

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Vivian Moia Meira

**EFEITOS DO LICOPENO NA HEPATITE INDUZIDA POR CONCANAVALINA A EM
CAMUNDONGOS**

Rio de Janeiro

2016

Vivian Moia Meira

**EFEITOS DO LICOPENO NA HEPATITE INDUZIDA POR CONCANAVALINA A EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada em cumprimento parcial às exigências do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof °. Dr. Felipe Leite de Oliveira

Rio de Janeiro

2016

M514 Meira, Vivian Moia.
Efeitos do licopeno na hepatite induzida por concanavalina A em camundongos / Vivian Moia Meira, 2016.
59 f. ; 30 cm

Orientador: Felipe Leite de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

1. Licopeno. 2. Hepatite. 3. Concanavalina A. 4. Galectina-3.
I. Oliveira, Felipe Leite de II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Alimentos e Nutrição. III. Título.

CDD – 613.28

Vivian Moia Meira

**EFEITOS DO LICOPENO NA HEPATITE INDUZIDA POR CONCANAVALINA A EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada em cumprimento parcial às exigências do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Professor Doutor Felipe Leite de Oliveira.

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Professor Doutor Anderson Junger Teodoro.

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Professor Doutor José Marques de Brito Neto.

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

*Dedico este trabalho ao meu
marido por todo apoio, incentivo e amor.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Pois nele foram criadas todas as coisas nos céus e na terra, as visíveis e as invisíveis sejam tronos ou soberanias, poderes ou autoridades; todas as coisas foram criadas por ele e para ele. Colossenses 1.16.

Agradeço ao meu amado marido Cirylo por todo amor, carinho, parceria, e compreensão.

Ao Jonathan Javier que me ensinou atenciosamente todas as técnicas.

Às amigas Rebeca, Renata, Raphaela e Cristiane por todo apoio, incentivo.

À Prof. Dr. Márcia ao Prof. Dr. José Brito por toda ajuda durante o trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Leite de Oliveira pela oportunidade e orientação.

À todos os alunos do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular.

À todos os colegas do mestrado.

RESUMO

O licopeno é um carotenóide encontrado em abundância no tomate e em seus produtos, sendo responsável pela coloração vermelha em frutas e vegetais. Suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes em diversos tipos de células e tecidos, incluindo o fígado, têm gerado interesse em pesquisadores, embora os efeitos moleculares e terapêuticos do licopeno, bem como dos seus metabólitos, permanece a ser elucidado. O fígado é um órgão multifuncional que recebe sangue através do sistema portal expondo suas células a nutrientes e antígenos que podem gerar uma resposta imunológica capaz de gerar danos hepáticos, como ocorre na hepatite experimental causada pelo contato com a Concanavalina A (Con A), que induz a ativação de linfócitos T CD4⁺ (*T helper*) e células de Kupffer por mecanismos Th1 e M1 responsáveis pelos danos hepáticos agudos. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito preventivo e terapêutico do licopeno contra a hepatite autoimune pela Con A. Foram testados 4 protocolos de tratamento, sendo dois preventivos com licopeno 5µM e 50µM administrados antes da Con A e dois protocolos de tratamento cujas doses de licopeno foram administradas 72h depois da indução por Con A. Todos os tratamentos com licopeno duram 7 dias com doses diárias via oral em camundongos Balb/c. Os tratamentos com 5µM de licopeno foram satisfatoriamente eficientes nos parâmetros estudados: redução do infiltrado inflamatório nas tríades portais e nos danos celulares em hepatócitos da zona lobular; redução percentual de leucócitos mobilizados na medula óssea e linfócitos T CD4 e CD8 no timo; aumentou o percentual de monócitos e macrófagos no fígado inflamado, restaurou os percentuais de galectina-3 (marcador M2). Estes dados sugerem um novo papel para o licopeno, como um fator nutracêutico capaz de desviar resposta imune Th1/M1 danosa ao fígado inflamado para resposta Th2/M2 humoral e regenerativa.

Palavras-chave: licopeno; hepatite; hepatite tóxica; concanavalina A; galectina-3

ABSTRACT

Lycopene is a carotenoid found in abundance in tomatoes and their products, being responsible for the red color in many vegetables and fruits. Its anti-inflammatory and antioxidant properties in various cell and tissue types, including the liver, has generated interest among researchers, although the molecular and therapeutic effects of lycopene and its metabolites, remains to be elucidated. The liver is a multifunctional organ that receives blood through the portal system exposing their cells to nutrients and antigens that can generate an immune response capable of generating liver damage, as in experimental hepatitis caused by contact with Concanavalin A (Con A), induces CD4⁺ T lymphocyte activation and Kupffer cells for Th1/M1 mechanisms responsible for acute liver damages. The objective of this study was to investigate the preventive and therapeutic effects of lycopene against autoimmune hepatitis defined by intravenous Con A. Four protocols were tested, two preventive methods where lycopene 5 μ M and 50 μ M were administered before Con A and two treatment protocols whose lycopene doses were administered 72 h after Con A induction. All treatments with lycopene were performed daily during 7 days with oral doses in BALB / c mice. The treatments with lycopene 5 μ M were satisfactorily efficient in the studied parameters: reduction of inflammatory infiltrate in the portal triads and cellular damage in hepatocytes of lobular zone; percentage reduction of leukocytes in bone marrow and mobilized CD4 and CD8 in thymus; increased the percentage of monocytes and macrophages in the inflamed liver, restored the percentage of galectin-3 (marker M2). These data suggest a new role for lycopene, as a nutraceutical factor able to drive immune response Th1 / M1 in the inflamed liver to Th2/M2 humoral and regenerative response.

Key-words: lycopene; hepatitis; toxic hepatitis; concanavalin A; galectin-3

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema representando a estrutura química dos carotenos.....	2
Figura2.Esquema representando estrutura química do licopeno e suas formas isoméricas.....	3
Figura 3. Sistema circulatório associado ao fígado.....	6
Figura 4. Fotomicrografias de fragmentos de fígado.....	7
Figura 5. Fotomicrografia de fígado evidenciando a tríade portal.....	8
Figura 6. Esquema representando a localização das células de Kupffer e das células estreladas hepáticas (células de Ito).....	10
Figura7. Esquema representa o Tratamento com Licopeno.....	18
Figura 8. Fotomicrografias do fígado de animais induzidos com concanavalina A.....	23
Figura 9. Fotomicrografias da zona portal do fígado de animais induzidos com concanavalina A tratados com licopeno.....	24
Figura 10. Análise do infiltrado inflamatório portal.....	25
Figura 11. Fotomicrografias da zona lobular do fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno.....	27
Figura 12. Quantificação de leucócitos e hepatócitos vacuolados no fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno.....	28
Figura13. Deposição de glicogênio no fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno.....	30
Figura 14. Dosagem de glicemia nos animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno.....	31
Figura 15. Identificação de células mieloides no fígado de animais induzidos com concanavalina A.....	32

Figura 16. Caracterização de linfócitos B e células dendríticas no fígado de animais induzidos com concanavalina A	33
Figura 17. Identificação das subpopulações de linfócitos T no fígado de animais induzidos com concanavalina A	33
Figura 18. Quantificação de leucócitos totais na medula óssea de animais induzidos com concanavalina A	34
Figura 19. Quantificação de subpopulações de linfócitos T no timo de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno	36
Figura 20. Células positivas para galectina-3 na zona periportal hepática.....	38
Figura 21. Células positivas para galectina-3 na zona lobular hepática.....	40
Figura 22. Quantificação das células positivas para galectina-3 no fígado dos animais induzidos pela concanavalina A e tratados com Licopeno.....	41
Figura 23. Esquema representando às possíveis atuações do licopeno no fígado de camundongos induzidos a hepatite por Concanavalina A.....	47

LISTA TABELAS

Tabela 1: Análise estatística de hepatócitos vacuolados na zona lobular em cada grupo experimental.....	29
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Carotenóides	1
1.2 – Licopeno	2
1.3 – Histofisiologia do Fígado.....	5
1.4 – Ações do licopeno em doenças hepáticas	10
1.5 - Modelo experimental de hepatite tóxica autoimune: Concanavalina A.....	12
1.6 - Galectina-3 x inflamação no fígado.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 - Objetivo geral	16
2.2 – Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 – Animais	17
3.2 - Indução de hepatite por Concanavalina A.....	17
3.3 – Tratamento <i>in vivo</i> com licopeno.....	17
3.4- Definição dos parâmetros inflamatórios.....	20
3.5 – Imunohistoquímica	20
3.6 - Fenótipos das células inflamatórias no fígado, timo e medula óssea por citometria de fluxo	21
3.7- Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1- Indução de hepatite por concanavalina A.....	23
4.2-Parâmetros Inflamatórios.....	24
4.3- Perfil celular no fígado, medula óssea e timo.....	31
4.4 - Galectina 3+.....	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO.....	47

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos (amarelo, laranja e vermelho) lipossolúveis encontrados em frutas e vegetais (Bendich e Olson, 1989). Biossintetizados por plantas e por alguns microorganismos. Mamíferos são incapazes de sintetizar carotenóides o que torna necessário obtê-los através da alimentação (Krinsky e Johnson, 2005). Sua quantidade no alimento pode variar devido a fatores, como a variedade vegetal, forma de cultivo, estágio de maturação, condições pós colheita, e ao modo de preparo para o consumo (Rodriguez-Amaya, 2003). A sua composição química é definida por tetraterpenóides (C_{40}) formados pela união de oito isoprenóides (C_5), exceto a bixina e crocetina, pois possuem cadeia carbônica com menos de quarenta carbonos (Bendich e Olson, 1989; Abdel-Aal e Rabalski, 2015; Hussain *et al.*, 2015). São classificados em dois grupos: carotenos e xantofilas (Stahl e Sies, 2007; 2012).

Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de instauração, por exemplo, α e β -caroteno, e licopeno (Figura 1A). Já as xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação, por exemplo, β criptoxantina, luteína e zeaxantina (Fiedor e Burda, 2014) (Figura 1B). Alguns carotenóides são precursores da vitamina A por possuírem pelo menos um anel de b-ionona com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. Entre os carotenóides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e apresenta maior atividade pró-vitamina A (Hammond e Renzi, 2013). Suas propriedades funcionais estão relacionadas à sua estrutura química formada por um longo sistema de duplas conjugadas. Este sistema é responsável pela atividade antioxidante, tanto na absorção do oxigênio *singlet* quanto nas interações com radicais livres, por interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos. No entanto a presença dessas ligações também facilita a oxidação dos carotenóides, o que provoca uma perda da coloração nos alimentos (Hernandez-Marin *et al.*, 2013; Dambeck e Sandmann, 2014).

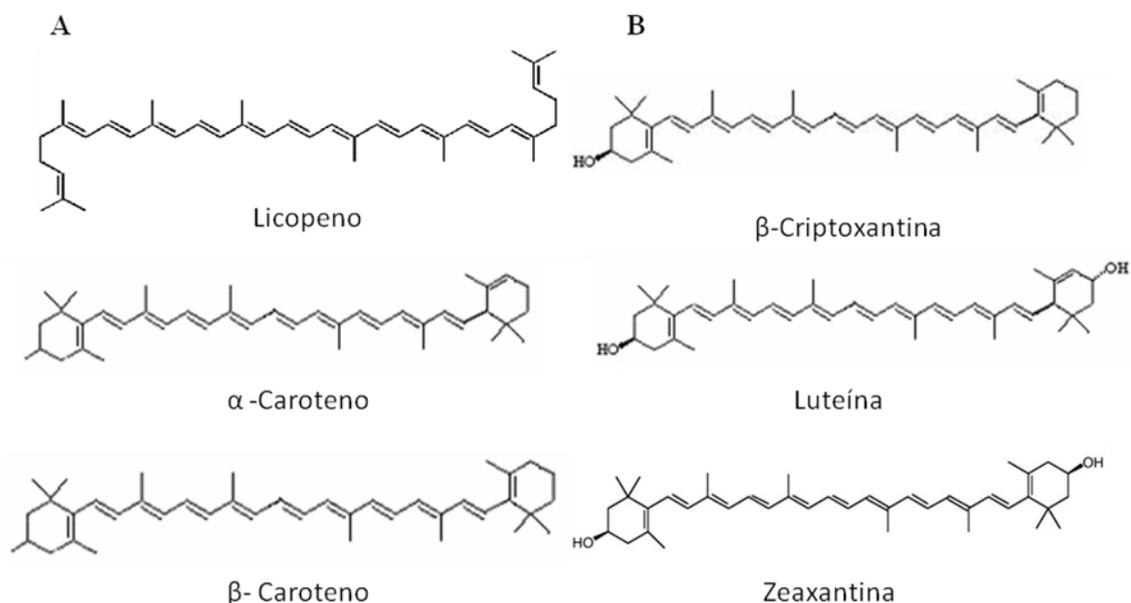


Figura 1: Esquema representando a estrutura química dos carotenos (A) e das xantofilas (B). Adaptado (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007b; a)

1.2 – Licopeno

Dentre os carotenóides não precursores da vitamina A, destaca-se o licopeno ($C_{40}H_{56}$) pigmento responsável pela coloração avermelhada à rosada em diversos vegetais. As principais fontes são o tomate, goiaba vermelha, melancia, mamão e pitanga (Story *et al.*, 2010). Sua estrutura acíclica e simétrica caracterizada por quarenta carbonos dispostos em onze duplas ligações conjugadas e duas duplas não conjugadas possibilita as formas isoméricas *trans* e *cis*, sendo a forma isomérica *all-trans* primária encontrada nos alimentos (Figura 2A). Entretanto, pode sofrer mono ou poli-isomerização pela luz, energia térmica ou reações químicas para a forma isomérica *cis*, extremamente bioativa (Rao, 2002; Khoo *et al.*, 2011) (Figura 2B).

