão gênica entre os diversos tratamentos utilizando células não estimuladas como amostra de referência. Valores p foram gerados e estão demonstrados no Anexo A.

Uma vez que PFA e fatores do complemento encontram-se armazenadas no citoplasma dos hepatócitos e podem ser liberadas frente a diferentes estímulos de ativação celular (SUFFREDINI *et al.*, 1999), foi verificada a concentração de C1q, SAA e α 1-AGP no sobrenadante de cultura

dos diversos tratamentos, além da sua correlação com as diferentes concentrações de fenofibrato utilizadas (200 e 400 μM).

5.3.1. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos não ativados

Hepatócitos bovinos não ativados, ou seja, cultivados somente com diferentes concentrações de fenofibrato (100, 200 e 400 μM) e com DMSO, veículo de diluição do fenofibrato, não demonstraram alterações significativas na expressão de genes que codificam fatores do sistema complemento e PFA (Figura 10). Isso sugere que a ativação do receptor PPAR α em hepatócitos bovinos não estimulados, *in vitro*, após 48h, não é capaz de induzir alterações significativas na expressão dos genes C1, C4, C5, MBL, SAA, AGP e HP.

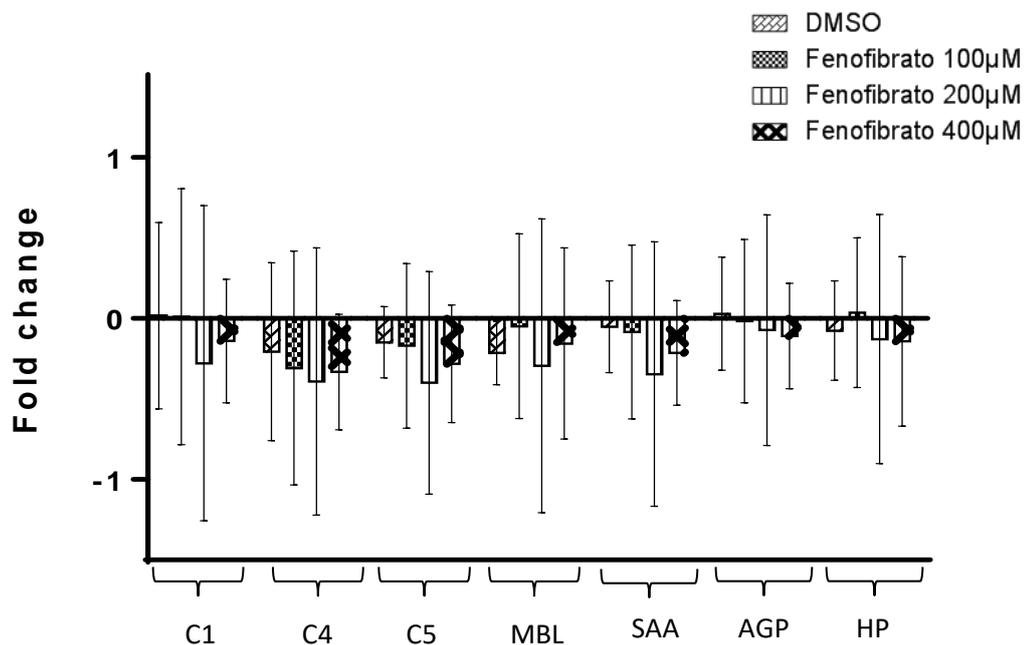


Figura 10. Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e de proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos frente estímulos com DMSO e fenofibrato nas concentrações de 100, 200 e 400 μM após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α -glicoproteína ácida; HP: haptoglobina ($p > 0,05$, $n = 5$ animais).

Além da expressão gênica, também foram quantificadas as moléculas C1q, SAA e α 1-AGP, presentes no sobrenadante de cultura de hepatócitos bovinos estimulados com fenofibrato em diferentes concentrações (200 e 400 μ M) e com DMSO, veículo do fenofibrato, por meio do método de ELISA. Foi verificado que não existem diferenças estatísticas na dosagem de C1q ($p=0,5$), SAA ($p=0,98$) e α 1-AGP ($p=0,003$) entre os tratamentos com fenofibrato quando comparados com as células não estimuladas (Figura 11A, C e E).

A fim de se verificar se pequenas variações na dosagem dessas três proteínas podem estar relacionadas com as concentrações diferentes de fenofibrato foi feita uma análise de regressão linear. Os resultados demonstraram que apenas a proteína α 1-AGP apresentou correlação negativa e moderada com as concentrações de fenofibrato ($p=0,003$ e $R^2=0,42$) (Figura 11F).

5.3.2. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com citocinas pró-inflamatórias

Para mimetizar a ativação de hepatócitos por estímulos pró-inflamatórios sistêmicos foi utilizada a combinação de citocinas IL-1 β (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL) e TNF α (50 ng/mL) em combinação com diferentes concentrações de fenofibrato (Figura 12). Os resultados obtidos indicaram que a ativação de PPAR α não modula a expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento C1, C4, C5 e MBL e proteínas de fase aguda SAA, AGP e HP.

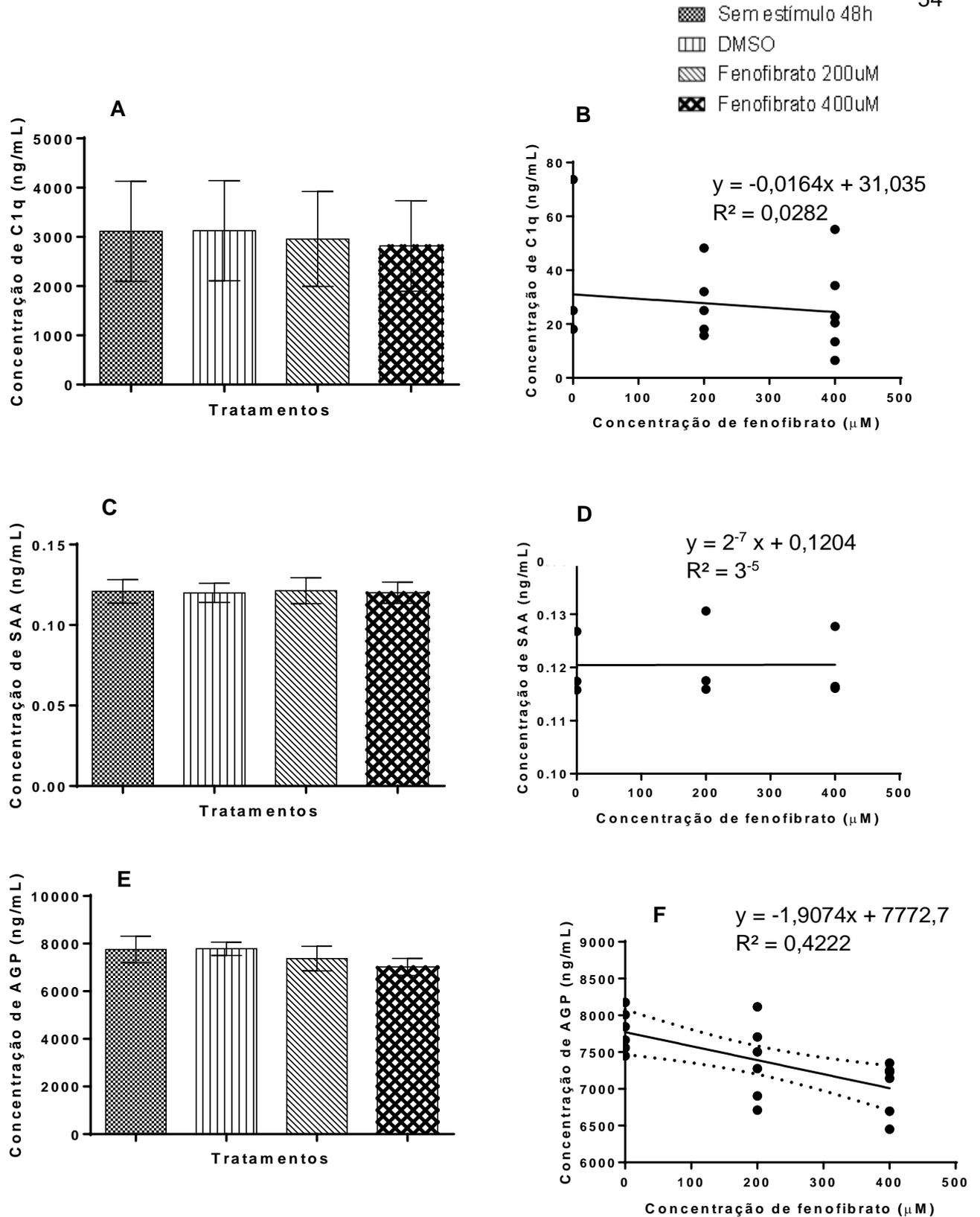


Figura 11. Concentração de proteínas do complemento (C1q) e de proteínas de fase aguda (SAA e α 1-AGP) em ng/mL em sobrenadantes de cultura de hepatócitos bovinos. Foram avaliadas células não estimuladas, incubadas com fenofibrato (200 e 400µM) e com DMSO (veículo) após 48 horas de cultivo juntamente com as respectivas análises de regressão linear, correlacionando a concentração das proteínas e a do fenofibrato. A e B: Proteína C1q; C e D: Proteína SAA; E e F: proteína α 1-AGP ($p > 0,05$, $n = 3$ animais).