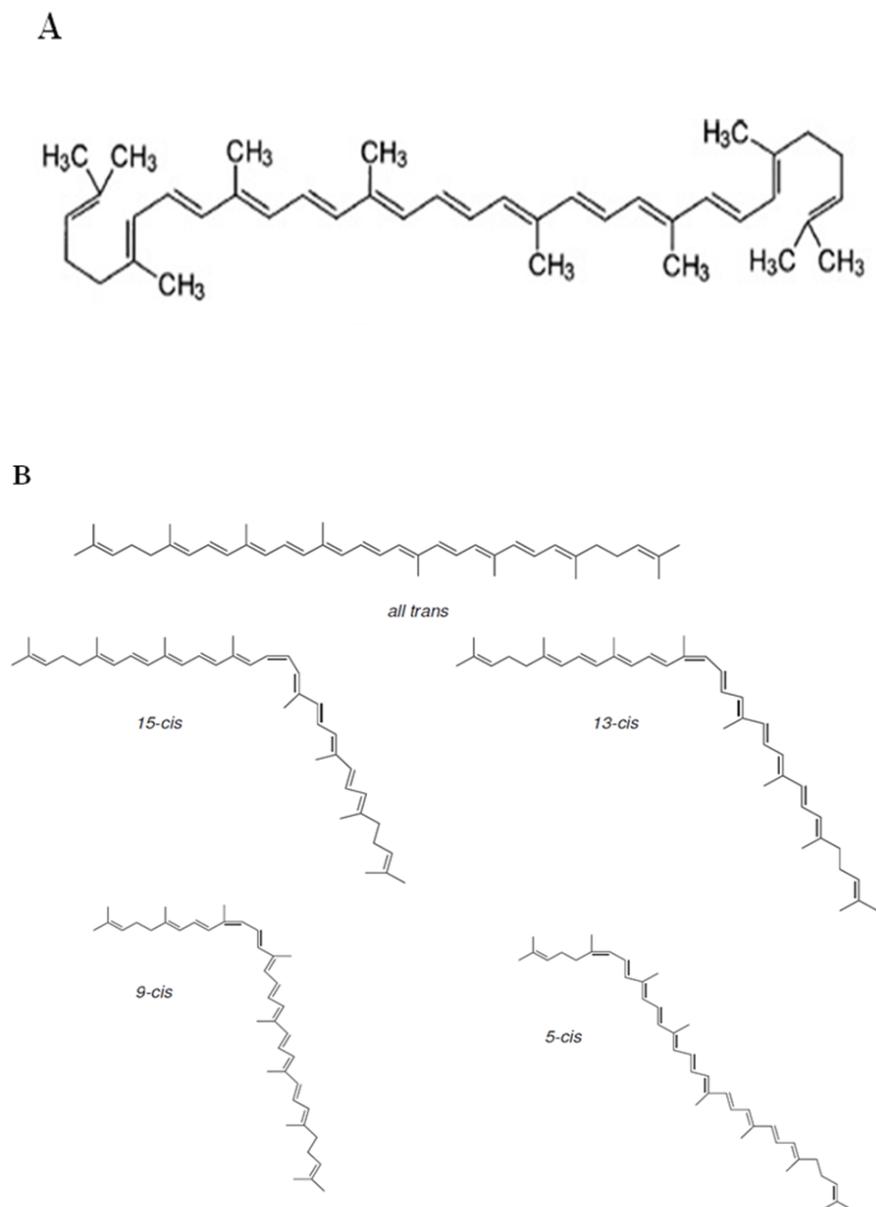


Figura 2: (A) Estrutura química do licopeno. (B) Formas isoméricas *All-trans* e *Cis* do licopeno (Agarwal *et al.*, 2001).

A casca dos alimentos fonte é onde encontramos a maior quantidade de licopeno, e aumenta conforme o amadurecimento. Visto que o sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo responsável pela coloração vermelha quando esse sistema conjugado aumenta, a cor também se intensifica (Rodríguez-Amaya, 2003). Alimentos processados geralmente possuem maiores níveis dos que encontrados no alimento cru. O efeito térmico torna-

se importante, pois provoca o rompimento de sua membrana proporcionando a conversão da forma *trans* para a forma *cis*. Fatores como matriz alimentar, quantidade e tipo de gordura dietética, fibra alimentar, interações entre carotenóides e o processamento que o alimento fonte de licopeno for submetido podem interferir em sua biodisponibilidade (Agarwal *et al.*, 2001; Rao, 2002; Rodriguez-Amaya, 2003).

O licopeno proveniente da dieta é incorporado às micelas de gordura ingerida e absorvido por difusão passiva pela mucosa intestinal. Saindo dos enterócitos é carregado por quilomícrons, que sofrem ação de lípases. Através da corrente sanguínea, são distribuídos passivamente por vários órgãos e tecidos, dentre eles, adrenais, rins, células adiposas, baço, pulmão, órgãos reprodutores. O licopeno pode acumular-se no fígado ou ser envolvido por proteínas de densidade muito baixa (VLDL) e retornar ao sangue (Ma *et al.*, 2016; Martí *et al.*, 2016).

As propriedades antiinflamatórias e antioxidantes do licopeno têm gerado interesse em pesquisadores, devido à capacidade protetora contra doenças humanas associadas com estresse oxidativo e inflamação. Entretanto, os efeitos moleculares e terapêuticos do licopeno, bem como dos seus metabólitos, permanece a ser elucidado. Considerando suas propriedades antioxidantes, o licopeno pode ser considerado um potente seqüestrador do oxigênio, comparativamente mais potente que a maior parte dos outros carotenóides plasmáticos, sendo duas vezes mais potente que o β -caroteno para neutralizar a ação do oxigênio (Di Mascio *et al.*, 1989). Além de proteger contra danos oxidantes, o licopeno pode estimular várias funções celulares do sistema imunológico (Rodrigues *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Murillo e Fernandez, 2016; Piña-Zentella *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

O metabolismo do licopeno inclui clivagem enzimática e reações químicas capazes de gerar um conjunto de licopenoides. Modelos experimentais murinos indicam que carotenóides precursores da vitamina A são clivados pela enzima caroteno 15,15-oxigenase (CMO1). O licopeno diferente dos demais carotenóides, pois é clivado pela enzima caroteno 9^o,10^o-oxigenase (CMO2) de modo que, quanto maior a perda da enzima CMO2, maior será a concentração de licopeno intacto no sangue. A presença ou ausência da CMO2 é capaz de gerar diferentes mecanismos de ação do licopeno no fígado. (Mein *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2010; Ip e

Wang, 2014; Ip *et al.*, 2015) Além disso, estudos sugerem que a enzima CMO1 é incapaz de reconhecer o licopeno após sofrer isomerização (Mein *et al.*, 2008; Ip e Wang, 2014).

Estudos clínicos e observações experimentais têm demonstrado que dietas enriquecidas com tomate estão correlacionadas com riscos reduzidos de cânceres em tecidos distintos (Teodoro *et al.*, 2012; Slattery *et al.*, 2013; Ilic, 2014; Takeshima *et al.*, 2014). Entretanto, dados epidemiológicos apontam para as dificuldades em concluir os efeitos quimiopreventivos dependentes de licopeno. Em doenças não-tumorais, licopeno tem sido pouco estudado. Um órgão-alvo importante nos modelos experimentais não-tumorais é o fígado.

1.3 – Histofisiologia do Fígado

O fígado é um órgão multifuncional cujas funções estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, e proteínas; armazenamento de vitaminas e sais minerais; produção de componentes da cascata de coagulação; modificação, remoção ou excreção de fármacos, hormônios e outras substâncias (Ito e Adachi-Akahane, 2013).

Anatomicamente, localiza-se na parte superior direita da cavidade abdominal, abaixo do diafragma, protegido pelas últimas costelas. Em humanos há quatro lobos: direito, esquerdo, caudado e o quadrado. Na parte inferior do fígado (hilo hepático), localizam-se a artéria hepática, um ramo do troncocelíaco, que fornece 20 a 25% do sangue oxigenado, e a veia porta hepática que transporta sangue do trato digestivo, pâncreas e do baço (Juza e Pauli, 2014). No interior do fígado, tais vasos se ramificam em uma complexa rede de capilares sanguíneos sinusoidais que contata cada célula do parênquima hepático. Os sinusóides convergem para uma veia central (centrolobular) e as veias centrolobulares convergem para formar as veias sublobulares, e o sangue retorna pela veia cava inferior seguidas das coletoras e pelas veias hepáticas (Figura 3).

Em camundongos, o fígado se localiza na porção superior ligeiramente à direita do abdome, com uma face em contato com diafragma onde se encontra aderida por ligamentos triangulares, coronários e falciformes, e outra face revestida por células mesoteliais (Percy e Barthold, 2007). Em particular camundongos apresentam lobação hepática com número variável quando comparadas aos humanos e a outros roedores (Nickel, 1979; Percy e Barthold, 2007). Entretanto em aspectos histofisiológicos são semelhantes (Diaconescu *et al.*, 1966).

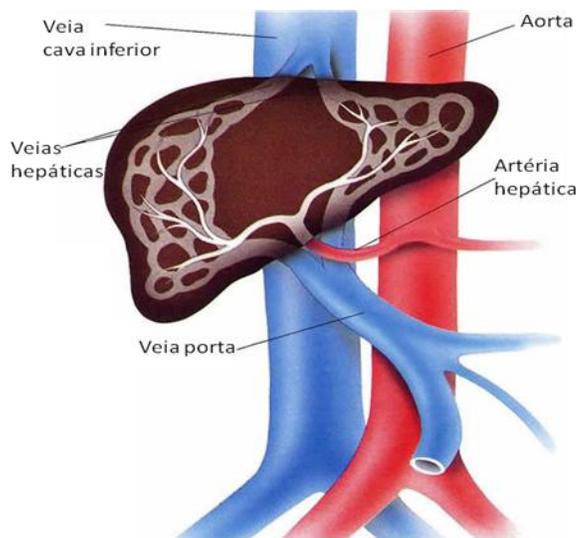


Figura 3: Sistema circulatório associado ao fígado. Adaptado de www.medicallywiseinfo.com.

Em termos histológicos, o fígado está envolto pela cápsula de Glisson (membrana conjuntiva fibrosa) e pelo peritônio na região em contato com o diafragma. Esta cápsula conjuntiva invade o parênquima formando septos que subdividem o fígado em estruturas funcionais denominadas lóbulos hepáticos clássicos e ácinos hepáticos, de acordo com os aspectos morfológicos e funcionais do fígado. Os lóbulos hepáticos clássicos tem uma forma hexagonal centralmente marcada pela veia centrolobular envolvida por cordões de células hepáticas (hepatócitos) em contato direto com as ramificações da veia porta, da artéria hepática e dos canais biliares, componentes da tríade portal presentes nos vértices de cada lóbulo. As ramificações da veia porta e da artéria hepática se fundem aos sinusóides rodeados de hepatócitos e convergem na veia centrolobular, considerada o eixo morfológico destes lóbulos (Figura 4A).

Os ácinos hepáticos são as unidades funcionais do fígado caracterizadas pela massa do parênquima dependente do suprimento sanguíneo através do sistema porta. A zona 1 (periportal), proximal ao espaço porta é a primeira a receber sangue com alto conteúdo de oxigênio, insulina e glucagon, tem alta taxa metabólica, e é a primeira a mostrar sinais de regeneração. A zona 3 (centrilobular), proximal às veias hepáticas terminais, recebe sangue por último e está mais

sujeita a sofrer necrose em situações de hipóxia. Na zona 2 (mediolobular), o sangue chega com conteúdo intermediário de oxigênio e outros nutrientes (Kierszenbaum, 2008) (Figura 4B).

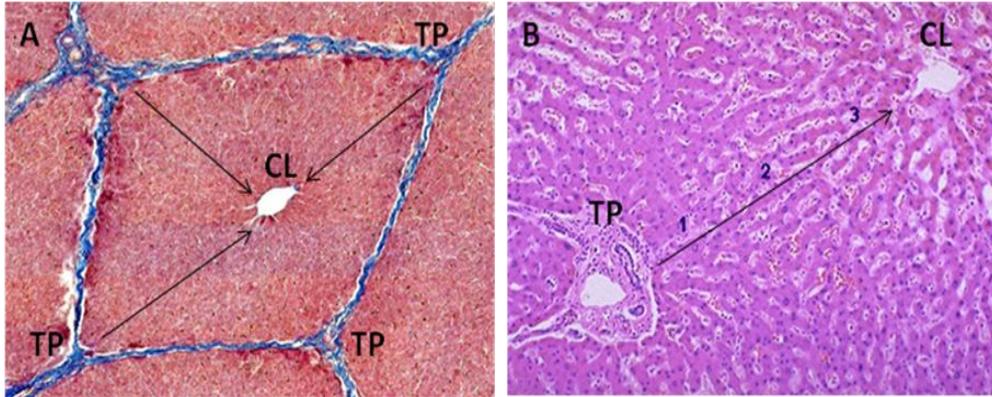


Figura 4: Fotomicrografias de fragmentos de fígado. A) Fragmento corado com tricrômico de Mallory evidenciando um lóbulo hepático delimitado por fibras de colágeno (azul) distribuídas pelos septos interlobulares (fonte: www.vetmed.vt.edu do College of Veterinary Medicine – University of Virginia – Maryland). TP = tríade portal; CL= veia centro-lobular (CL). (B) Fragmento corado com hematoxilina e eosina contendo as zonas 1, 2 e 3 de um ácino hepático, caracterizado pelo espaço existente entre uma tríade portal e uma veia centro-lobular. As setas representam o movimento de dispersão do sangue entre os sinusóides hepáticos. Fonte: <http://library.med.utah.edu/> (University of Utah). Aumento: A = 100x e B = 200x.

Os três componentes teciduais da região portal do fígado (tríade portal) são um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar. Esta região histológica fica localizada na periferia dos lóbulos hepáticos clássicos onde existe uma massa de tecido conjuntivo colágeno de sustentação (Junqueira e Carneiro, 12^a edição, 2013). Na microscopia óptica, os vasos sanguíneos são identificados pelo epitélio simples pavimentoso de revestimento (endotélio) enquanto os ductos biliares são revestidos por um epitélio cubóide e transporta bile até a vesícula biliar (Figura 5).

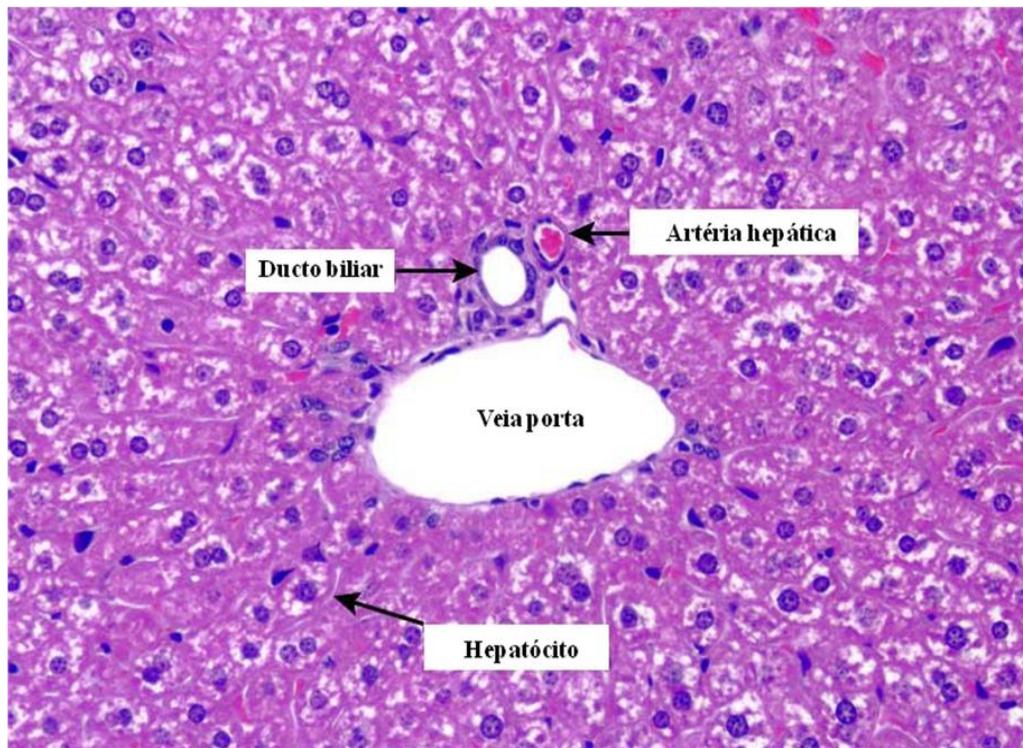


Figura 5: Fotomicrografia de fígado evidenciando a tríade portal. Ducto biliar revestido por epitélio simples cúbico. Ramos da artéria hepática e da veia porta revestidos por epitélio pavimentoso simples (endotélio). Um hepatócito apontado revela sua organização na forma de cordões celulares. Coloração hematoxilina e eosina. Aumento = 400x. Adaptado da fonte: <http://www.vetmed.wsu.edu/> (Washington State University).

Os hepatócitos são células poliédricas com diâmetro variando de 20-30 μm e cada célula possui um ou dois núcleos arredondados com um ou dois nucléolos evidentes. Em termos funcionais, são consideradas células extremamente versáteis, incluindo a síntese de diversas proteínas plasmáticas para exportação, como albumina, protrombina, fibrinogênio e lipoproteínas, além da bile secretada nos canalículos biliares. O encontro de dois hepatócitos delimita um canalículo biliar, onde a bile flui na direção inversa do sangue, do centro lobular para a sua periferia, onde adentra nos ductos biliares. Estes ductos gradualmente aumentam de diâmetro e se fundem, dando origem ao ducto hepático. No citoplasma dos hepatócitos, agregados de glicogênio estão frequentemente associados ao retículo endoplasmático liso e este estoque serve de reserva de glicose para o organismo (Junqueira e Carneiro, 12^a edição, 2013).

Alem dos hepatócitos, outras células estão localizadas no fígado e participam da histofisiologia deste órgão, como as células de Kupffer (macrófagos) e as células estreladas hepáticas (células de Ito). As células de Kupffer residem nos interior dos sinusóides e servem de sentinelas incorporando moléculas dispersas no sangue circulante. Produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, independente de estímulos estranhos ao fígado, contribuindo para regulação fisiológica deste órgão. Também estão correlacionados com danos hepáticos agudos induzidos por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e hipercoagulopatias durante hepatite induzida por concanavalina A (Tsutsui e Nishiguchi, 2014).

As células de Ito constituem aproximadamente 10% das células hepáticas e sobcondições fisiológicas exibem uma elevada capacidade de estocar vitamina A, na forma de retinóis em gotículas lipídicas. Na forma quiescente, as células estreladas hepáticas estão localizadas no espaço de Disse, um espaço definido entre os hepatócitos e as células endoteliais sinusoidais (Geerts, 2001). Em condições patológicas, surgem os miofibroblastos. Embora a principal fonte destas células seja a diferenciação das células estreladas hepáticas, alguns autores identificaram outras fontes, incluindo transição epitélio-mesenquimal (Kalluri e Neilson, 2003) e origem mesenquimal (Asahina *et al.*, 2009). De fato, os miofibroblastos se ativam e proliferam em respostas a agressores teciduais e são consideradas as principais responsáveis pela fibrose hepática devido à capacidade elevada em produzir componentes de matriz extracelular, como colágeno (Xu *et al.*, 2014).

Também considerados residentes no fígado, os linfócitos compõem o tecido hepático principalmente na forma de células NK (*Natural Killer*) que expressam marcadores determinantes da linhagem NK e receptores de células T (TCR), e por isso, considerados linfócitos T NK. Tais células produzem elevadas quantidades de citocinas pró e anti-inflamatórias após ativação do TCR (Santodomingo-Garzon e Swain, 2011), são excepcionalmente abundantes quando comparadas com outros órgãos e estão localizados nos sinusoides e no espaço de Disse (Tsutsui e Nishiguchi, 2014) (Figura 6).

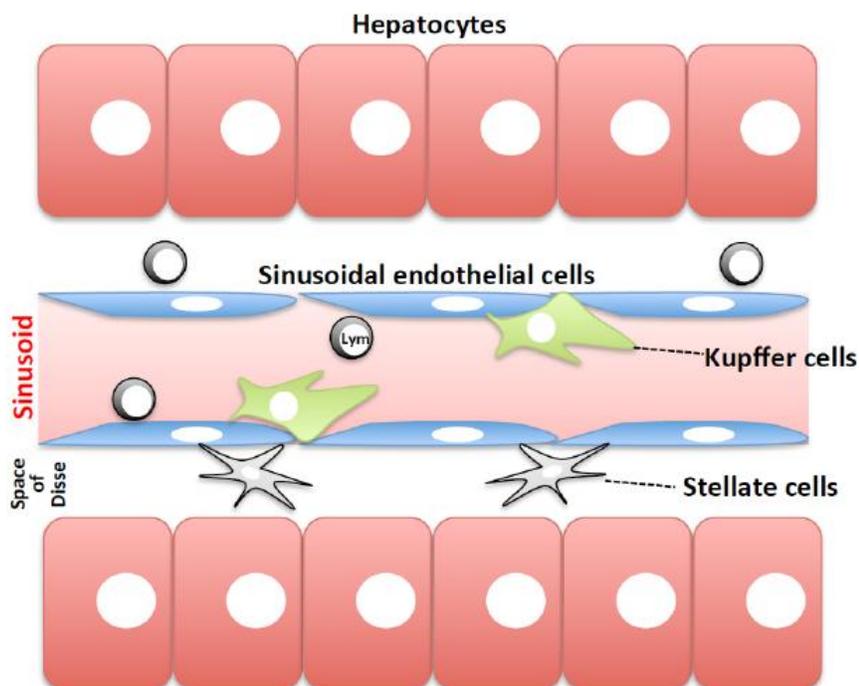


Figura 6: Esquema representando a localização das células de Kupffer e das células estreladas hepáticas (células de Ito). As células de Kupffer habitam os sinusóides enquanto as células de Ito preenchem o espaço de Disse. Lym representa células NK, células TNK, e outros linfócitos que habitam o sinusóides (Tsutsui e Nishiguchi, 2014).

Em relação ao licopeno, o fígado pode ser um dos responsáveis pelo equilíbrio tecidual e sérico dos seus isômeros cis/trans. Teodoro e colaboradores demonstraram que as células estreladas hepáticas (células de Ito) estocam e isomerizam licopeno de forma saturável. (Teodoro *et al.*, 2009). Vale ressaltar que as células de Ito estão localizadas no espaço de Disse com função relacionada ao armazenamento de vitamina A sob a forma de retinol, mas também participam das respostas inflamatórias hepáticas quando diferenciam em miofibroblastos e passam a sintetizar e depositar colágeno I e III no tecido, tipicamente encontrados na fibrose hepática (Novo *et al.*, 2014).

1.4 – Ações do licopeno em doenças hepáticas

Uma substância pode ser diretamente hepatotóxica ou transformada em um metabólito tóxico impedindo a depuração pelo tecido hepático. Assim, ocorre um aumento gradativo na

concentração do produto, tornando o tecido susceptível a lesão. O desenvolvimento da lesão é gerado por vários mecanismos de agressão: ligação covalente a estruturas celulares, peroxidação lipídica, reações de oxidação, depleção de glutathiona. Agressões celulares podem resultar alterações mitocondriais, alterações no citoesqueleto celular ou alterações da homeostase iônica que podem causar uma intensa resposta imune celular contra componentes do parênquima hepático, caracterizando uma resposta autoimune, neste caso. Em resumo, há uma resposta inflamatória desencadeada pela resposta tecidual que resulta na perda funcional do órgão (Srivastava *et al.*, 2010). Recentemente, inúmeros autores têm direcionado seus estudos para interferir na resposta inflamatória local, no fígado, com o intuito de controlar os eventos mais agressivos relacionados aos danos hepáticos. Nesse contexto, o licopeno surge como uma das moléculas propostas com potencial terapêutico.

Os efeitos do licopeno têm sido estudados em doença de fígado gorduroso não-alcoólica, a principal forma de doença crônica prevalente em adultos e crianças com sobrepeso e/ou obesas (Ip e Wang, 2014). Uma das fases desta doença consiste na deposição de lipídios no citoplasma de hepatócitos (esteatose) e progride para uma forma mais agressiva e mais severa caracterizada por uma intensa resposta inflamatória (esteato-hepatite), freqüentemente correlacionada com uma maior probabilidade de desenvolver cirrose e estimular eventos-chaves na carcinogênese hepática (Berlanga *et al.*, 2014).

Durante a esteato-hepatite, as análises histológicas do fígado revelam hepatócitos danificados (“inchaço” e morte celular), infiltrado de células inflamatórias e deposição de colágeno iniciando o processo de fibrose (Cohen *et al.*, 2011). De fato, evidências apontam que a progressão de esteatose para esteato-hepatite e hepatocarcinoma envolve um processo bastante complexo, desde danos hepáticos iniciais seguidos de inflamação, ciclos de necrose e regeneração (Sun e Karin, 2012). Neste contexto, Wang e colaboradores demonstraram que a suplementação com extrato de tomate na dieta de roedores, em comparação com o licopeno purificado, preveniu inflamação hepática induzida por dieta rica em gordura (Wang *et al.*, 2010).

Como o fígado recebe sangue através do sistema portal, expõe suas células não só a nutrientes, mas também antígenos, componentes bacterianos e metabólitos circulantes. Assim, está propenso a contaminações sistêmicas que induzem uma resposta inflamatória e imunológica

(Crispe, 2009). Em hepatites, por exemplo, caracteriza-se uma inflamação no fígado de origem tóxica ou infecciosa. Agentes patogênicos como vírus tipo B ou C podem colonizar o parênquima hepático gerando uma resposta imune capaz de interromper e evitar sua progressão. Entretanto, estes eventos inflamatórios e imunológicos estão relacionados ao processo de fibrose hepática, cirrose ou carcinoma hepatocelular (Racanelli e Rehermann, 2006; Cui *et al.*, 2014). Para combater esses agentes o fígado produz citocinas, quimioquinas, e proteínas de fase aguda. Neste processo, ocorre ativação de células residentes e recrutamento de leucócitos (Boltjes *et al.*, 2014). Quando estes estímulos patogênicos se tornam crônicos, a resposta inflamatória desencadeia fibrose e possivelmente cirrose (Bi *et al.*, 2014).

Pacientes com hepatite possuem altos níveis de espécies reativas de oxigênio e baixos níveis de antioxidantes em seus fígados. O licopeno tem sido apontado como um potente atenuador do estresse oxidativo (Kurcer *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011; Sheik Abdulazeez e Thiruvengadam, 2013; Suzuki *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o licopeno e seus metabolitos são capazes de atuar em inibidores nucleares, de transcrição, e em receptores específicos do fígado promovendo alterações fisiológicas em cadeia (Ip e Wang, 2014; Tan *et al.*, 2014). Em particular o licopeno inibe o CYP2E1, uma isoforma do citocromo P450, responsável pela conversão de certos xenobióticos em carcinógenos. Além de induzir enzimas de fase I e fase II (Bernal *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2014). Evidências sugerem que o licopeno pode afetar vias de regulação e sinalização celular independentes das funções antioxidantes colaborando para redução da hepatocarcinogênese (Ip *et al.*, 2015; Piña-Zentella *et al.*, 2016; Yefsah-Idres *et al.*, 2016). Entretanto alguns mecanismos envolvidos nestes processos ainda permanecem desconhecidos (Yefsah-Idres *et al.*, 2016)

1.5 - Modelo experimental de hepatite tóxica autoimune: Concanavalina A

Hepatite tóxica é uma lesão hepática causada por inalação, ingestão ou administração parenteral de agentes farmacológicos ou químicos (Larrey, 2000). O fígado é um órgão central no metabolismo destas substâncias, pois seu objetivo é realizar a biotransformação para excreção renal ou biliar através de duas reações. A reação I envolve complexos Citocromo C redutase e Citocromo P450 que realizam principalmente reações de hidrólise, oxidação e redução; A reação

II envolve a conjugação do fármaco ou do metabólito com pequenas moléculas endógenas, de forma a aumentar a sua polaridade (Park *et al.*, 2005; Antoine *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2010). Em ambos os casos, embora os mecanismos celulares e moleculares estejam bem descritos, não há consenso na forma de prevenir as lesões hepáticas quando o fígado deve ser submetido a algum destes produtos hepatotóxicos. Há um crescente interesse pelo estudo dos mecanismos que provocam a lesão hepática, pois reconhecendo tais mecanismos permitirá novas formas de prevenção e tratamento. No entanto as doenças de fígado geralmente são diagnosticadas em estágios avançados (Siegel e Zhu, 2009). Os modelos experimentais podem elucidar mecanismos que levam às injúrias hepáticas induzidas por diferentes etiologias, tais como infecção viral e/ou metabolismo anormal.

O modelo experimental de hepatite induzida por Concanavalina A (Con A) é considerado simples, de baixo custo e reprodutível. Além disso, este modelo experimental é adaptável a diferentes parâmetros de doenças clínicas, como as hepatites fulminante, viral e hepatotóxica, além de doenças hepáticas alcoólicas (Jaeckel *et al.*, 2011). A Con A é uma lectina extraída da *Canavalia brasiliensis*, possui forte atividade de aglutinação e contem sítios de ligação de glicídios específicos, como α -D-manose, α metil-D-manopiranosido, α -D-glicose e metil- α -D-glicose, indispensáveis para a indução da lesão do fígado pela lectina (Volarevic *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). A principal atividade consiste na ativação de linfócitos T CD4⁺ (T helper) gerando um aumento na secreção de citocinas que favorecem a lesão hepática. Em paralelo, ocorre lise de células-alvo mediada por linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), que para alguns autores é um mecanismo secundário (Xu *et al.*, 2010).