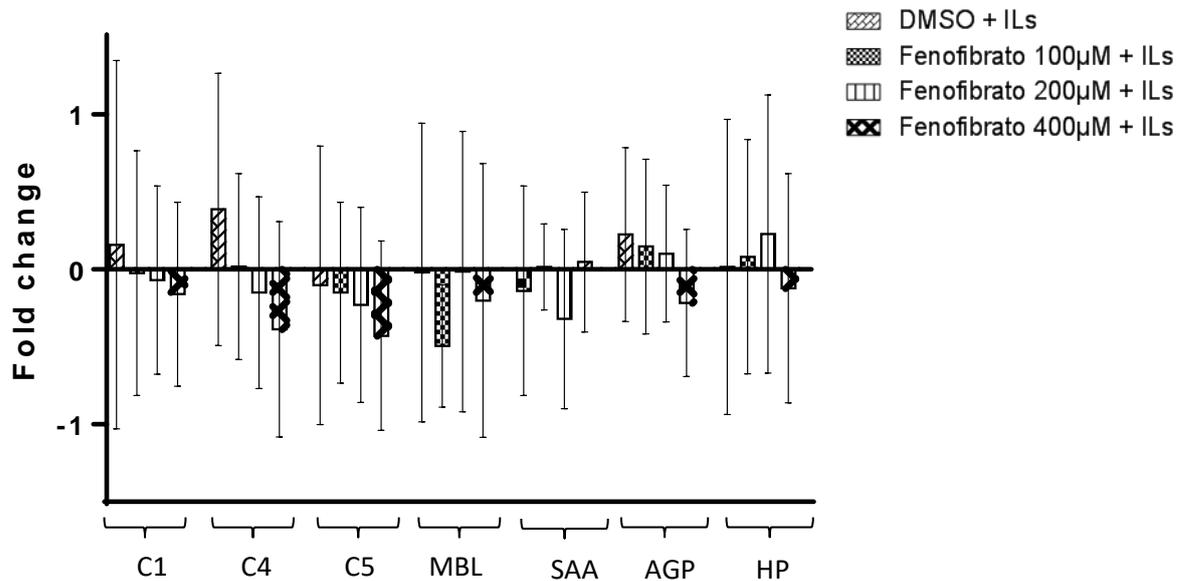


Figura 12. Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos frente estímulos com DMSO e fenofibrato nas concentrações de 100, 200 e 400 μM juntamente com associação de interleucinas pró-inflamatórias após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina; IL: associação de IL-1 β + IL-6 + TNF α ($p > 0,05$, $n=5$ animais).

Além da expressão gênica, também foram dosadas as proteínas C1q, SAA e α 1-AGP, presentes no sobrenadante de cultura de hepatócitos bovinos ativados com citocinas pró-inflamatórias em associação com diferentes concentrações fenofibrato (200 e 400 μM) e com DMSO, veículo de diluição do fenofibrato. Foi verificado que não existiram diferenças estatísticas na dosagem de C1q ($p=0,2$), SAA ($p=0,6$) e α 1-AGP ($p=0,4$) entre os tratamentos com fenofibrato quando comparados com as células não estimuladas (Figura 13A, C e E). As análises de regressão linear demonstraram que não houve correlação entre as concentrações de fenofibrato e de cada uma das três proteínas avaliadas (Figura 13B, D e F).

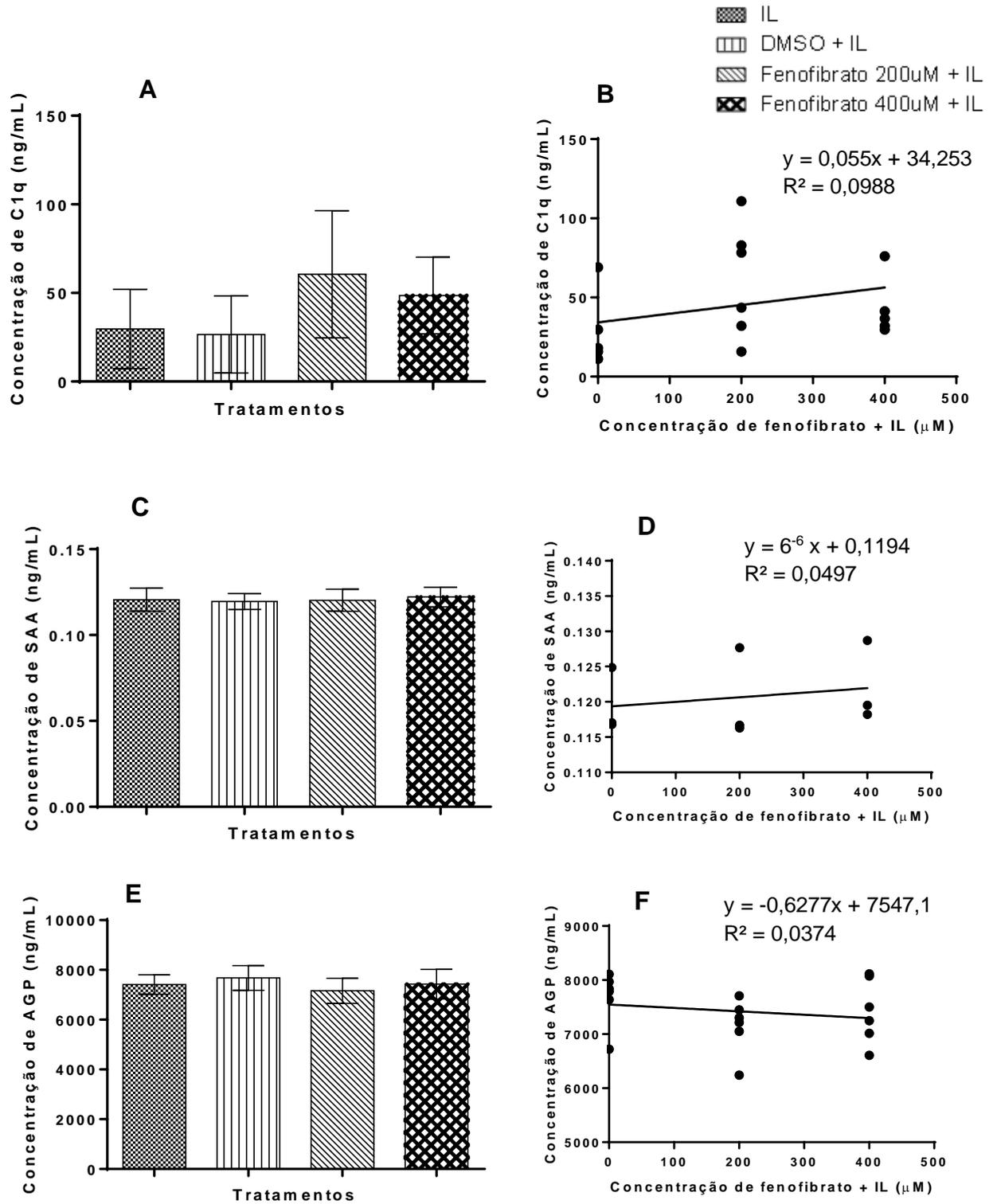


Figura 13. Concentração de proteínas do complemento (C1q) e de proteínas de fase aguda (SAA e α 1-AGP) em ng/mL em sobrenadantes de cultura de hepatócitos bovinos. Foram avaliadas células estimuladas com IL-1 β + IL-6 + TNF α , estimuladas com diferentes concentrações de fenofibrato (200 e 400 μ M), e com DMSO (veículo), associados ao controle pró-inflamatório IL-1 β + IL-6 + TNF α , após 48 horas de cultivo juntamente com as respectivas análises de regressão linear, correlacionando a concentração das proteínas e a do fenofibrato associado a IL-1 β + IL-6 + TNF α . A e B: Proteína C1q; C e D: Proteína SAA; E e F: proteína α 1-AGP ($p > 0,05$, $n = 3$ animais).

5.3.3. Efeito modulador da ativação de PPAR α sobre a expressão de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos ativados com LPS

Para mimetizar a ativação de hepatócitos por estímulos infecciosos sistêmicos foi utilizada a combinação de LPS, um ativador do receptor TLR4 (*Toll like receptor 4*) que possui atividade pró-inflamatória, com diferentes concentrações de fenofibrato (Figura 14). Os resultados obtidos indicam que a ativação de PPAR α não modula a expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento C1, C4, C5 e MBL e proteínas de fase aguda SAA, AGP e HP em hepatócitos ativados com LPS.