Estudos *in vivo* indicam que 15 minutos após administração intravenosa, Con A se liga a células endoteliais sinusoidais e 4 horas depois começa a ativar as células de Kupffer. Em seguida, células T CD4⁺ reconhecem o MHC de classe II e os receptores de células T interagem com as células de Kupffer modificadas por Con A, sendo então ativadas, desencadeando o processo inflamatório (Chang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014). Os danos hepáticos agudos induzidos pela Con A são gerados pelas células de Kupffer, pois tais células iniciam uma trombose intrasinusoidal patogênica em colaboração com as células endoteliais sinusoidais (Kato *et al.*, 2013). Além disso, estão envolvidos com o desenvolvimento de fibrose

hepática, pois produzem TGF β 1 e outras citocinas que ativam miofibroblastos produtores de colágeno I, normalmente um tipo celular ausente no fígado normal, porém frequentemente associados a fibrose hepática (Xu *et al.*, 2014).

Após tratamento com Con A o licopeno foi capaz de estimular atividade de linfócitos provenientes das placas de Peyer (tecidos linfóides associados ao intestino delgado), aumentando a produção de IL-2 e interferon-gama (INF- δ) um potente ativador de linfócitos T (Yamaguchi *et al.*, 2010). Baseando-se nas propriedades já citadas do licopeno e considerando a hepatite como ponto inicial do hepatocarcinoma.

1.6 - Galectina-3 x inflamação no fígado

A galectina-3 é uma lectina animal que possui dois domínios funcionais distintos: uma região carboxi-terminal, contendo seu domínio funcional de reconhecimento aos carboidratos e uma região amino-terminal, enriquecida com seqüências repetidas de tirosina, prolina e lisina, gerando um domínio R (Herrmann *et al.*, 1993), responsável pela sua auto-associação e a ligantes não-glicídicos (Massa *et al.*, 1993). Pode está presente tanto em compartimentos intracelulares quanto extracelulares (Moutsatsos *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1993). No espaço extracelular associa-se a carboidratos e participa de interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Perillo *et al.*, 1998). No citoplasma, regula o ciclo celular durante as fases G1 e G2/M, controlando o crescimento de populações celulares através do seu efeito anti-apoptótico em determinadas células, e ainda participa do processamento pós-transcricional de RNAm (Shen e Fan, 2013). Sua localização nuclear sugere está relacionada à regulação da transcrição de alguns genes, como IL-1 e IL-5 (Moutsatsos *et al.*, 1987; Liu e Rabinovich, 2005).

As principais células produtoras de galectina-3 são monócitos e macrófagos (Liu *et al.*, 1995), células endoteliais (Lotan *et al.*, 1994) células epiteliais renais (Bao e Hughes, 1995), intestinais (Lotz (Lotz *et al.*, 1993) e mamárias (Castronovo *et al.*, 1996). Macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato também apresentam maiores concentrações de galectina-3 intra e extracelulares (Sato e Hughes, 1994). Aspectos estruturais da molécula são fundamentais em

diversos processos biológicos onde atua como proliferação, diferenciação, adesão, migração, ativação e morte celular, além da progressão ou regressão tumoral.

No fígado a galectina-3 está diretamente relacionada com processo fibrótico (Abdel-Aal e Rabalski, 2015). Em modelo experimental de esteato- hepatite não alcoólica sua ausência gerou lesões mais graves (Iacobini *et al.*, 2011). É preferencialmente produzida por células de kupffer e as células estreladas hepáticas durante a diferenciação em miofibroblastos (Kong, 2011). Durante resposta imune mediada por macrófagos e células T, galectina-3 direciona respostas Th2 e M2 (Jia *et al.*, 2013). Em contrapartida, o modelo experimental de hepatite induzida por Con A promove uma resposta imune Th1 e M1 (Wang *et al.*, 2012).

Esse projeto tem como objetivo avaliar o potencial preventivo e terapêutico do licopeno em hepatites, principalmente correlacionando seu consumo com mecanismos que regulam resposta inflamatória diante de lesões no parênquima hepático. Em resumo, os dados obtidos neste trabalho revelam um papel imunomodulador do licopeno modificando a resposta M1 induzida pela Con A, desviando a resposta para um perfil M2 com maior quantidade de células positivas para galectina-3 e melhores condições histológicas gerais nos animais em tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

- Investigar o efeito preventivo e terapêutico do licopeno contra a hepatite autoimune medicamentosa gerada pela Concanavalina A

2.2 – Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil da /resposta inflamatória no fígado 72h após a injeção intravenosa de Concanavalina A.
- Avaliar os tipos de células do sistema imunológico presentes no fígado inflamado por Imuno histoquímica 72h após a injeção de concanavalina A.
- Tratar os animais de forma preventiva, com doses diárias de licopeno (5 μ M e 50 μ M) via oral, desde uma semana antes da injeção intravenosa de concanavalina A.
- Tratar a inflamação com diferentes concentrações de licopeno (5 μ M e 50 μ M) *in vivo* uma semana depois da instalação da inflamação e analisar os parâmetros histológicos
- Investigar se o licopeno interfere com atividade M1 macrofágica no modelo da hepatite induzida pela Con A.
- Investigar os fenótipos das células inflamatórias no fígado, timo e medula óssea por citometria de fluxo nos animais tratados com diferentes concentrações de licopeno (5 μ M e 50 μ M) *in vivo* uma semana depois da instalação da inflamação.
- Avaliar a presença de galectina 3+ nos animais tratados com licopeno (5 μ M e 50 μ M) de forma preventiva e terapêutica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados 45 camundongos Balb/c com idade entre 2 e 4 meses obtidos das colônias mantidas na Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil). As manipulações nestes animais foram realizadas de acordo com as normas institucionais específicas para o uso e cuidado de animais de laboratório (protocolo aprovado: DAHEICB 009, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil). Na idade experimental, os animais foram sacrificados numa câmara CO₂ apropriada durante 10 segundos. Após assepsia com solução alcoólica (etanol 70%), foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos necessários para os experimentos.

3.2 - Indução de hepatite por Concanavalina A

Os camundongos foram induzidos à hepatite por injeção intravenosa de Concanavalina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 20mg /kg em volume final de 100 µL na veia caudal. As amostras de sangue e fígado foram analisadas 72hs após a injeção de con A. Nos grupos controles foram injetados PBS (Phosphate-Buffered Saline), veículo, pH 7.4, no mesmo volume final (100µL).

3.3 – Tratamento *in vivo* com licopeno

Os animais foram tratados com licopeno WS (water soluble) 10% fornecido pela Roche (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) dissolvido em água destilada a 50°C. Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução com licopeno foi administrada por gavagem oral nas concentrações 5µM e 50 µM. Animais controles receberam o mesmo volume de água destilada (veículo) e foram considerados controles experimentais (Figura 7).

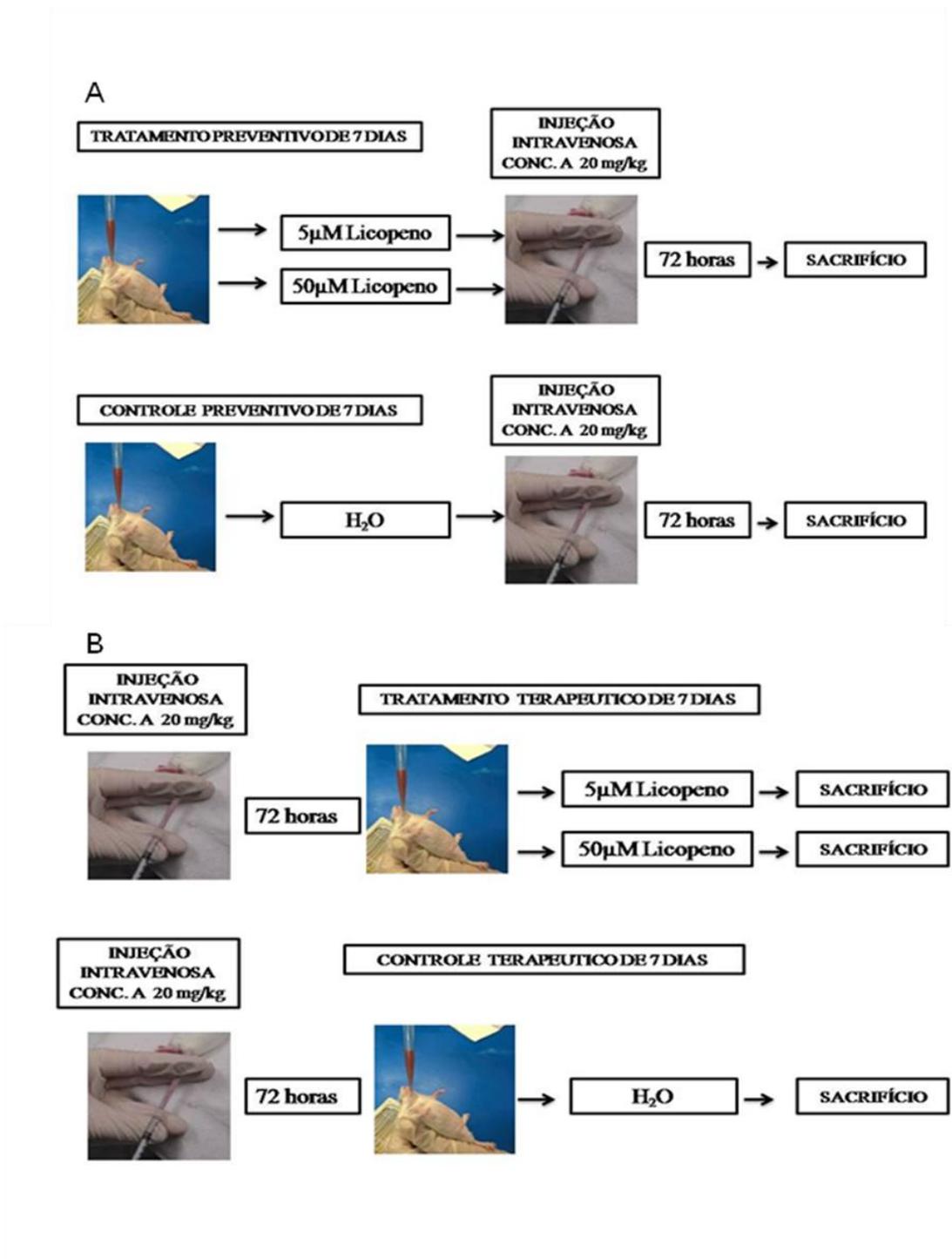


Figura 7 (A) Esquema representa o Tratamento preventivo e controle preventivo realizados por 7 dias consecutivos para posterior indução de hepatite e sacrifício.(B) Esquema representa Tratamento terapêutico e controle terapêutico de 7 dias consecutivos após indução de hepatite por concavalina A.

Após sacrifício, os fígados e a vesícula biliar foram extraídos cuidadosamente com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados em estufa a 100°C por no mínimo 4 horas. Fragmentos do fígado medindo cerca de 1mm² foram obtidos com lâminas de bisturi. Em seguida, os fragmentos hepáticos foram imediatamente lavados em PBS, pH 7.4, em temperatura ambiente, para retirar o excesso de sangue. Subseqüentemente, os fragmentos foram fixados em formol 10% (diluído em PBS, pH 7.4). Os tecidos desidratados em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 100%, 100%) num período de 30 minutos cada. Posteriormente submetidos à clarificação por Xilol, 2 vezes 30 minutos cada. A inclusão em parafina com 3 % de cera de abelha foi efetuada em duas incubações durante 30 min cada a 60 °C. Os fígados foram clivados e incluídos transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco. Foram feitos em média 5 cortes de 4 µm de espessura no micrótomo (Leica Geosystems RM 2125RT, USA). Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas, e mantidas em estufa a 60° C overnight.

a) Hematoxilina e eosina: Depois de serem retiradas da estufa, as amostras são imersas em xilol, por 3 vezes, 15 minutos cada a fim de retirar a parafina. Posteriormente é necessário hidrata-las nos reagentes (álcool 100%, 95%, 70% e água destilada) por 5 minutos cada. Subseqüentemente serão coradas com hematoxilina de Harris (filtrada) por 15 min, depois lavadas em água corrente por 3 minutos. Passadas em álcool clorídrico 1%, e deixadas em água destilada por 5 minutos. Em seguida coradas com solução de eosina 1% por 3 minutos. Realizadas essas etapas mergulham-se 3 vezes as lâminas em água acética. Depois será necessário desidratar os cortes histológicos mergulhando-as em concentrações de álcool (95%,100%, 100%) 5 vezes em cada concentração. E por fim clarificadas com xilol por 3 vezes, 5 minutos cada.

b) Coloração PAS (Ácido Periódico-Schiff ou PAS): Tem a finalidade de identificar glicogênio no citoplasma de hepatócitos. Os resíduos de glicose da peça estudada produzem aldeídos que entram em contato com o reagente de Schiff e produz uma cor púrpura-magenta. Um corante básico (hematoxilina) adequado é frequentemente usado como um corante de contraste. Geralmente é usada para distinguir diferentes tipos de doenças de estocagem de glicogênio. Brevemente, deve-se desparafinizar e hidratar os cortes com água destilada. Colocar as lâminas na solução de Ácido periódico 1% por 15 minutos. Lavar em água destilada por 5

minutos. Corar pelo Schiff (guardado na geladeira e no escuro), por 15 minutos em temperatura ambiente. Colocar em três trocas de solução sulfurosa de uso durante 5 minutos cada e desprezar após o uso. Lavar em água destilada por 4 minutos e corar pela hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Lavar em água corrente durante 5 minutos e em seguida, desidratar, clarificar e selar.

3.4- Definição dos parâmetros inflamatórios

Lâminas de fígado – Na coloração por hematoxilina e eosina, a presença de infiltrado inflamatório na tríade portal foi usada como parâmetro de inflamação portal, classicamente descrita como uma reação leucocitária ao redor dos ramos da veia porta- hepática, da artéria hepática e dos ductos biliares 24 e 72h após a injeção de concanavalina A. Os lóbulos hepáticos clássicos (veia centro-lobular como eixo morfológico) e os ácinos hepáticos (espaço entre uma tríade portal e uma veia centro-lobular) foram avaliados quanto à presença de leucócitos e distribuição de glicogênio pela coloração de PAS.

Glicemia- Após sacrifício foi extraída uma alíquota de sangue para análise da glicemia dos grupos experimentais, cuja dosagem foi realizada através do kit FreeStyle Lite (Abbott, Chicago, USA) mediante uma gota de sangue em tira reagente quantificada por glicosímetro.

3.5 – Imunohistoquímica

Cortes de 4µm foram colocadas em lâminas silanizadas STARFROST® Sakura colocados em estufa por 20 minutos. A desparafinização, reidratação e recuperação antigênica foram realizadas em 1 mL solução trilogy (Cell marque, Rocklin, USA) para 99 mL de H₂O destilada em panela a vapor a 92° C. As lâminas foram mergulhadas em dois banhos dessa solução, um de 30 e outro de 10 minutos. Após retornarem a temperatura ambiente foram lavadas em H₂O destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 30 mL de H₂O₂ para 70 mL de metanol por 20 minutos no escuro. Posteriormente as lâminas foram lavadas em por três

vezes com PBS-Tween. O bloqueio da enzima endógena foi realizado em solução de PBS/BSA (albumina bovina e azida sódica) 10% com leite desnatado 8% na proporção (1/1) durante 60 minutos em câmara própria com parafilm. Depois lavadas por três vezes com PBS- Tween.

A incubação do anticorpo anticorpos monoclonais anti-gal 3, provenientes do hibridoma M3/38 na concentração 1: 32 overnight a 4°C. Seguido anticorpo secundário biotilado: anti-rato na concentração 1:300 por 1 hora à temperatura ambiente. Havendo subsequente amplificação de sinal com estreptoavidina peroxidase (Sigma), na concentração de 1:100. Depois foram lavadas por três vezes em PBS- Tween. A revelação foi realizada com diamendazina 1:50 (DAB) e contra coradas com hematoxilina de Harris previamente filtrada. Posteriormente foi realizada a desidratação em cadeia ascendente de etanois , diafanização com dois banhos de xilol e montagem com etelan.

3.6 - Fenótipos das células inflamatórias no fígado, timo e medula óssea por citometria de fluxo

As células do fígado e do timo foram obtidas por dissociação mecânica e as células da medula óssea foram obtidas através do “flushing” da cavidade femoral. Nesta técnica, deve ser feito um movimento de expulsão das células da cavidade óssea com auxílio de agulha e seringa contendo meio de cultura. As hemácias foram lisadas com solução hipotônica tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH. 7,2) por 5 min depois centrifugadas por 10 minutos a 1200 RPM (260G). Para garantir especificidade dos anticorpos, os receptores Fc presentes na membrana de algumas células devem ser previamente saturados com a fração Fc de IgG. Esta molécula é secretada pelo clone celular 2.4G2, obtido no Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram incubadas por 10 minutos com o sobrenadante desta linhagem celulares depois centrifugadas por 10 minutos a 1200 RPM (260G). Posteriormente as células obtidas foram incubadas com os anticorpos monoclonais por 30 minutos. Células da medula óssea com anti-IgM FITC (Isotiocianato de Fluoresceína), anti-CD23 PE (Ficoeritrina), anti-B220 PERLP, anti-CD117 ACP. Timo com anti-CD8 FITC e anti-CD8 PE. Fígado anti-CD8 FITC, anti-CD4 PE, anti-B220 PERLP, anti-CD11C ACP, anti-CD11B FITC, anti-Ly6-c PE e anti-CD45 PERCP (todos da BD Bioscience, CA, USA). As

amostras foram avaliadas no citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience) através do programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.9.

3.7- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa (software) Prism Graph Pad, utilizando o teste de comparação múltipla ANOVA com pós-teste pelo método de Bonferroni. Valores de p menores que 0.05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1- Indução de hepatite por concanavalina A

Os lóbulos hepáticos clássicos (veia centro-lobular como eixo morfológico) e os ácinos hepáticos (espaço entre uma tríade portal e uma veia centro-lobular) foram avaliados quanto à presença de leucócitos após 72hs de injeção intravenosa de Con A. Fígados de animais induzidos por Con A apresentaram um infiltrado inflamatório significativo na região periportal quando comparados a fígados normais (Figura 8).

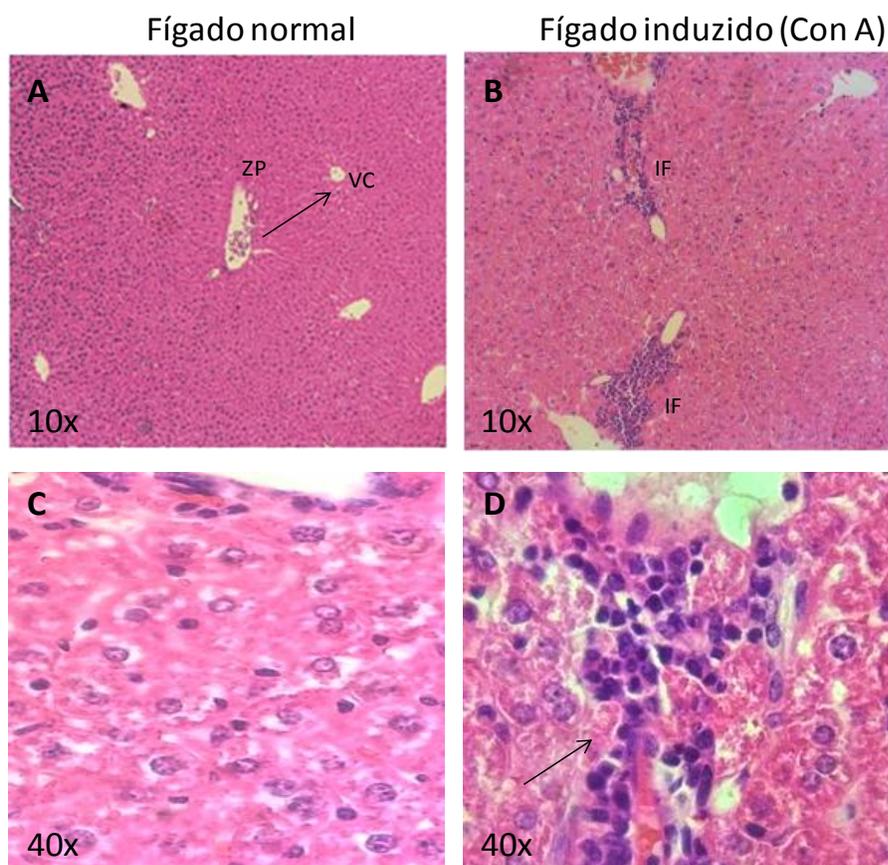


Figura 8: Fotomicrografias do fígado de animais induzidos com concanavalina A. (A) Fígado normal mostrando uma zona portal (ZP) e uma veia centrolobular (VC). A seta aponta a direção do fluxo de sangue na região lobular. (B) Fígado de animal induzido com injeção intravenosa de con A mostrando intenso infiltrado inflamatório (IF) na região periportal. (C) Imagem ampliada da região periportal de um fígado normal. (D) Imagem detalhada da região periportal de um fígado induzido por con A contendo significativo infiltrado inflamatório (seta). Coloração: Hematoxilina e eosina. Resolução: A e B, 10x. C e D, 40x. n=5 animais por grupo.

4.2-Parâmetros Inflamatórios

Diferentes condições experimentais foram testadas para avaliar os efeitos da administração oral do licopeno sobre a resposta inflamatória no fígado, gerada pela Con A. Animais induzidos com Con A preventivamente tratados com licopeno 5 μ M apresentaram infiltrado inflamatório significativamente reduzido na região periportal (Figura 9A). A administração oral de 5 μ M de licopeno iniciada 72hs após a injeção de Con A também reduziu a intensidade do infiltrado inflamatório na região periportal (Figura 9B). Por outro lado, os animais tratados de forma preventiva (Figura 9C) e terapêutica (Figura 9 D) com 50 μ M de licopeno não apresentaram alterações histológicas que indicassem um perfil inflamatório diferente na região periportal dos animais induzidos com Con A sem tratamento algum.

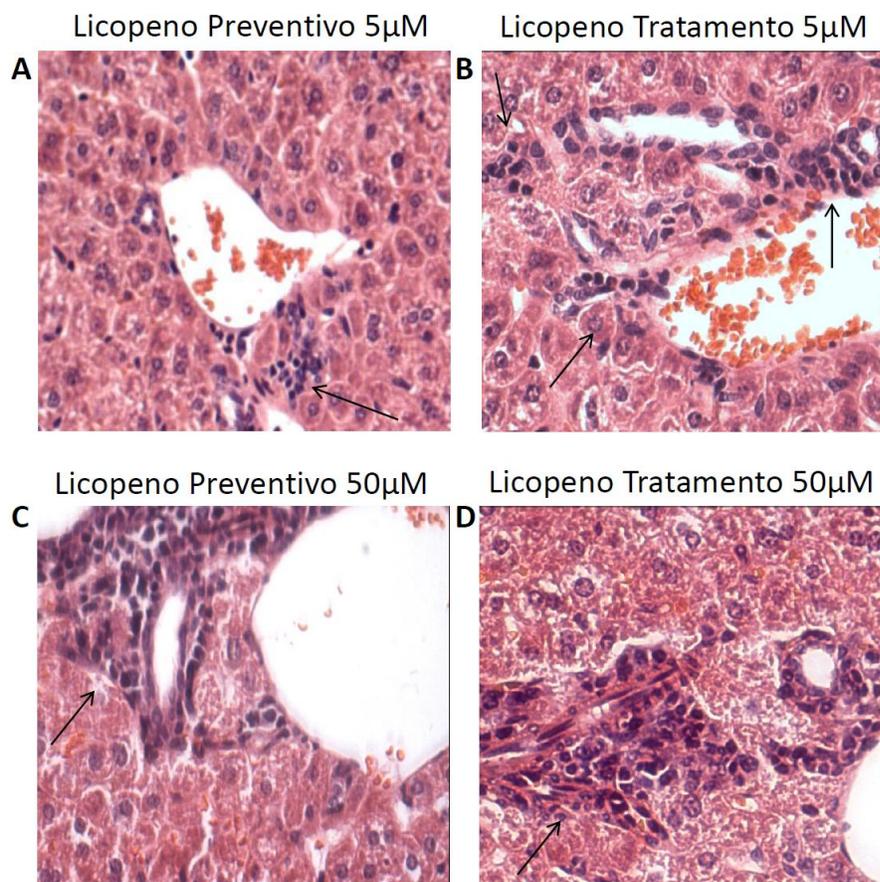


Figura 9: Fotomicrografias da zona portal do fígado de animais induzidos com concanavalina A tratados com licopeno. (A) Fígado induzido com con A preventivamente tratado com 5 μ M de licopeno oral mostra infiltrado inflamatório (IF) significativamente reduzido na região periportal (seta). (B) Fígado induzido com con A tratado com 5 μ M de licopeno oral 72h após a injeção mostra moderado infiltrado inflamatório na região periportal (setas). Os tratamentos preventivo (C) e terapêutico (D) com 50 μ M de licopeno oral não reduziram o infiltrado inflamatório na região periportal em fígados induzidos por con A (setas). Coloração: Hematoxilina e eosina. Resolução: 20x. n=5 animais por grupo.

Com o intuito de avaliar de forma quantitativa a interferência do licopeno no infiltrado inflamatório periportal, o percentual de leucócitos foi mensurado em cada situação experimental. A administração oral preventiva e terapêutica com 5 μ M de licopeno reduziu significativamente o percentual de células inflamatórias (Figura 10A). O grupo controle Con A, bem como os grupos tratados com licopeno 50 μ M, apresentou infiltrado inflamatório composto por cerca de 50% de leucócitos. A suplementação com 5 μ M de licopeno reduziu para aproximadamente 20% e 30% de leucócitos quando administrados de forma preventiva e terapêutica, respectivamente.

Outro parâmetro histológico utilizado para uma análise quantitativa da interferência do licopeno no infiltrado inflamatório periportal causado pela Con A foi mensurar o percentual de tríades portais contendo células inflamatórias em cada grupo experimental. Neste parâmetro, apenas o tratamento preventivo com licopeno 5 μ M administrado via oral foi capaz de reduzir o percentual de tríades portais com leucócitos infiltrados. Os grupos experimentais tratados preventivamente com licopeno 50 μ M, e de forma terapêutica com licopeno 5 μ M e 50 μ M não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo induzido com Con A sem quaisquer tratamentos (Figura 10B).

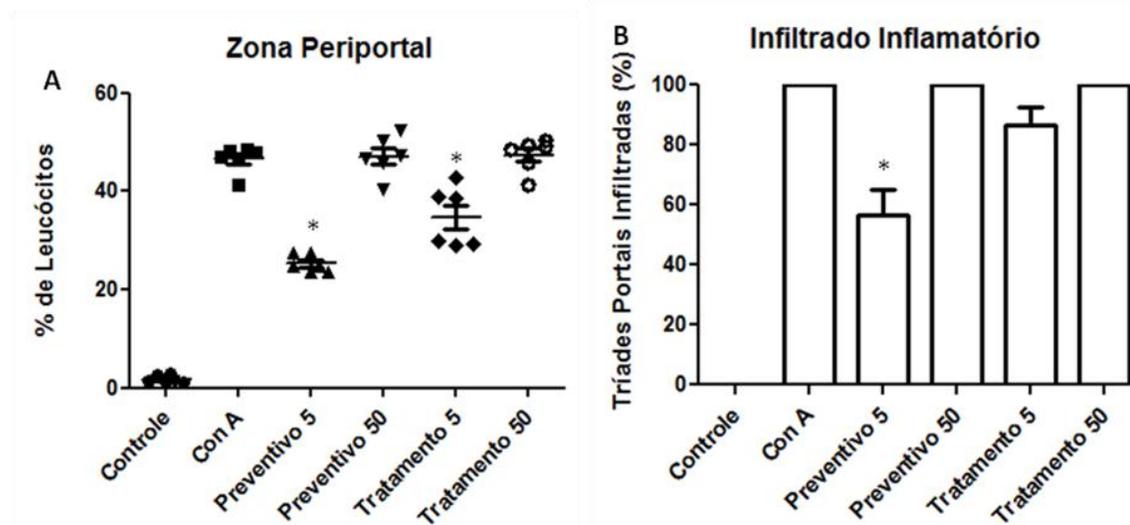


Figura 10: Análise do infiltrado inflamatório portal. (A) Percentual de leucócitos na zona periportal, indicando infiltrado inflamatório. (B) Percentual de tríades portais contendo qualquer infiltrado inflamatório. (*) Indica $p < 0.05$ em relação ao grupo con A. $n = 5$ animais por grupo.

Embora a zona portal hepática seja substancialmente afetada e estudada no modelo experimental de hepatite autoimune causada pela administração venosa de Con A, outras áreas funcionais do fígado também foram avaliadas neste trabalho. Análise histológica da zona lobular do parênquima hepático revelou lesões em hepatócitos presentes ao redor da veia centrolobular, identificados por apresentarem vacúolos citoplasmáticos indicativos de deposição lipídica, possivelmente uma fase inicial de esteatose, 72 horas depois da injeção intravenosa de Con A (Figura 11 A e B). A administração oral preventiva de licopeno 5 μ M reduziu os danos causados pela Con A relacionados aos vacúolos citoplasmáticos nos hepatócitos. Entretanto, focos de células inflamatórias foram frequentemente observados nessa região do fígado, sugerindo inflamação lobular (Figura 11C). Os animais tratados de forma terapêutica com licopeno 5 μ M apresentaram degeneração hidrópica, mas sem formação de vacúolo evidente (Figura 11D). A administração oral preventiva e terapêutica de licopeno 50 μ M não apresentou qualquer alteração significativa na deposição lipídica quando comparados com o grupo Con A (Figura 11E e 11F).