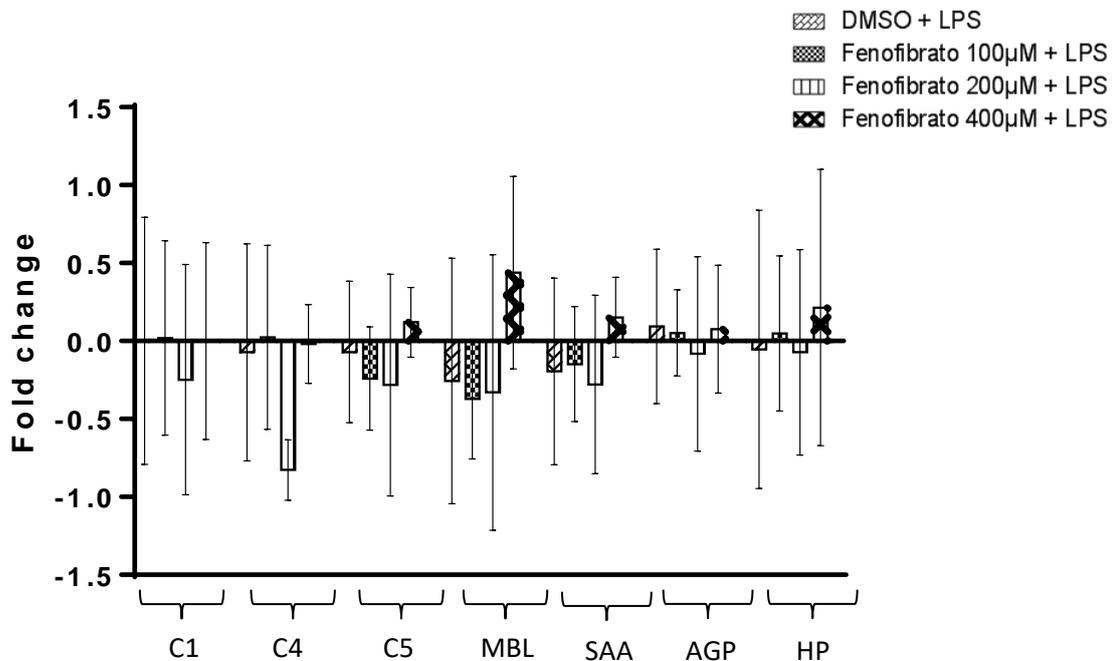


Figura 14. Expressão de genes que codificam proteínas do sistema complemento (C1, C4, C5 e MBL) e proteínas de fase aguda (SAA, AGP e HP) em hepatócitos bovinos estimulados com DMSO e diferentes concentrações de fenofibrato (100, 200 e 400 μM) associado ao LPS após 48 horas de cultivo. C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina; Veículo: DMSO; LPS: lipopolissacarídeo ($p > 0,05$, $n = 5$ animais).

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ferramentas pré-tecnológicas, como vacinas, imunomoduladores e novos medicamentos dependem de ensaios pré-clínicos que são conduzidos em modelos experimentais animais e plataformas de estudos *in vitro*. Modelos de estudo de imunidade inata envolvem o cultivo de células, como macrófagos e hepatócitos, e são fundamentais para o avanço no conhecimento acerca das reações de fase aguda e de modulação da resposta imune para o desenvolvimento de vacinas e novos medicamentos, evitando efeitos colaterais indesejáveis em ensaios clínicos. Hepatócitos constituem o componente celular mais abundante do fígado (80-90%; MALARKEY *et al.*, 2005) e desempenham funções vitais no metabolismo, principalmente de lipídeos e de imunidade inata (JAKAB, 2015; NGUYEN *et al.*, 2008). Essas células são responsáveis pela produção de proteínas de fase aguda e fatores do complemento, essenciais para o controle do desenvolvimento de inflamações sistêmicas, locais e resposta imune adaptativa (GRUYS *et al.*, 1994; JAKAB, 2015). Trabalhos recentes acerca da caracterização de resposta imune relacionada com a resistência ao carrapato *Rhipicephalus microplus* apontaram para a participação do metabolismo de lipídeos, incluindo ativação de receptores como PPAR α , e produção de fatores do complemento em hospedeiros bovinos resistentes (GARCIA *et al.*, 2017). Paralelamente, em humanos e camundongos, foi observada a modulação da produção de complemento e proteínas de fase aguda através da ativação do receptor PPAR α (CALDER, 2002; MOGILENKO, 2012; MANSOURI *et al.*, 2008; MOUTHIERIS *et al.*, 2005). Uma vez que a fisiologia metabólica de monogástricos é diferenciada dos ruminantes, principalmente no que diz respeito aos mecanismos de regulação de síntese e oxidação de lipídeos (NOBLE, 1978), o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de cultivo primário de hepatócitos bovinos para verificar se a ativação do receptor nuclear PPAR α seria capaz de modular a expressão de fatores do complemento e PFA, tal qual em humanos e camundongos, constituindo um potencial agente imunomodulador para auxiliar no controle contra carrapatos.

Estudos de sinalização intracelular através do cultivo *in vitro* geralmente se utilizam de linhagens celulares estáveis e imortalizadas

(DONATO *et al.*, 2008; GRIPON *et al.*, 2002; WU *et al.*, 1994). Na ausência dessa ferramenta, o isolamento primário de células pode constituir uma alternativa. A ausência de linhagem de hepatócitos bovinos para desenvolvimento do estudo da modulação de PPAR α sobre a resposta de fase aguda levou a adaptação de diversos protocolos de isolamento primário. Os resultados, gerados no presente estudo, demonstraram que o uso de protocolos enzimáticos, amplamente descritos na literatura para as espécies murinas e humanas (SPOTORNO *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2013), resultaram em um baixo rendimento de hepatócitos após estabilização celular em cultura. Vale salientar que a colagenase, enzima comumente utilizada para destacamento dos hepatócitos do tecido hepático, leva ao estresse oxidativo dessas células (TIRMENSTEIN, *et al.*, 2000), o que poderia interferir com as análises de ativação do PPAR α , que regula ativamente o fator de transcrição NF- κ B envolvido na modulação de respostas oxidativas (HE *et al.*, 2010). Nesse sentido, no presente estudo, foi priorizado o isolamento não enzimático, com o uso de diversas adaptações experimentais (variação de metodologias de filtragem celular e gradiente, meios de cultivo e suplementações, tempos experimentais), onde foram buscadas eficiências próximas de 60% de viabilidade, conforme descrita em literatura para hepatócitos de humanos e camundongos (EHRHARD & SCHMICKE, 2016; ZHANG *et al.*, 2012). Análises de viabilidade celular foram realizadas nas primeiras 72 horas de cultivo, tempo necessário para avaliação da produção de proteínas de fase aguda e do complemento, conforme descrito por AZUMA *et al.*, 2000. Os resultados indicaram que o divulsionamento do fragmento de fígado, filtração em *cell strainer* de 70 μ m e plaqueamento de $2,5 \times 10^6$ células por poço, em meio HMM 2% SFB, apresentaram condições favoráveis de cultivo até 48 horas após o isolamento (viabilidade de $68,1\% \pm 24,5$).

Os hepatócitos isolados apresentaram mudanças morfológicas visíveis após esse período de tempo (Figura 8). A formação de grumos celulares irregulares, encontrados com frequência nos cultivos avaliados neste estudo, pode estar associada com alteração de atividade bioquímica e consequente aumento da mortalidade dessa célula em 72 horas ($10,27 \pm 5,7$), refletindo resultados descritos por BROTHY *et al.*, (2009) para hepatócitos de

camundongos. A produção de algumas proteínas também pode ser prejudicada, uma vez que a interação entre as células diminui quando os hepatócitos assumem essa forma irregular (TONG *et al.*, 1990; SATO *et al.*, 1994).

Para avaliar o efeito modulador da ativação de PPAR α , sobre a resposta de fase aguda e produção de fatores do complemento, foram utilizados hepatócitos bovinos não ativados ou submetidos a estímulos pró-inflamatórios que mimetizam inflamações sistêmicas (citocinas pró-inflamatórias; WATKINS *et al.*, 1995; MACDOUGALL & COOPER, 2002) ou infecções bacterianas (LPS; NEMZEK *et al.*, 2008). Para tal, foram feitas análises de expressão gênica e dosagem de fatores proteicos no sobrenadante de cultura de hepatócitos, demonstrando, somente, uma correlação negativa e moderada ($R^2=0,42$) das concentrações de fenofibrato na produção da proteína de fase aguda α 1-AGP, sem qualquer alteração nas outras moléculas analisadas (C1q e SAA). Análises da qualidade do material genético extraído desses hepatócitos demonstraram que, apesar de terem sido consideradas as viabilidades celulares descritas na literatura ($68,1 \pm 24,5$; EHRHARD & SCHMICKE, 2016), a qualidade do RNA apresentou baixa qualidade (RIN= $1,9 \pm 1,3$). Extrações de RNA, realizadas logo após o isolamento dos hepatócitos, sem submissão das células ao cultivo, apresentaram também baixa qualidade do RNA extraído (RIN de $3,1 \pm 0,6$), sugerindo que essa integridade pode estar ligada com a própria fisiologia do hepatócito e também da atividade metabólica dos bovinos, já que essas células apresentaram qualidade do RNA próximo ao encontrado após 48 horas de cultivo ($1,9 \pm 1,3$). A qualidade do RNA influencia diretamente nos resultados de expressão gênica, obtidos com a técnica de PCR em tempo real, o que pode ter contribuído para os altos desvios padrões nos valores de *Cycle Threshold* (Ct) encontrados nos nossos resultados. Conforme descrito por SCHOOR *et al.*, (2003), valores de RIN variando entre 2 e 3 podem ser utilizados nos ensaios de qPCR. Outro fator que pode ter contribuído para os altos desvios nos valores de Ct, nos tratamentos avaliados, é o próprio isolamento primário, que conta com uma baixa estabilidade celular (NEUMAN, 2001). Ainda, variações raciais nos indivíduos amostrados também podem ajudar a explicar esta grande variação, já que os tecidos hepáticos

foram coletados em abatedouro e estes animais não possuíam qualquer registro de composição racial ou condição clínica. Este fato pode se tornar bastante relevante na espécie bovina, onde foram encontradas grandes diferenças entre as raças, quanto à resistência a parasitas e estresse térmico (SILVA *et al.*, 2010). Em relação à resistência a carrapatos, por exemplo, sabe-se que bovinos zebuínos apresentam maior produção de proteínas do sistema complemento e proteínas de fase aguda pró-inflamatórias quando comparados com taurinos (CARVALHO *et al.*, 2008), parecendo estar ligado a atividade metabólica de lipídeos (CARVALHO *et al.*, 2014) e, conseqüentemente, podendo influenciar na expressão dessas moléculas no modelo bovino utilizado.