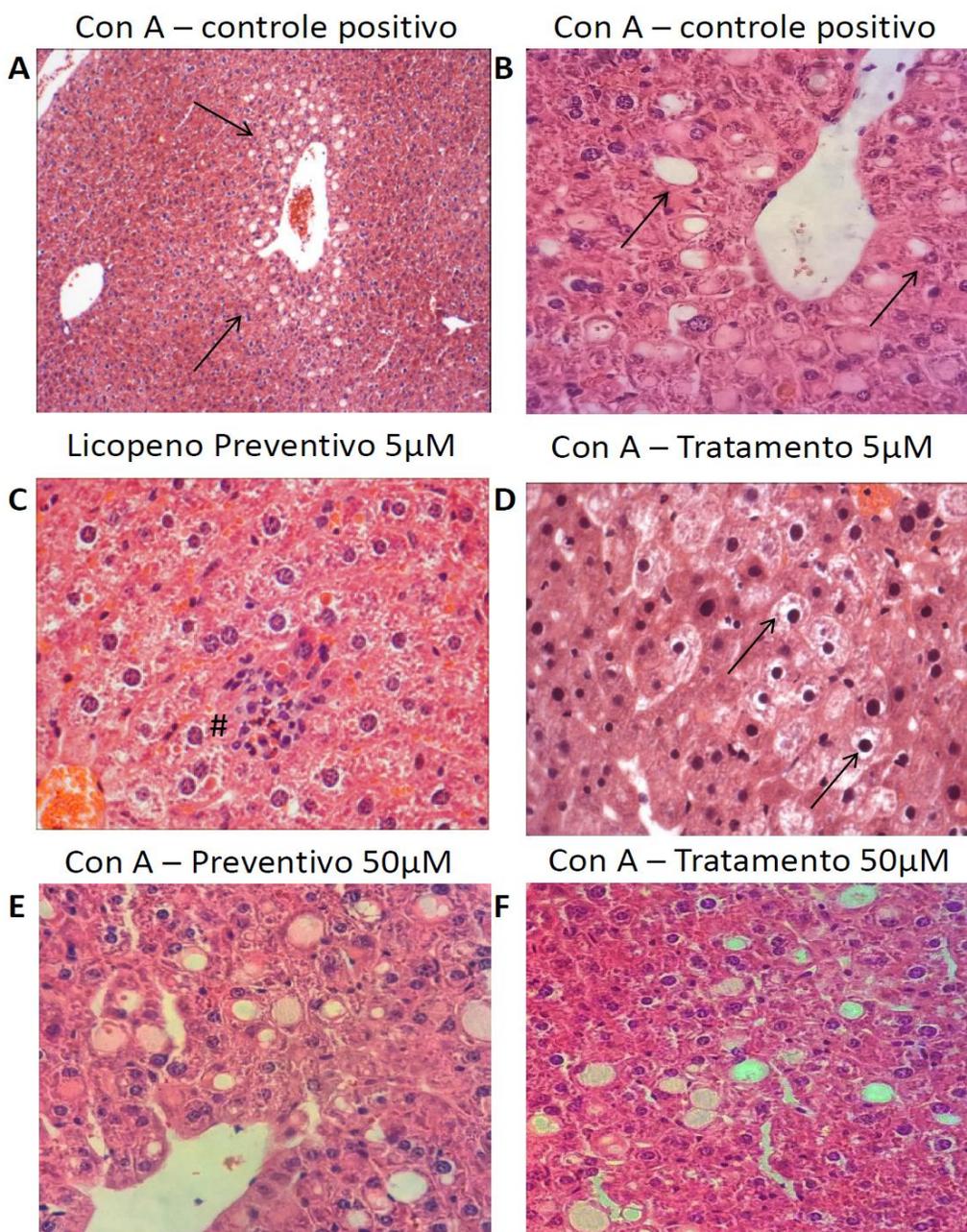


Figura 11: Fotomicrografias da zona lobular do fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Fígado induzido com con A apresenta lesões hepatocitárias ao redor da veia centrolobular. (B) Imagem ampliada revela vacúolos citoplasmáticos indicativos de deposição de lipídios (setas), uma fase inicial da esteatose. (C) O tratamento preventivo com 5µM de licopeno reduziu tais lesões hepatocitárias, porém estava associado com inflamação lobular (#). (D) O tratamento com 5µM de licopeno 72h após a injeção de con A estava associado a formação de “ballooning” nos hepatócitos, sem vacúolos evidentes (setas). Os tratamentos preventivo (E) e terapêutico (F) com 50µM de licopeno oral não reduziram as lesões semelhantes à deposição lipídica em fígados induzidos por con A (setas). Coloração: Hematoxilina e eosina. Resolução: A, 10x. B – F, 20x. n=5 animais por grupo.

A quantificação de hepatócitos vacuolados na região lobular pode ser um importante parâmetro para monitorar possíveis danos celulares e respostas inflamatórias lobulares, bem como o quanto licopeno influencia neste sentido. A indução com Con A aumentou para 15% o percentual de leucócitos na zona lobular, valor igual a zero no grupo controle (Figura 12A). A administração preventiva e terapêutica de licopeno 5 μ M reduziu este valor percentual para 1 e 10% de hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos, respectivamente. Já os animais tratados preventivamente com licopeno 50 μ M tinham cerca de 20% de hepatócitos vacuolados. O percentual de leucócitos lobulares no grupo tratado com licopeno 50 μ M 72h após a indução com Con A foi similar ao grupo controle positivo (induzido com Con A), com cerca de 10-15% das células lobulares (Figura 12A). A tabela 1 detalha as análises estatísticas comparando cada grupo experimental.

A análise quantitativa das amostras histológicas demonstrou que o aparente acúmulo de células inflamatórias na zona lobular hepática do grupo preventivamente tratado com licopeno 5 μ M não foi significativo. Animais induzidos por Con A apresentaram média próxima a 2% de células inflamatórias zona lobular, e os animais tratados com licopeno antes da Con A apresentaram um valor próximo a 7% de células inflamatórias na mesma região histológica (Figura 12B). Na verdade, todos os grupos experimentais apresentaram percentual de leucócitos similares ao grupo induzido pela Con A.

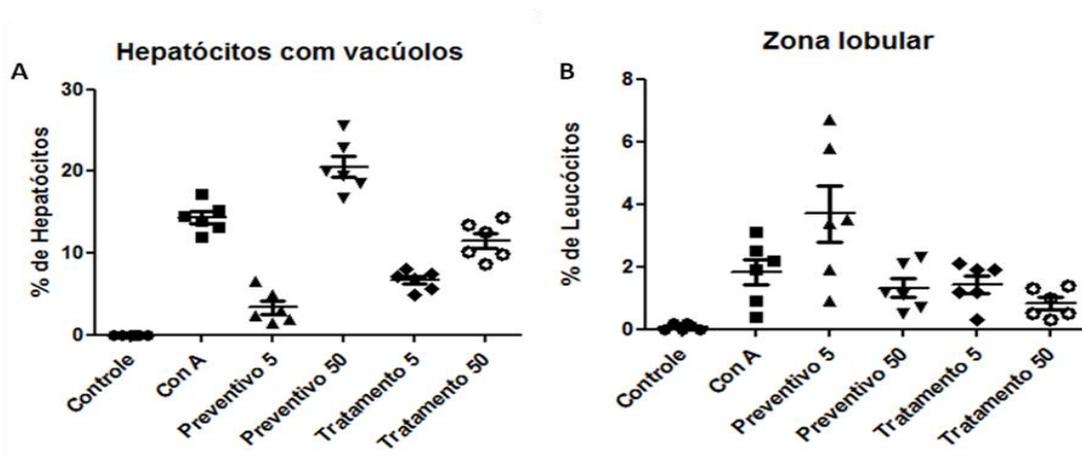


Figura 12: Quantificação de leucócitos e hepatócitos vacuolados no fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Percentual de leucócitos na zona lobular. (B) Percentual de hepatócitos lesionados na zona lobular. O tratamento preventivo com 5 μ M de licopeno oral induziu uma maior resposta inflamatória na zona lobular, porém associada a um menor grau de lesão nos hepatócitos. n=5 animais por grupo.

Controle vs Con A	***
Controle vs Preventivo 5	ns
Controle vs Preventivo 50	***
Controle vs Tratamento 5	***
Controle vs Tratamento 50	***
Con A vs Preventivo 5	***
Con A vs Preventivo 50	***
Con A vs Tratamento 5	***
Con A vs Tratamento 50	ns
Preventivo 5 vs Preventivo 50	***
Preventivo 5 vs Tratamento 5	ns
Preventivo 5 vs Tratamento 50	***
Preventivo 50 vs Tratamento 5	***
Preventivo 50 vs Tratamento 50	***
Tratamento 5 vs Tratamento 50	**

Tabela 1: Análise estatística de hepatócitos vacuolados na zona lobular em cada grupo experimental.

ns = não significativo;

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

Uma vez que a zona lobular pareceu um alvo importante de ação do licopeno, embora os parâmetros inflamatórios não estivessem alterados nesse estágio, aspectos histo-fisiológicos relacionados aos hepatócitos foram investigados. Neste sentido, as amostras foram coradas pelo método PAS na intenção de monitorar a distribuição de glicogênio acumulado no citoplasma destas células, bem como a glicemia nestes animais. No fígado normal, sadio, a distribuição de glicogênio é homogênea ao longo de um ácino hepático, região que compreende o espaço entre uma zona portal e uma veia centrolobular (Figura 13A). A indução com Con A modificou a distribuição de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos, e as células PAS+ ficaram acumuladas na região proximal da zona portal, conhecida como zona 1 (Figura 13B). A administração oral de forma preventiva com licopeno 5 μ M e 50 μ M não alteraram o padrão de distribuição heterogênea das células PAS+ modificado pela Con A, sendo evidenciada uma concentração destas células na zona portal associada à perda de glicogênio na região centrolobular (Figura 13 C e E). O

protocolo experimental terapêutico com licopeno 5 μ M apresentou distribuição de glicogênio semelhante ao fígado normal (Figura 13D). Por outro lado, licopeno terapêutico 50 μ M também não alterou o padrão das células PAS+ observado no grupo induzido pela Con A (Figura 13F).

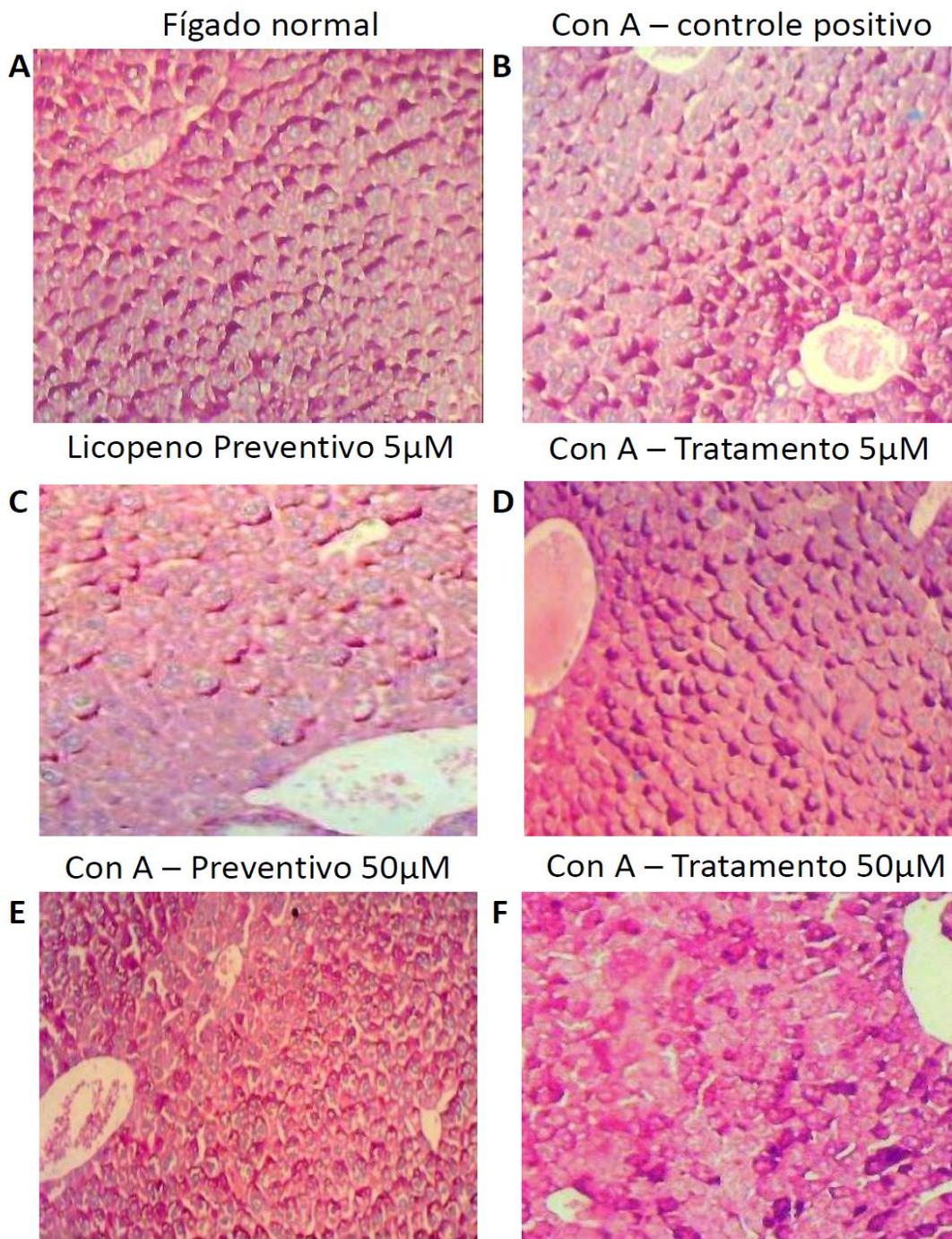


Figura 13: Deposição de glicogênio no fígado de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Fígado normal, sem indução com com A e qualquer tratamento. (B) Fígado induzido com concanavalina A. (C e D) Fígados tratados de forma preventiva com 5 μ M e 50 μ M de licopeno respectivamente. (E e F) Fígados tratados após os danos causados pela con A, com 5 μ M e 50 μ M de licopeno 72h após a injeção de con A. Coloração: PAS. Resolução: 10x. n=5 animais por grupo.

O licopeno administrado na concentração 5 μ M recuperou a organização histológica em relação ao acúmulo de glicogênio na zona lobular. Como os outros grupos experimentais apresentaram uma distribuição heterogênea, decidiu-se mensurar a glicemia nesses animais. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 14).