Considerando a complexidade do cultivo primário de hepatócitos, a quantificação e qualidade do RNA obtidas e o nível de desenvolvimento atual dos protocolos utilizados no estudo, não foi possível acessar o papel do PPAR α na regulação da produção de fatores do complemento e proteínas de fase aguda em hepatócitos bovinos. Para melhor avaliação de vias de sinalização intracelular envolvida nessas respostas é necessária a continuação do desenvolvimento de protocolos de isolamento e cultivo de hepatócitos bovinos, de forma a buscar maior estabilidade celular. O desenvolvimento de linhagens de hepatócitos bovinos, tanto de animais taurinos quanto zebuínos, seria de fundamental importância para o avanço do conhecimento no campo veterinário, trazendo grandes impactos sobre o desenvolvimento de ferramentas tecnológicas para controle de doenças metabólicas e infecto-parasitárias.

7. CONCLUSÕES

- Foi estabelecida uma metodologia de cultivo primário de hepatócitos bovinos que necessita desenvolvimento para se apresentar efetivo em estudos de sinalização intracelular e de imunomodulação.
- O protocolo estabelecido utilizado para a obtenção dos dados nesse projeto não permitiu acessar a importância do receptor PPAR α na modulação da expressão de genes que codificam as proteínas do complemento C1, C4, C5 e MBL e as proteínas de fase aguda SAA, AGP e HP, tanto em células não estimuladas quanto em células ativadas por IL-1 β + IL-6 + TNF α e por LPS em hepatócitos bovinos *in vitro*;
- O protocolo estabelecido utilizado para a obtenção dos dados nesse projeto não permitiu acessar a importância do receptor PPAR α na modulação da produção das proteínas C1q, SAA e α 1-AGP, tanto em células sem nenhum estímulo quanto em células ativadas por IL-1 β + IL-6 + TNF α em hepatócitos bovinos *in vitro*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Desenvolver uma metodologia de cultivo primário de hepatócitos bovinos que apresente maior viabilidade celular, bem como possibilite a obtenção de RNA de melhor integridade;
- Avaliar um número maior de animais experimentais em futuros estudos de expressão gênica, minimizando as variações individuais entre os animais e a utilização de linhagem celular de hepatócitos bovinos;
- Buscar novas alternativas para a descoberta de moléculas envolvidas na imunomodulação em resposta a estresses bióticos, permitindo maior entendimento do sistema imune bovino com vista ao desenvolvimento de fármacos e vacinas para o mercado veterinário.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ASANO, K.; KOIDE, N.; TSUJI, T. **Ultrastructure of multicellular spheroids formed in the primary culture of adult rat hepatocytes**. *J. Clin. Electron Microsc.*, v.22, 243–252, 1989.

ATHAMNA, A., KRAMER, M.R., KAHANE, I. **Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages**. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.15, p.135–41, 1996.

AZUMA, Y.; MURATA, M.; MATSUMOTO, K. **Alteration of sugar chains on α_1 -acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro**. *Clinica Chimica Acta*, v.294, p.93-103, 2000.

BARGER, P.M.; BROWNING, A.C.; GARNER, A.N.; KELLY, D.P. **p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response**. *J Biol Chem*, v.276, p.44495-501, 2001.

BELFORT, R.; BERRIA, R.; CORNELL, J.; CUSI, K. **Fenofibrate reduces systemic inflammation markers independent of its effects on lipid and glucose metabolism in patients with the metabolic syndrome**. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.95, p.829-36, 2010.

BENNET, M.; SCHMID, K. **Immunosuppression by human plasma alpha 1-acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.77(10): p.6109–6113, 1980.

BENSINGER, S.J.; TONTONOZ, P. **Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors**. *Nature*, v.454, p.470-7, 2008.

BERGER, J.; MOLLER, D.E. **The Mechanisms of Action of PPARs**. *Annual Reviews*, v.53, p.409-435, 2002.

BLUESTONE, J. *et al.* **The functional plasticity of T cell subsets**. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 11, p. 811-816, 2009.

BROTHY, C.M.; WHEELER, J.L.L.; AMIOT, B.P.; REMMEL, R.P.; RINALDO, P.; NYBERG, S.L. **Rat hepatocyte spheroids formed by rocked technique maintain differentiated hepatocyte gene expression and function**. *Hepatology*, v.49, p. 578-586, 2009.

CALDER, P.C. **Dietary modification of inflammation with lipids**. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.61, p.345-358, 2002.

CARVALHO, W.A.; BECHARA, G.H.; MORÉ, D.D.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S.; FERREIRA, I.K.; SANTOS, F.M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus***. *Experimental Parasitology*, v.118, p.587–591, 2008.

CARVALHO, W.A.; DOMINGUES, R.; PRATA, M.C.A.; DA SILVA, M.V.; DE OLIVEIRA, G.C.; GUIMARÃES, S.E.; MACHADO, M.A. **Microarray analysis of tick-infested skin in resistant and susceptible cattle confirms the role of inflammatory pathways in immune activation and larval rejection.** *Veterinary Parasitology*, v.205 (1–2), p. 307–317, 2014.

CHEN, Q.; KON, J.; OOE, H.; SASAKI, K.; MITAKA, T. **Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture.** *Nature Protocols*, v.2, p.1197-1205, 2007.

CORTON, J.C.; FAN, L.Q.; BROWN, S.; ANDERSON, S.P.; BOCOS, C.; CATTLEY, R.C.; MODE, A.; GUSTAFSSON, J.A. **Down-regulation of cytochrome P450 2C family members and positive acute-phase response gene expression by peroxisome proliferator chemicals.** *Mol Pharmacol*, v.54, p. 463-473, 1998.

COSTELLO, M.; FIEDEL, B.A.; GEWURZ, H. **Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein** *Nature*, v.281, p.677 – 678, 1979.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. **Acute Phase Response in Animals: a review.** *Comparative Medicine*, v.59, n.6, p.517-526, 2009.

CUNARD, R.; DICAMPLI, D.; ARCHER, D.C.; STEVENSON, J.L.; RICOTE, M.; GLASS, C.K.; KELLY, C.J. **WY14.643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses *in vivo*.** *J. Immunol.*, v.169, p.6806-6812, 2002.

DAYNES, R.A.; JONES, D.C. **Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity.** *Nar Rev Immunol.*, v.2, p.748-59, 2002.

DE PAULIS, A.; MONTUORI, N.; PREVETE, N.; FIORENTINO, I.; ROSSI, F.W.; VISCONTI, V.; ROSSI, G.; MARONE, G.; RAGNO, P. **Urokinase Induces Basophil Chemotaxis through a Urokinase Receptor Epitope That Is an Endogenous Ligand for Formyl Peptide Receptor-Like 1 and -Like 2.** *J Immunol*, v.173 (9) p.5739-5748, 2004.

DELERIVE, P.; DE BOSSCHER, K.; BESNARD, S.; VANDEN BERGHE, W.; PETERS, J.M.; GONZALEZ, F.J.; FRUCHART, J.C.; TEDGUI A.; HAEGEMAN, G.; STAELS, B. **Peroxisome proliferator activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1.** *J Biol Chem.*, v.274, p.32048-32054, 1999.

DESREUMAUX, P.; *et al.* **Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) g=heterodimer. A basis for new therapeutic strategies.** *J Exp Med.*, v.193, p.827-38, 2001.

DEVCHAND, P.R. *et al.* **The PPAR α -leukotriene-B4 pathway to inflammation control.** *Nature*, v.384, p.39-43, 1996.

DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J.V.; GOMÉZ-LECHÓN, M.J. **Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies.** *Curr Drug Metab.*, v.9, p.1-11, 2008.

DUNKELBERGER, J.R.; SONG, W.C. **Complement and its role in innate and adaptative immune responses.** *Cell Research*, v.20, p.34-50, 2010.

ECKERSALL, P.D. **Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions.** *Comparative Haematology International*, v.5: p.93-97, 1995.

ECKERSALL, P.D., YOUNG, F.J., MCCOMB, C., HOGARTH, C.J., SAFI, S., WEBER, A., MCDONALD, T., NOLAN, A.M.; FITZPATRICK, J.L. **Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis.** *Veterinary Record*, v.148(2): p.35-41, 2001.