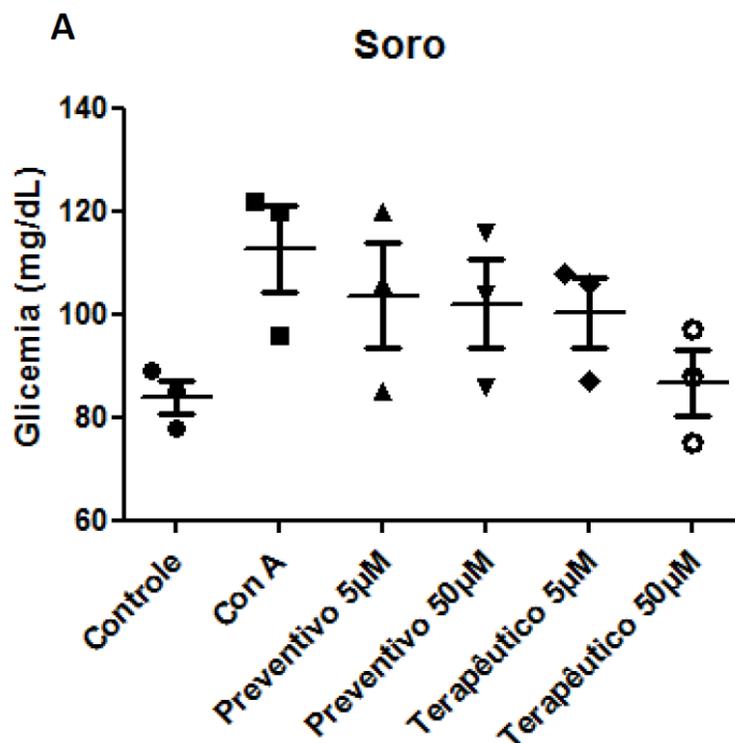


Figura 14: Dosagem de glicemia nos animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. O licopeno não interferiu com a taxa de glicose no soro dos animais.n=5

4.3- Perfil celular no fígado, médula óssea e timo

A resposta inflamatória gerada pela Con A foi modificada nos animais tratados com licopeno, principalmente, quando administrado na concentração de 5 μ M. Para uma avaliação mais precisa do perfil de células envolvidas, populações leucocitárias foram identificadas e quantificadas por citometria de fluxo. No fígado, as células mieloides foram identificadas de acordo com a presença da proteína CD11b ou Mac-1 na membrana. Os granulócitos

CD11b^{high}SSC^{high} apresentaram um aumento percentual apenas no grupo tratado com licopeno 50µM (Figura 15A-C, região superior). Monócitos e macrófagos também são positivos para CD11b, porém com fenótipo CD11b⁺SSC^{low}. Estas células estavam significativamente aumentadas nos grupos tratados com licopeno, em relação aos animais induzidos com Con A (Figura 15A-C, região inferior).

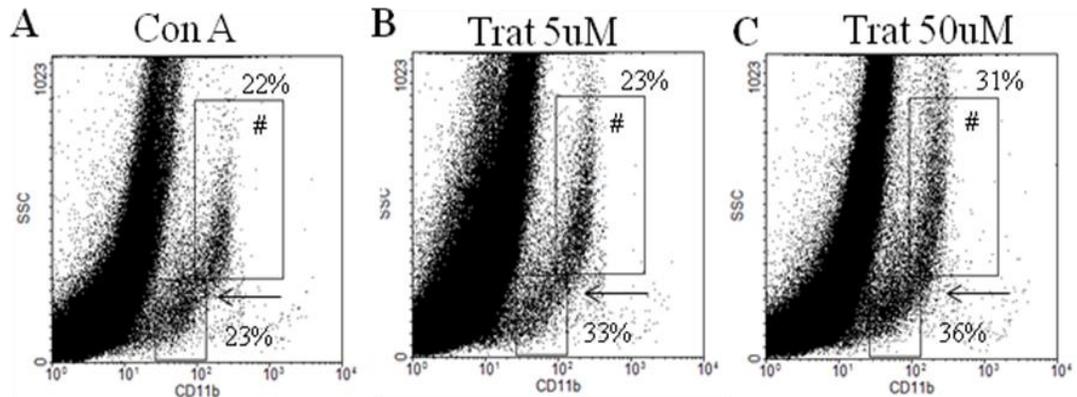


Figura 15: Identificação de células mieloides no fígado de animais induzidos com concanavalina A. Monócitos-macrófagos (SSC^{Low}CD11b⁺, regiões apontadas pelas setas) e granulócitos (SSC^{High}CD11b^{High}, regiões #) foram quantificados em animais induzidos com con A apenas (A), e tratados com licopeno oral 5µM (B) e 50µM (C). n=2 animais.

No modelo experimental de hepatite autoimune induzida por Con A, células dendríticas tem um papel imunomodulador preponderante na apresentação de (auto) antígenos entre 3 e 6h depois da indução (Tomiyama *et al.*, 2011). Embora seja um tempo precoce para o período estudado neste trabalho, células dendríticas convencionais (CD11c+B220-) e células dendríticas plasmocitoides (CD11c+B220+) foram quantificadas. O tratamento com licopeno em ambas as concentrações gerou uma redução percentual à metade das duas subpopulações destas células apresentadoras de antígenos (Figura 16A-C).

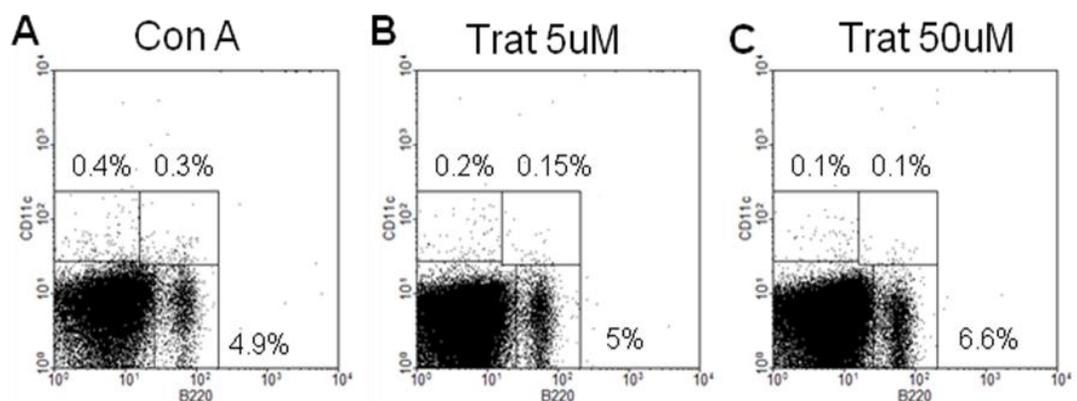


Figura 16: Caracterização de linfócitos B e células dendríticas no fígado de animais induzidos com concanavalina A. Células dendríticas convencionais ($CD11c^+B220^-$), células dendríticas plasmacitoides ($CD11c^+B220^+$) e linfócitos B ($B220^+CD11c^-$) em animais induzidos com con A apenas (A), e tratados com licopeno oral $5\mu M$ (B) e $50\mu M$ (C). $n=2$ animais.

Subpopulações de linfócitos T foram monitorados e quantificados no fígado de acordo com a presença das proteínas membranares CD4 e CD8. O percentual de linfócitos T $CD4^+$ aumentou nos dois grupos de animais induzidos com Con A tratados com licopeno $5\mu M$ e $50\mu M$ (Figura 17A-C, região inferior). Os linfócitos T $CD8^+$ também aumentaram em valores percentuais nos animais induzidos com Con A tratados com licopeno $5\mu M$ e $50\mu M$ (Figura 17A-C, região superior).

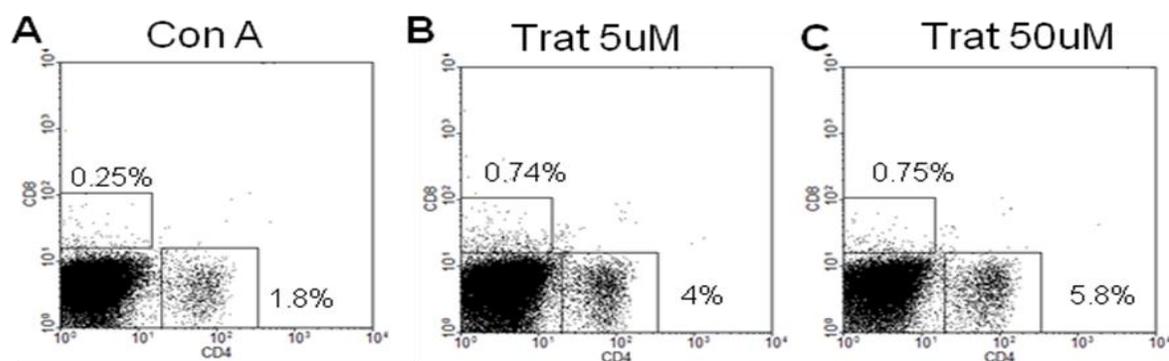


Figura 17: Identificação das subpopulações de linfócitos T no fígado de animais induzidos com concanavalina A. Linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ em animais induzidos com Con A apenas (A), e tratados com licopeno oral $5\mu M$ (B) e $50\mu M$ (C). A região inferior representa as células $CD4^+CD8^-$ e a região superior engloba as células $CD4^+CD8^+$. $n=2$ animais.

Durante uma resposta inflamatória, a medula óssea aumenta a produção das linhagens leucocitárias recrutadas para o sítio inflamatório, no caso deste trabalho, o fígado. Sendo assim, é plausível avaliar o total de leucócitos e células mononucleares na medula óssea dos animais estudados. No período estudado, o número absoluto de leucócitos após a indução com Con A foi similar ao grupo controle-negativo, não induzido (Figura 18A). O tratamento oral com licopeno 5 μ M gerou um aumento no número de leucócitos totais na medula óssea, mas na concentração de 50 μ M não surtiu o mesmo efeito (Figura 18A-B). A Con A provocou uma redução no percentual de células mononucleares FSC^{int}SSC^{low} em comparação ao grupo controle. Em contrapartida, o tratamento com licopeno promoveu um aumento no percentual destas células (Figura 18C-F).

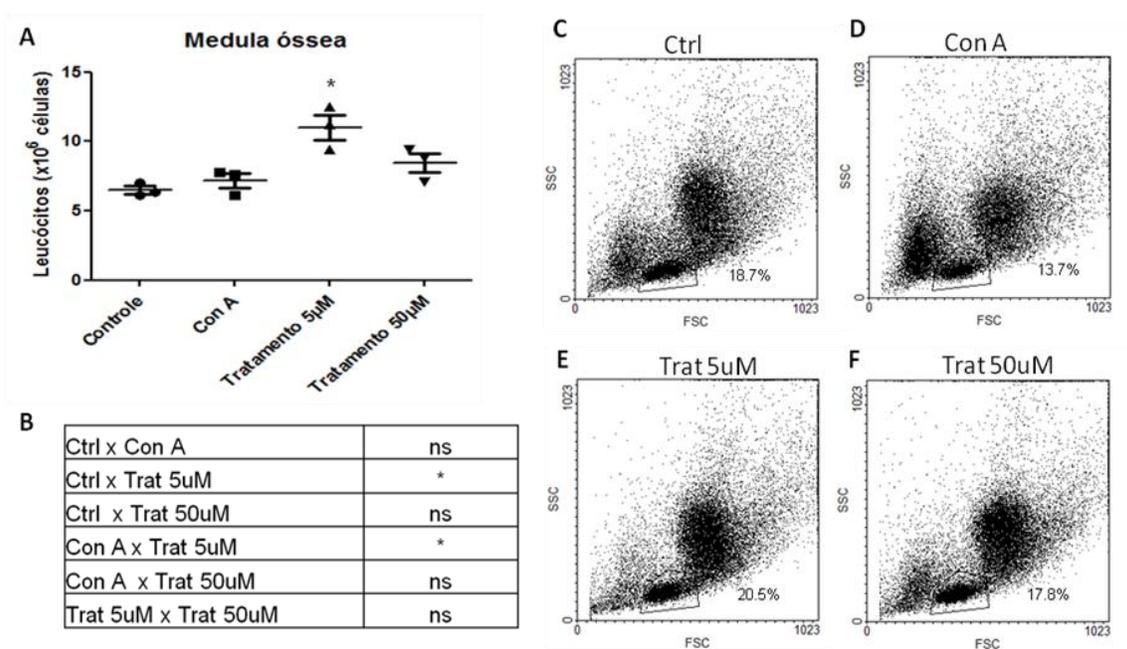


Figura 18: Quantificação de leucócitos totais na medula óssea de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Gráfico contendo o total de leucócitos em cada grupo experimental. n=3 animais por grupo. (B) Tabela com análise estatística comparando cada grupo experimental. (C) Grupo controle, sem indução com Con A ou qualquer tratamento com licopeno. (D) Grupo induzido com concanavalina A. (E e F) Animais induzidos com Con A, porém tratados após 72h com 5 μ M e 50 μ M de licopeno, respectivamente. ns = não significativo. (*) p<0.05.

Outro órgão estudado foi o timo, responsável pela diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Animais controle, sem qualquer indução, possuem cerca de 9x10⁶ células por mL em suspensão. A Con A provoca uma redução significativa no número total de timócitos 72h depois da injeção. O tratamento com licopeno 5μM amplificou essa queda no número de timócitos. Contudo, a administração terapêutica de licopeno 50μM não modificou o número de timócitos, em relação ao grupo induzido com Con A (Figura 19 A e B). Análise fenotípica dos timócitos revelou que o tratamento oral com licopeno 5μM induziu um aumento percentual de células CD8⁺CD4⁻ e uma redução percentual das células CD8⁺CD4⁺ e CD8⁻CD4⁺ (Figura 19C-E).