EHRHARDT, S.; SCHMICKE, M. **Isolation and cultivation of adult primary bovine hepatocytes from abattoir derived liver.** *EXCLI Journal*, v.15, p.858-866, 2016.

EVANS, J.D. **Starightforward statistics for the behavioral sciences.** *Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing*, 1996.

FRUCHART, J.C. **Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α): At the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease.** *Atherosclerosis*, v.205, p.1-8, 2009.

FRUCHART, J.C.; STAELS, B.; DURIEZ, P. **The role of fibric acids in atherosclerosis.** *Current Atherosclerosis Reports*, v.3, p.83-92, 2001.

GARCIA, G.R.; MARUYAMA, S.R.; SANTOS, I.K.F.M. **Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host.** *Parasites & Vectors*, v.10, p.144, 2017.

GERVOIS, P. *et al.* **Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAT Box/ Enhancer-binding protein beta.** *J Biol Chem.*, v.276, p.33471-33477, 2001.

GERVOIS, P.; KLEEMANN, R.; PILON, A.; PERCEVAULT, F.; KOENIG, W.; STAELS, B.; KOOISTRA, T. **Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after cronic *in vivo* treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate.** *J Biol Chem*, v.279, p.16154-60, 2004.

GOETZE, S.; EILERS, F.; BUNGENSTOCK, A.; KINTSCHER, U.; STAWOWY, P.; BLASCHKE, F.; GRAF, K.; LAW, R.E.; FLECK, E.; GRAFE, M. **PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt.** *Biochem Biophys Res Commun.*, v.293, p.1431-1437, 2002.

GONÇALVES, L. A.; VIGÁRIO, A.M.; GONÇALVES, C. P. **Improved isolation of murine hepatocytes for *in vitro* malaria liver stage studies.** *Malar J.*, v. 6, p.169, 2007.

GONZÁLEZ, M.C.; CORTON, J.C.; CATTLEY, R.C.; HERRERA, E.; BOCOS, C. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) agonists down-regulate α 2-macroglobulin expression by a PPAR α -dependent mechanism.** *Biochimie*, v.91, p.1029-1035, 2009.

GRIPON, P.; RUMIN, S.; URBAN, S.; LE SEYEC, J.; GLAISE, D.; CANNIE, I.; GUYOMARD, C.; LUCAS, J.; TREPO, C.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. **Infection**

of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.99, p.15655-60, 2002.

GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. **Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review.** *Vet Bull*, v.64, p.1009-1018, 1994.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. **Acute phase reaction and acute phase proteins** . *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v.6(11), p.1045–1056, 2005.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B. **Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review.** *Nutr J.*, v.14, p.13-17, 2014.

HE, G.; YU, G.Y.; TEMKIN, V.; OGATA, H.; KUNTZEN, C.; SAKURAI, T.; SIEGHART, W.; RADOSAVLJEVIC, M.P.; LEFFERT, H.L.; KARIN, M. **Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation.** *Cancer Cell*, v.17, p.286-97, 2010.

HEEGARD, P.M.H.; GPDSON, D.L.; TOUSSAINT, M.J.M.; TJORNEHOJ, K.; LARSEN, L.E.; VIUFF, B.; RONSHOLT, L. **The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.77, p.151-159, 2000.

HOCHEPIED, T.; BERGER, F.; BAUMANN, H.; LIBERT, C. **Alpha(1)-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties.** *Cytokine & growth factor reviews*, v.14(1), p.25–34, 2003.

HOLST, D.; LUGUET, S.; NOGUEIRA, V.; KRISTIENSEN, K.; LEVERVE, X.; GRIMALDI, P.A. **Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor α in fatty acid catabolism in skeletal muscle.** *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1633, p.43-50, 2003.

HONG, C.; TONTONOZ, P. **Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors.** *Curr Opin Genet Dev.*, v.18, p.461-467, 2008.

HUSBY, G., MARHAUG, G., DOWTON, B., SLETTEN, K., SIPE, J.D. **Serum amyloid A (SAA): Biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis.** *Amyloid: Int J Exp Clin Invest*, v.1:p.119-37, 1994.

ITOH, H.; MOTOI, Y.; TAMURA, K. MURATA, H. CHIBA, T. TAKEDA, S. Serum alpha 1-acid glycoprotein in bovine leukosis and its effects on blastogenesis of lymphocytes *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 1989

IWATA, H., ONO, K., HASEGAWA, A., TOMODA, I. **Alpha 1-acid glycoprotein in bovine lymphocytes.** *Nihon Juigaku Zasshi.*, v.50(5), 1998.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. **Acute-phase proteins: As diagnostic tool.** *J Pharm Bioallied Sci.*, v.1 p.118-27, 2011.

JAKAB, L. **The liver and the immune system.** *Orv Hetil*, v.156, p.1203-13, 2015.

- JANEWAY, C. MEDZHITOV, R. **Innate immune recognition.** *Annual Review of Immunology*, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.
- JIANG, Q.D.; LI, H.P.; LIU, F.J.; WANG, X.J.; GUO, Y.J.; WANG, L.F.; LU, W.F.; LI, H.J.; LI, X.P.; YANG, G.Y. **Isolation and identification of bovine primary hepatocytes.** *Genet. Mol. Res.*, v.12 (4), p.5186-5194, 2013.
- JONES, D.C.; DING, X.; ZHANG, T.Y.; DAYNES, R.A. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates T-bet transcription through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase activation.** *J Immunol.*, v.171, p.196-203, 2003.
- JORGENSEN, H.G., ELLIOTT, M.A., PRIEST, R., SMITH, K.D. **Modulation of sialyl Lewis X dependent binding to E-selectin by glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein expressed in rheumatoid arthritis.** *Biomedical Chromatography*, v.12, p.343–349, 1998.
- JUGE-AUBRY, C.E.; HAMMAR, E.; SIEGRIST-KAISER, C.; PERNIN, A.; CHIN, W.W.; BURGER, A.G. MEIER, C.A. **Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain.** *J Biol Chem.*, v.274, p.10505-10, 1999
- KEGEL, V.; DEHARDE, D.; PFEIFFER, E.; ZEILINGER, K.; SEEHOFER, D.; DAMM, G. **Protocol for isolation of primary human hepatocytes and corresponding major populations of non-parenchymal liver cells.** *J. Vis. Exp.*, v.109, 2016.
- KIDANI, Y. BENSINGER, S. **Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity.** *Immunological Reviews*, v. 249, n. 1, p. 72-83, 2012.
- KIMBRELL, D. BEUTLER, B. **The evolution and genetics of innate immunity.** *Nature Reviews Genetics*, v. 2, n. 4, p. 256-267, 2001.
- KLEEMAN, R.; GERVOIS, P.P.; VERSCHUREN, L.; STAELS, B.; PRINCEN, H.M.; KOOISTRA, T. **Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation.** *Blood*, v.101, p.545-51, 2002.
- KLEEMAN, R.; VERSCHUREN, L.; ROOIJ, B.J.; LINDEMAN, J.; MAAT, M.M.; SZALAI, A.J.; PRINCEN, H.M.; KOOISTRA, T. **Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, V.1771, P.972-982, 2004.
- KOMUVES, L.G.; HANLEY, K.; LEFEBVRE, A.M.; MAN, M.Q.; NQ, D.C.; BIKLE, D.D.; WILLIAMS, M.L.; ELIAS, P.M.; AUWERX, J.; FEINGOLD, K.R. **Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo.** *J Invest Dermatol.*, v.115, p.353-60, 2000.
- KRAVCHENKO, L.; PETRENKO, A.; SHANINA, I.; FULLER, B. **A Simple Non-enzymatic Method for the Isolation of High Yields of Functional Rat Hepatocytes.** *Cell Biology interntional*, v.26, p.1003-1006, 2002.

- KREAMER, B.L.; STAECKER, J.L.; SAWADA, N.; SATTLER, G.L.; HSIA, M.T.S.; PITOT, H.C. **Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations.** *In vitro cellular & developmental biology*, v. 22, p.201-211, 1986.
- KREY, G.; BRAISSANT, O.; L'HOORSET, F.; KALKHOVEN, E.; PERROUD, M. PARKER, M.G.; WAHLI, W. **Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay.** *Mol. Endocrinol.*, v.11, p.779-791, 1997.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int. Rev. Immunol.*, v.30, p.16-34, 2011.
- Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol.*, v.14, p.1962-75, 2000.
- LE, Y.; OPPENHEIM J.J.; WANG, J.M. **Pleiotropic roles of formyl peptide receptors.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v.12, p.91–105, 2001.
- LI, W.C.; RALPHS, K.L.; TOSH, D. **Isolation and culture of adult mouse hepatocytes.** *Methods Mol Biol*, v. 633, p.185-96, 2010.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.** *Methods*, v.25, p.402-408, 2001.
- MACDOUGALL, I.C.; COOPER, A.C. **Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines.** *Nephrol Dial Transplant*, v.17, p.39-43, 2002.
- MALARKEY, D.E. *et al.* **New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology,** *Toxicol Pathol*, vol. 33no. 1 27-34, 2005.
- MANSOURI, R.M.; BAUGÉ, E.; STAELS, B.; GERVOIS, P. **Systemic and Distal Repercussions of Liver-Specific Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Control of the Acute-Phase Response.** *Endocrinology*, v.149, 2008.
- MARKIEWSKI, M.M.; LAMBRIS, J.D. **The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight.** *Am J Pathol.*, v.171, p.715-27, 2007.
- MARX, N.; SUKHOVA, G.K.; COLLINS, T.; LIBBY, P.; PLUTZKY, J. **PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells.** *Circulation*, v.99, p.3125-31, 1999.
- MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J. D. **Complement: more than a “guard” against invading pathogens?** *Trends Immunol.*, v.23, p.485-491, 2002.
- MCDONALD, T.L.; LARSON, M.A.; MACK, D.R.; WEBER, A. **Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.83, p.203-211, 2001.

MELO, R.; WELLER, P. **Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses.** *Experimental Cell Research*, v. 340, n. 2, p. 193-197, 2016.

MICHALIK, L.; DESVERGNE, B.; BASU-MODAK, S.; ESCHER, P.; RIEUSSET, J.; PETERS, J.M.; KAYA, G.; GONZALEZ, F.J.; ZAKANY, J.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; DUBOULE, D.; WAHLI, W. **Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ALPHA and PPAR beta mutant mice.** *J. Cell Biol.*, v.154, p.799-814, 2001.

MITCHELL, T.I., JEFFREY, J.J., PALMITER, R.D., BRINCKERHOFF, C.E.. **The acute phase reactant serum amyloid A (SAA3) is a novel substrate for degradation by the metalloproteinases collagenase and stromelysin.** *Biochim Biophys Acta*;v.1156:p.245-54, 1993.

MOGILENKO, D.A.; KUDRIAVTSEV, I.V.; SHAVVA, V.S.; DIZHE, E.B.; VILENSKAYA, E.G.; EFREMOV, A.M.; PEREVOZCHIKOV, A.P.; ORLOV, S.V. **Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells.** *J Biol Chem.*, v.288, p.1726-38, 2013.

MOUTHIERS, A.; BAILLET, A.; DELOMÉNIE, C.; PORQUET, D.; CHAREF, N.M. **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Physically Interacts with CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP β) to Inhibit C/EBP β -Responsive α 1- Acid Glycoprotein Gene Expression.** *Molecular Endocrinology*, v.19, p.1135-1146, 2005.

NEMZEK, J.A.; HUGUNIN, K.M.S.; OPP, M.R. **Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being.** *Comp Med*, v.58, p.120-128, 2008.

NEUMAN, M.G. **Apoptosis in diseases of the liver.** *Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science*, v.38:p.109-166, 2001.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; SERISIER, S.; LEBLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. **Liver lipid metabolism.** *J Anim Physiol Anim Nutr*, v.92, p.272-83, 2008.

NOBLE, N.C. **Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals.** *Prog. Lipid. Res.*, v.17, p.55-91, 1978.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. **Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression.** *Trends Endocrinol. Metab.*, v.17, p.321-327, 2006.

PETERS, J.M.; HOLLINGSHEAD, H.E.; GONZALEZ, F.J. **Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta in gastrointestinal tract function and disease.** *Clin. Sci.*, v.115, p.107-27, 2008.

PETERSEN, H.H., NIELSEN, J.P.; HEEGARD, P.M.H. **Application of acute phase proteins in veterinary clinical chemistry.** *Veterinary Research*, v.35(2): p.163-187, 2004.

PFAFFL, M.W. **Quantification strategies in real-time PCR.** *International University Line*, chapter 3, p. 87-112, 2004

POIRIER, H.; NIOT, I.; MONNOT, M.C.; BRAISSAN, O.; DURMORT, C.M.; COSTET, P.; PINEAU, T.; WAHLI, W.; WILLSON, T.M.; BESNARD, P. **Differential involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine.** *Biochem. J.*, v.355, p.481-488, 2001.

PYORALA, S. **Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis.** *Vet Res*; v.34:p.565-78, 2003.

RAKSHANDEHROO, M.; STIENSTRA, R.; WIT, N.J.,E.; BRAGT, M.C.; HALUZIK, M.; MENSINK, R.P.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. **Plasma mannose-binding lectin is stimulated by PPAR α in humans.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v.302(5), p.595-602, 2012.

RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. **The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.** *Nature*, v.391, p.79-82, 1998.

ROSEN, E.D.; WALKEY, C.J.; PUIGSERVER, P.; SPIELGEMAN, B.M. **Transcriptional regulation of adipogenesis.** *Genes Dev.*, v. 14, p.1293-1307, 2000.

SATO, Y.; OCHIYA, T.; YASUDA, Y.; MATSUBARA, K. **A new three-dimensional culture system for hepatocytes using reticulated polyurethane.** *Hepatology*, v.19, 1023–1028, 1994.

SCHOOR, O.; WEINSCHENK, T.; HENNENLOTTER, J.; CORVIN, S.; STENZL, A.; RAMMENSEE, H.G.; STEVANOVIC, S. **Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA.** *BioTechniques*, v. 35, p.1192-1201, 2003.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC Mol Biol*, v.31, 2006.

SELLARO, T.L.; RANADE, A.; FAULK, D.M.; MCCABE, G.P.; DORKO, K.; BADYLAK, S.F.; STROM, S.C. **Maintenance of human hepatocyte function *in vitro* by liver-derived extracellular matrix gels.** *Tissue Eng Part A*, v.16, p.1075-1082, 2010.

SEVERGNINI, M.; SHERMAN, J.; SEHGAL, A.; JAYAPRAKASH, N.K.; AUBIN, J.; WANG, G.; ZHANG, L.; PENG, C.G.; YUCIUS, K.; BUTLER, J.; FITZGERALD, K. **A rapid two-step method for isolation of functional primary mouse hepatocytes: cell characterization and asialoglycoprotein receptor based assay development.** *Cytotechnology*, v.64, p. 187-195, 2012.

SHIYAN, S.D.; BOVIN, N.V. **Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of α 1-acid glycoprotein.** *Glycoconjugate Journal*, v.14, p.631-638, 1997.

SHULMAN, M.; NAHMIAS, Y. **Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes.** *Epithelial Cell Culture Protocols*, v.945, p.287-302, 2013.

SILVA, ANA, M. *et al.* **Infestação Natural de Fêmeas Bovinas de Corte por Ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.7, p.1477-1482, 2010.

SILVA, N. *et al.* **Saliva of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways.** *Parasites Vectors*, v. 9, n. 1, 2016.

SPOTORNO, V.G.; HIDALGO, A.; BARBICH, M.; LORENTI, A.; ZABAL, O. **Culture of bovine hepatocytes: a non-perfusion technique for cell isolation.** *Cytotechnology*, v.51, p.51-56, 2006.

STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A.; MERVAL, R.; LEBRET, M.; TORRA, I.P.; DELERIVE, P.; FADEL, A.; CHINETTI, G.; FRUCHART, J.C.; NAJIB, J.; MACLOUF, J.; TEDGUI, A. **Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators.** *Nature*, v.393, p.790-3, 1998.

STEIBEL, J.P.; POLLETO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M. **A powerful and flexible linear model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data.** *Genomics*, v.2, p.146-152, 2009.

SU, S. J., YANG, B. C., WANG, Y. S., YEH, T. M. **α_1 -Acid glycoprotein-induced tumor necrosis factor- α secretion of human monocytes is enhanced by serum binding proteins and depends on protein tyrosine kinase activation.** *Immunopharmacology*, v.41, p.21–29, 1999.

SUFFREDINI, A .F., FANTUZZI, G., BADOLATO, R., OPPENHEIM, J. J., O'GRADY, N. P. **New insights into the biology of the acute phase response.** *Journal Clinical of Immunology*, 1999.

TAN, N.S. *et al.* **Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyteresponse to inflammation.** *Genes Dev.*, v.15, p.3263-3277, 2001.

TANIGUCHI, A.; FUKUSHIMA, M.; SAKAI, M.; TOKUYAMA, K; NAGATA, I.; FUKUNAGA, A.; KISHIMOTO, H.; DOI, K.; YAMASHITA, Y; MATSUURA, T.;KITATANI, N.; OKUMURA, T.; NAGASAKA, S.; NAKAISHI, S.; NAKAI, Y. **Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients.** *Metabolism clinical and experimental*, v.50, p.477-480, 2001.

TIRMENSTEIN, M.A.; NICHOLLS-GRZEMSKI, F.A.; SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A.; FARISS, M.W. **Characterization of nitric oxide production following isolation of rat hepatocytes.** *Toxicol Sci.*, v.53, p.56-62, 2000.

TONG, J.Z.; BERNARD, O.; ALVAREZ, F. **Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media.** *Exp. Cell Res.*, 189, 87–92, 1990.

TORJDMAN, J.; CHAUVET, G.; QUETTE, J.; BEALE, E.G.; FOREST, C.; ANTOINE, B. **Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cells.** *J. Biol. Chem.*, v.278, p.18785-18790, 2003.

TOSTÕES, R.M.; LEITE, S.B.; SERRA, M.; JENSEN, J.; BJORQUIST, P.; CARRONDO, M.J.T.; BRITO, C.; ALVES, P.M. **Human liver cell spheroids in**

extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. *Hepatology*, v.55, p.1227-1236, 2012.

TSUTSUMII-ISHII, Y.; NAGAOKA, I. **NF- κ B-mediated transcriptional regulation of human β -defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation.** *J. Leukocyte Biol.*, v.71, p.154-162, 2002.

VAN DER LINDEN, E.C.M.B.; HAAN, P.F.; HAVENAAR, E.C.; DIJK, W. **Inflammation-induced expression of sialyl Lewisx is not restricted to α 1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on α 1-antichymotrypsin and haptoglobin.** *Glycoconjugate Journal*, v.15, p.177-182, 1998.

VAN MOLLE, W., LIBERT, C., FIERS, W., BROUCKAERT, P. **1-Acid glycoprotein and 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice.** *J Immunol*, v.159:p.3555–64, 1997.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology*, v.3, 2002.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; GOEHLER, L.E. **Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states.** *Pain*, v.63, p.289-302, 1995.

WIKEL, S. K. **Acquired resistance to ticks. Expression of resistance by C4-deficient guinea pigs.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.28, p.586–590, 1979

WILLSON, T.M.; BROWN, P.J.; STERNBACH, D.D.; HENKE, B.R. **The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery.** *J. Med. Chem.*, v.43, p.527-550, 2000.

WU, J.C.; MERLINO, G.; FAUSTO, N. **Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic growth factor alpha.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.91, p.674-678, 1994.

ZACHO, J., HANSEN, A.T., JENSEN, J.S., GRANDE, P., SILLESEN, H., NORDESTGAARD, B.G. **Genetically Elevated C-Reactive protein and ischemic vascular disease.** *N Engl J Med*, v.359:p.1897-908, 2008.

ZAMBON, A.; GERVOIS, P.; PAULETTO, P.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. **Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence.** *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, v.26(5), p.977-86, 2006.

ZHANG, Z.G.; LI, X.B.; GAO, L.; LIU, G.W.; KONG, T.; LI, Y.F.; WANG, H.B.; ZHANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, R.H. **An updated method for the isolation and culture of primary calf hepatocytes.** *The Veterinary Journal*, v. 191, p.323-326, 2012.

ANEXO

Anexo A. Valor p para análise da expressão gênica em células estimuladas em 48 horas de cultivo, utilizando as células não estimuladas com referência (teste t, $p > 0,05$). 0, 100, 200 e 400 são as concentrações de fenofibrato utilizadas em μM . F: Fenofibrato; IL: associação de interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF α ; LPS: lipopolissacarídeo; SE: Sem estímulo; C1: proteína do complemento 1; C4: proteína do complemento 4; C5: proteína do complemento 5; MBL: lectina ligadora de manose; SAA: amiloide sérica A; AGP: α 1-glicoproteína ácida; HP: haptoglobina.

| | Gene | | | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | C1 | C4 | C5 | MBL | SAA | AGP | HP |
| F0/F0IL | 0.9576 | 0.6608 | 0.7052 | 0.8625 | 0.6580 | 0.6138 | 0.5507 |
| F0/F0LPS | 0.9597 | 0.8594 | 0.8512 | 0.9118 | 0.6634 | 0.8332 | 0.8620 |
| F0/F100 | 0.9879 | 0.9919 | 0.7038 | 0.4900 | 0.9188 | 0.8801 | 0.9466 |
| F0/F100IL | 0.9043 | 0.7569 | 0.7496 | 0.4631 | 0.8684 | 0.7030 | 0.8474 |
| F0/F100LPS | 0.9966 | 0.8223 | 0.5412 | 0.6748 | 0.7741 | 0.9423 | 0.9211 |
| F0/F200 | 0.3636 | 0.6476 | 0.2610 | 0.8315 | 0.3699 | 0.7361 | 0.6989 |
| F0/F200IL | 0.7898 | 0.9805 | 0.5704 | 0.5995 | 0.8785 | 0.8104 | 0.5524 |
| F0/F200LPS | 0.4086 | 0.6478 | 0.4563 | 0.7571 | 0.4898 | 0.7096 | 0.7713 |
| F0/F400 | 0.6264 | 0.7132 | 0.4571 | 0.8794 | 0.6184 | 0.6480 | 0.6695 |
| F0/F400IL | 0.5776 | 0.6141 | 0.2241 | 0.9738 | 0.5548 | 0.4151 | 0.7172 |
| F0/F400LPS | 0.9541 | 0.8820 | 0.5660 | 0.0910 | 0.5329 | 0.9060 | 0.5807 |
| F0/IL | 0.9375 | 0.7397 | 0.4191 | 0.8512 | 0.6555 | 0.6254 | 0.8219 |
| F0/LPS | 0.7298 | 0.9152 | 0.3911 | 0.6876 | 0.6384 | 0.5355 | 0.9907 |
| F0/SE | 0.9562 | 0.6855 | 0.8602 | 0.5741 | 0.8724 | 0.9204 | 0.9734 |
| F0IL/F0LPS | 0.9189 | 0.7894 | 0.8423 | 0.7792 | 0.9799 | 0.7615 | 0.4317 |
| F0IL/F100 | 0.9459 | 0.6537 | 0.9885 | 0.6138 | 0.7301 | 0.5167 | 0.5780 |
| F0IL/F100IL | 0.8660 | 0.8898 | 0.9418 | 0.3776 | 0.7764 | 0.8885 | 0.6627 |
| F0IL/F100LPS | 0.9609 | 0.8251 | 0.8360 | 0.5627 | 0.8670 | 0.6631 | 0.5991 |
| F0IL/F200 | 0.3541 | 0.3787 | 0.4830 | 0.7047 | 0.6745 | 0.4092 | 0.3226 |
| F0IL/F200IL | 0.7570 | 0.6438 | 0.8688 | 0.7371 | 0.7670 | 0.7829 | 0.9603 |
| F0IL/F200LPS | 0.3967 | 0.3879 | 0.7370 | 0.6367 | 0.8251 | 0.3904 | 0.7511 |
| F0IL/F400 | 0.6023 | 0.4272 | 0.7379 | 0.9791 | 0.9718 | 0.3478 | 0.3044 |
| F0IL/F400IL | 0.5562 | 0.3546 | 0.4294 | 0.8876 | 0.9009 | 0.2012 | 0.3342 |
| F0IL/F400LPS | 0.9136 | 0.7680 | 0.3548 | 0.1416 | 0.2993 | 0.6957 | 0.9283 |
| F0IL/IL | 0.9803 | 0.9222 | 0.6917 | 0.9932 | 0.9884 | 0.3326 | 0.6856 |
| F0IL/LPS | 0.7001 | 0.7372 | 0.6567 | 0.8287 | 0.9933 | 0.2742 | 0.5424 |
| F0IL/SE | 0.9155 | 0.9635 | 0.5847 | 0.7103 | 0.5510 | 0.5486 | 0.5142 |
| F0LPS/F100 | 0.9718 | 0.8514 | 0.8472 | 0.4262 | 0.7388 | 0.7178 | 0.8009 |
| F0LPS/F100IL | 0.9444 | 0.8946 | 0.8953 | 0.5329 | 0.7873 | 0.8643 | 0.7015 |
| F0LPS/F100LPS | 0.9563 | 0.9621 | 0.6716 | 0.7574 | 0.8821 | 0.8900 | 0.7751 |
| F0LPS/F200 | 0.3906 | 0.5264 | 0.3478 | 0.9187 | 0.6428 | 0.5843 | 0.8234 |
| F0LPS/F200IL | 0.8289 | 0.8403 | 0.7037 | 0.5252 | 0.7775 | 0.9766 | 0.4220 |
| F0LPS/F200LPS | 0.4376 | 0.5316 | 0.5767 | 0.8425 | 0.7976 | 0.5603 | 0.6335 |
| F0LPS/F400 | 0.6626 | 0.5863 | 0.5775 | 0.7930 | 0.9497 | 0.5052 | 0.7909 |
| F0LPS/F400IL | 0.6125 | 0.4962 | 0.3025 | 0.8858 | 0.8761 | 0.3062 | 0.8435 |
| F0LPS/F400LPS | 0.9944 | 0.9771 | 0.4470 | 0.0724 | 0.2913 | 0.9266 | 0.4476 |
| F0LPS/IL | 0.8993 | 0.8706 | 0.5342 | 0.7655 | 0.9912 | 0.4853 | 0.6763 |

| | | | | | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| F0LPS/LPS | 0.7680 | 0.9437 | 0.5020 | 0.6082 | 0.9722 | 0.4072 | 0.8459 |
| F0LPS/SE | 0.9964 | 0.8196 | 0.7161 | 0.5014 | 0.5517 | 0.7562 | 0.8830 |
| F100/F100IL | 0.9164 | 0.7492 | 0.9513 | 0.1662 | 0.9492 | 0.5949 | 0.8955 |
| F100/F100LPS | 0.9845 | 0.8144 | 0.8170 | 0.2765 | 0.8531 | 0.8234 | 0.9733 |
| F100/F200 | 0.3716 | 0.6550 | 0.4546 | 0.3721 | 0.4263 | 0.8522 | 0.6348 |
| F100/F200IL | 0.8015 | 0.9886 | 0.8511 | 0.8505 | 0.9594 | 0.6961 | 0.5808 |
| F100/F200LPS | 0.4172 | 0.6548 | 0.7144 | 0.3251 | 0.5557 | 0.8246 | 0.8132 |
| F100/F400 | 0.6372 | 0.7208 | 0.7153 | 0.5853 | 0.6919 | 0.7597 | 0.6053 |
| F100/F400IL | 0.5880 | 0.6213 | 0.4006 | 0.5098 | 0.6249 | 0.5060 | 0.6533 |
| F100/F400LPS | 0.9663 | 0.8740 | 0.3414 | 0.3461 | 0.4684 | 0.7882 | 0.6111 |
| F100/IL | 0.9260 | 0.7324 | 0.6676 | 0.6090 | 0.7305 | 0.7357 | 0.8685 |
| F100/LPS | 0.7412 | 0.9071 | 0.6316 | 0.7593 | 0.7127 | 0.6388 | 0.9538 |
| F100/SE | 0.9683 | 0.6781 | 0.5783 | 0.8784 | 0.7929 | 0.9594 | 0.9163 |
| F100IL/F100LPS | 0.9009 | 0.9323 | 0.7699 | 0.7524 | 0.9033 | 0.7573 | 0.9221 |
| F100IL/F200 | 0.4299 | 0.4442 | 0.4188 | 0.6017 | 0.4640 | 0.4733 | 0.5446 |
| F100IL/F200IL | 0.8836 | 0.7384 | 0.8035 | 0.2103 | 0.9898 | 0.8874 | 0.6735 |
| F100IL/F200LPS | 0.4796 | 0.4523 | 0.6694 | 0.6704 | 0.5991 | 0.4519 | 0.9117 |
| F100IL/F400 | 0.7138 | 0.4990 | 0.6703 | 0.3766 | 0.7393 | 0.4032 | 0.5173 |
| F100IL/F400IL | 0.6621 | 0.4168 | 0.3676 | 0.4435 | 0.6705 | 0.2334 | 0.5619 |
| F100IL/F400LPS | 0.9500 | 0.8720 | 0.3729 | 0.0170 | 0.4305 | 0.7928 | 0.7058 |
| F100IL/IL | 0.8469 | 0.9711 | 0.6239 | 0.3577 | 0.7789 | 0.3857 | 0.9726 |
| F100IL/LPS | 0.8217 | 0.8391 | 0.5890 | 0.2578 | 0.7607 | 0.3183 | 0.8499 |
| F100IL/SE | 0.9480 | 0.9239 | 0.6206 | 0.1974 | 0.7443 | 0.6305 | 0.8131 |
| F100LPS/F200 | 0.3614 | 0.4961 | 0.6048 | 0.8360 | 0.5408 | 0.6824 | 0.6112 |
| F100LPS/F200IL | 0.7865 | 0.8033 | 0.9651 | 0.3462 | 0.8932 | 0.8669 | 0.6038 |
| F100LPS/F200LPS | 0.4062 | 0.5023 | 0.8928 | 0.9121 | 0.6858 | 0.6566 | 0.8381 |
| F100LPS/F400 | 0.6234 | 0.5542 | 0.8939 | 0.5681 | 0.8326 | 0.5970 | 0.5822 |
| F100LPS/F400IL | 0.5747 | 0.4668 | 0.5415 | 0.6511 | 0.7610 | 0.3753 | 0.6294 |
| F100LPS/F400LPS | 0.9507 | 0.9393 | 0.2381 | 0.0365 | 0.3635 | 0.9634 | 0.6347 |
| F100LPS/IL | 0.9408 | 0.9065 | 0.8429 | 0.5442 | 0.8734 | 0.5753 | 0.8949 |
| F100LPS/LPS | 0.7266 | 0.9060 | 0.8039 | 0.4123 | 0.8546 | 0.4892 | 0.9272 |
| F100LPS/SE | 0.9527 | 0.8567 | 0.4318 | 0.3277 | 0.6546 | 0.8632 | 0.8898 |
| F200/F200IL | 0.5196 | 0.6653 | 0.5747 | 0.4612 | 0.4562 | 0.5644 | 0.3060 |
| F200/F200LPS | 0.9338 | 0.9843 | 0.7016 | 0.9230 | 0.8355 | 0.9718 | 0.4908 |
| F200/F400 | 0.6714 | 0.9286 | 0.7007 | 0.7156 | 0.6885 | 0.9047 | 0.9666 |
| F200/F400IL | 0.7234 | 0.9623 | 0.9256 | 0.8060 | 0.7580 | 0.6316 | 0.9794 |
| F200/F400LPS | 0.3944 | 0.5452 | 0.0921 | 0.0582 | 0.1311 | 0.6497 | 0.3270 |
| F200/IL | 0.3445 | 0.4425 | 0.7492 | 0.6890 | 0.6507 | 0.8796 | 0.5222 |
| F200/LPS | 0.5718 | 0.5733 | 0.7874 | 0.5391 | 0.6680 | 0.7769 | 0.6765 |
| F200/SE | 0.3931 | 0.3899 | 0.1947 | 0.4391 | 0.2913 | 0.8125 | 0.7113 |
| F200IL/F200LPS | 0.5746 | 0.6647 | 0.8584 | 0.4050 | 0.5902 | 0.5409 | 0.7705 |
| F200IL/F400 | 0.8254 | 0.7315 | 0.8594 | 0.7086 | 0.7297 | 0.4868 | 0.2869 |
| F200IL/F400IL | 0.7712 | 0.6314 | 0.5131 | 0.6224 | 0.6612 | 0.2927 | 0.3182 |
| F200IL/F400LPS | 0.8344 | 0.8627 | 0.2557 | 0.2388 | 0.4380 | 0.9034 | 0.9650 |
| F200IL/IL | 0.7393 | 0.7222 | 0.8088 | 0.7354 | 0.7691 | 0.4673 | 0.6987 |
| F200IL/LPS | 0.9371 | 0.8958 | 0.7703 | 0.9019 | 0.7509 | 0.3910 | 0.5419 |
| F200IL/SE | 0.8324 | 0.6677 | 0.4577 | 0.9704 | 0.7540 | 0.7341 | 0.5113 |
| F200LPS/F400 | 0.7329 | 0.9161 | 0.9990 | 0.6449 | 0.8466 | 0.9328 | 0.4662 |

| | | | | | | | |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| F200LPS/F400IL | 0.7864 | 0.9796 | 0.6338 | 0.7323 | 0.9199 | 0.6569 | 0.5064 |
| F200LPS/F400LPS | 0.4417 | 0.5496 | 0.1896 | 0.0470 | 0.1911 | 0.6245 | 0.8028 |
| F200LPS/IL | 0.3860 | 0.4495 | 0.9493 | 0.6195 | 0.8061 | 0.9076 | 0.9377 |
| F200LPS/LPS | 0.6293 | 0.5766 | 0.9095 | 0.4775 | 0.8246 | 0.8041 | 0.7707 |
| F200LPS/SE | 0.4403 | 0.3996 | 0.3578 | 0.3846 | 0.3953 | 0.7852 | 0.7365 |
| F400/F400IL | 0.9439 | 0.8911 | 0.6329 | 0.9053 | 0.9260 | 0.7188 | 0.9460 |
| F400/F400LPS | 0.6676 | 0.6061 | 0.1900 | 0.1228 | 0.2639 | 0.5664 | 0.3070 |
| F400/IL | 0.5872 | 0.4947 | 0.9483 | 0.9714 | 0.9585 | 0.9747 | 0.4955 |
| F400/LPS | 0.8874 | 0.6356 | 0.9085 | 0.8022 | 0.9775 | 0.8700 | 0.6462 |
| F400/SE | 0.6658 | 0.4407 | 0.3585 | 0.6813 | 0.5105 | 0.7212 | 0.6803 |
| F400IL/F400LPS | 0.6174 | 0.5144 | 0.0760 | 0.0973 | 0.2268 | 0.3522 | 0.3397 |
| F400IL/IL | 0.5420 | 0.4163 | 0.6796 | 0.8770 | 0.8848 | 0.7426 | 0.5391 |
| F400IL/LPS | 0.8321 | 0.5417 | 0.7166 | 0.7118 | 0.9037 | 0.8442 | 0.6954 |
| F400IL/SE | 0.6156 | 0.3646 | 0.1651 | 0.5965 | 0.4531 | 0.4742 | 0.7306 |
| F400LPS/IL | 0.8940 | 0.8490 | 0.1695 | 0.1315 | 0.2864 | 0.5452 | 0.7314 |
| F400LPS/LPS | 0.7734 | 0.9666 | 0.1548 | 0.1940 | 0.2759 | 0.4618 | 0.5713 |
| F400LPS/SE | 0.9980 | 0.7974 | 0.6904 | 0.2537 | 0.6429 | 0.8276 | 0.5398 |
| IL/LPS | 0.6832 | 0.8178 | 0.9600 | 0.8300 | 0.9810 | 0.8950 | 0.8232 |
| IL/SE | 0.8959 | 0.9559 | 0.3259 | 0.7077 | 0.5444 | 0.6977 | 0.7867 |
| LPS/SE | 0.7714 | 0.7653 | 0.3022 | 0.8726 | 0.5287 | 0.6030 | 0.9623 |