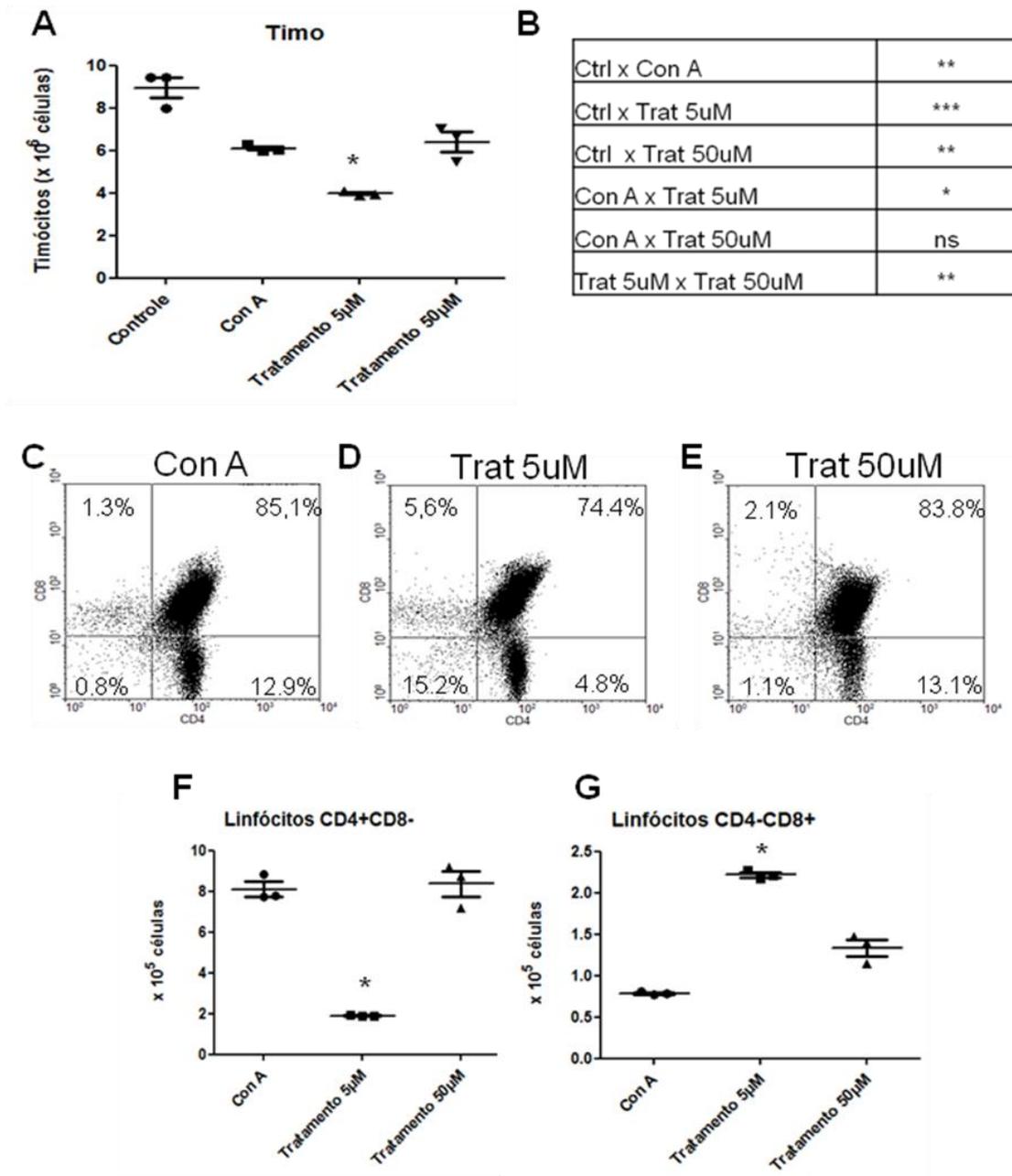


Figura 19: Quantificação de subpopulações de linfócitos T no timo de animais induzidos com concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Total de linfócitos no timo (timócitos). (B) Tabela com análise estatística comparando cada grupo experimental. (C) Identificação de populações de timócitos de acordo com a presença e/ou ausência de CD4 e CD8 nos animais induzidos com con A, e em animais induzidos tratados após 72h com 5µM e 50µM de licopeno (D e E, respectivamente). (E e F) Total de linfócitos CD4+CD8- e CD4-CD8+, respectivamente. n=3 animais por grupo. (*) p<0.05.

4.4 - Galectina 3+

Na tentativa de esclarecer possíveis mecanismos moleculares envolvidos na regulação da resposta inflamatória induzida pela Con A e dependente da administração do licopeno, células residentes no fígado foram escolhidas para uma análise inicial, como as células de Kupffer. Esses macrófagos são positivos para galectina-3 em fígado normal, habitando preferencialmente espaços sinusoidais, tanto nos espaços periportais (Figura 20A) quanto nas zonas lobulares. Durante patologias hepáticas, macrófagos galectina-3+ são polarizados para classe M2, cuja principal atividade está relacionada à ativação de miofibroblastos produtores de matriz extracelular (Henderson et al., 2006).

Animais induzidos com Con A apresentaram uma maior concentração de células positivas para galectina-3 na região periportal contendo infiltrado inflamatório, em sua maioria, apresentando formato arredondado, sugerindo leucócitos em migração (Figura 20B). A administração oral preventiva de licopeno 5 e 50 μ M voltou a evidenciar as células de Kupffer positivas para galectina-3, como observado no fígado normal, e não as células inflamatórias arredondadas majoritariamente presentes no fígado induzido com Con A (Figura 20C e E). O protocolo terapêutico com licopeno 5 μ M apresentou uma marcação com células de Kupffer positivas para galectina-3 extremamente semelhantes ao grupo controle, fígado normal, em localização das células e intensidade de marcação (Figura 20D). O uso terapêutico do licopeno 50 μ M também apresentou semelhanças com a zona portal do fígado normal, porém com menor intensidade de marcação para galectina-3 nas células de Kupffer e maior dispersão das células (Figura 20F).

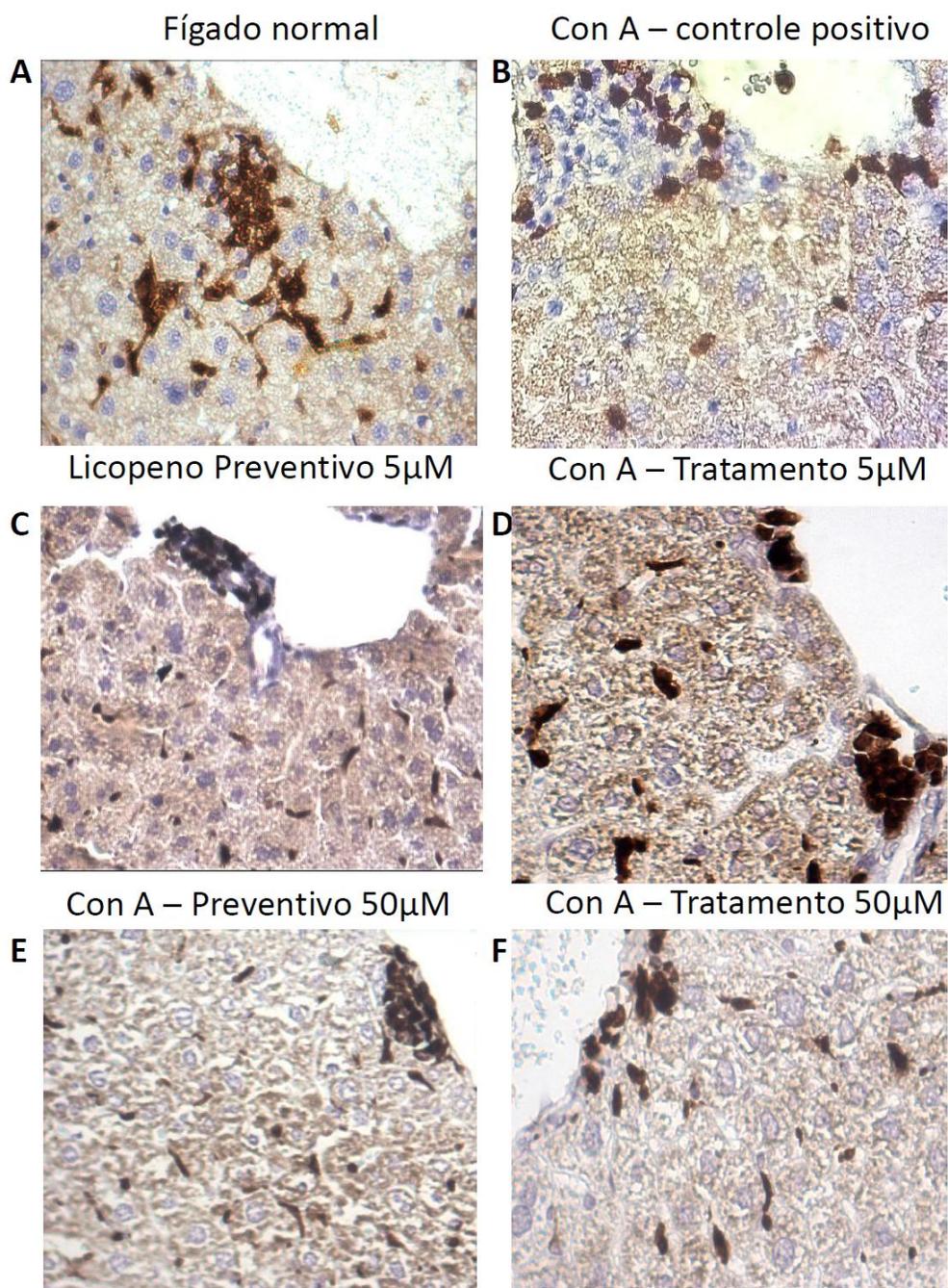


Figura 20: Células positivas para galectina-3 na zona periportal hepática. Imuno-histoquímica para galectina-3 no fígado de animais normais (A), induzidos com con A apenas (B). Animais induzidos, porém tratados com licopeno oral 5µM (C) e 50µM (E) de forma preventiva. Animais induzidos, porém tratados com licopeno oral 5µM (D) e 50µM (F) 72h após a injeção de con A. n = 3 animais

Na zona lobular, a distribuição das células positivas para galectina-3 manteve um padrão semelhante ao descrito para a zona periportal. Fígado controle apresentou distribuição homogênea de células de Kupffer positivas para galectina-3 (Figura 21A) Animais induzidos com Con A apresentaram uma menor proporção de células galectina-3+, porém com alta frequência de células com formato arredondado, sugerindo leucócitos. A quantidade de células galectina-3+ alongadas reduziu na zona lobular destes animais (Figura 21B). Todos os protocolos de administração oral de licopeno 5 ou 50 μ M recuperaram a organização histológica das células de Kupffer positivas para galectina-3, como observado no fígado normal, com destaque para os grupos preventivo e terapêutico com licopeno 5 μ M (Figura 21C-F). Nestas amostras, a intensidade de marcação para galectina-3 foi substancialmente parecida com as amostras de fígado normal.

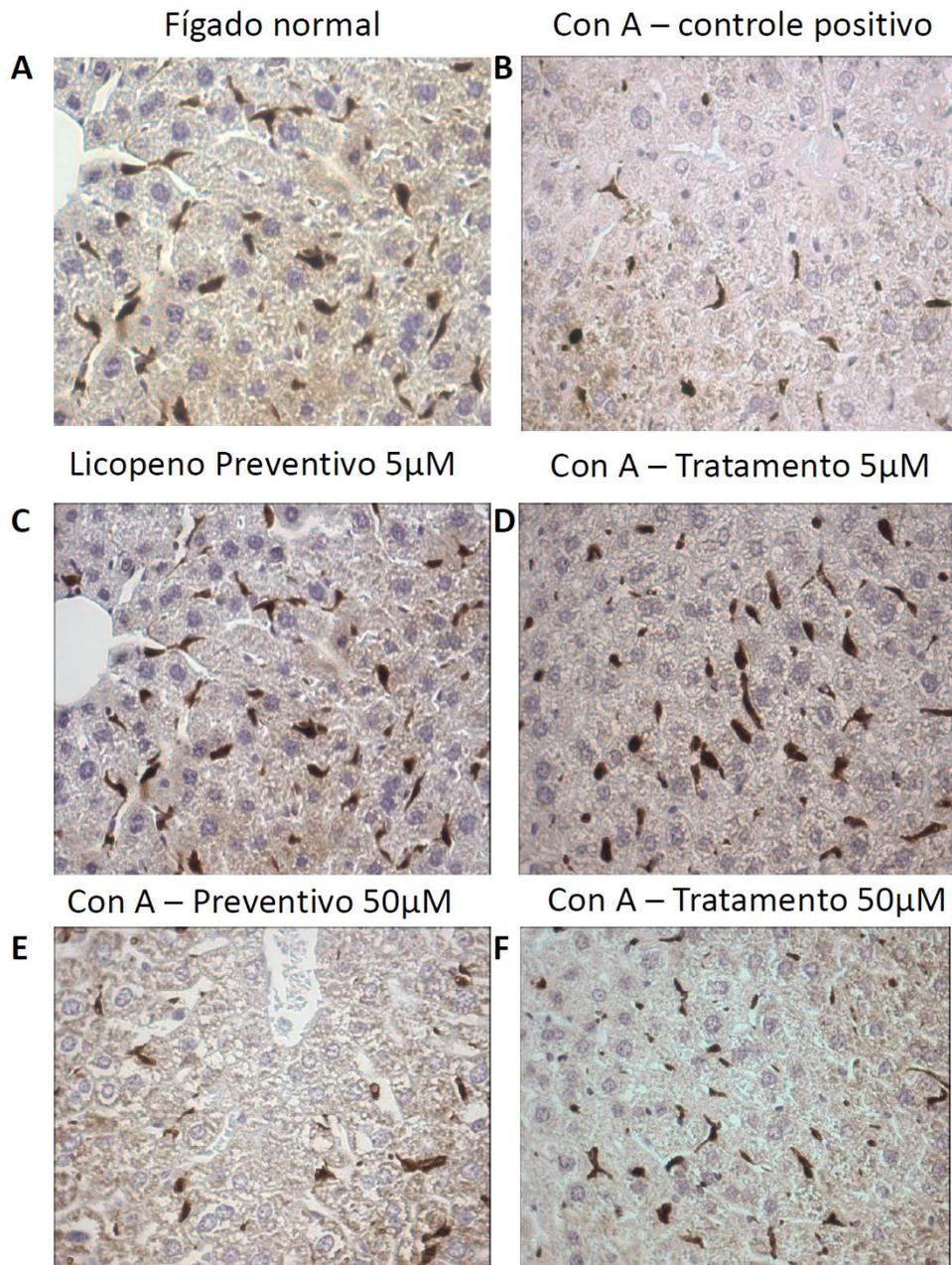


Figura 21: Células positivas para galectina-3 na zona lobular hepática. Imuno-histoquímica para galectina-3 no fígado de animais normais (A), induzidos com con A apenas (B). Animais induzidos, porém tratados com licopeno oral 5μM (C) e 50μM (E) de forma preventiva. Animais induzidos, porém tratados com licopeno oral 5μM (D) e 50μM (F) 72h após a injeção de con A. n = 3 animais

Análise quantitativa das amostras teciduais revelou que o licopeno recuperou o percentual de células de Kupffer galectina-3+ no fígado total, chegando a valores próximos do grupo normal, sem indução com Con A. Porém, podem-se destacar os efeitos da administração terapêutica de licopeno 5µM (Figura 22A, tabela estatística). Corroborando, este mesmo perfil foi detectado nos compartimentos funcionais do fígado, como as zonas portal (Figura 22B) e lobular (Figura 22C).

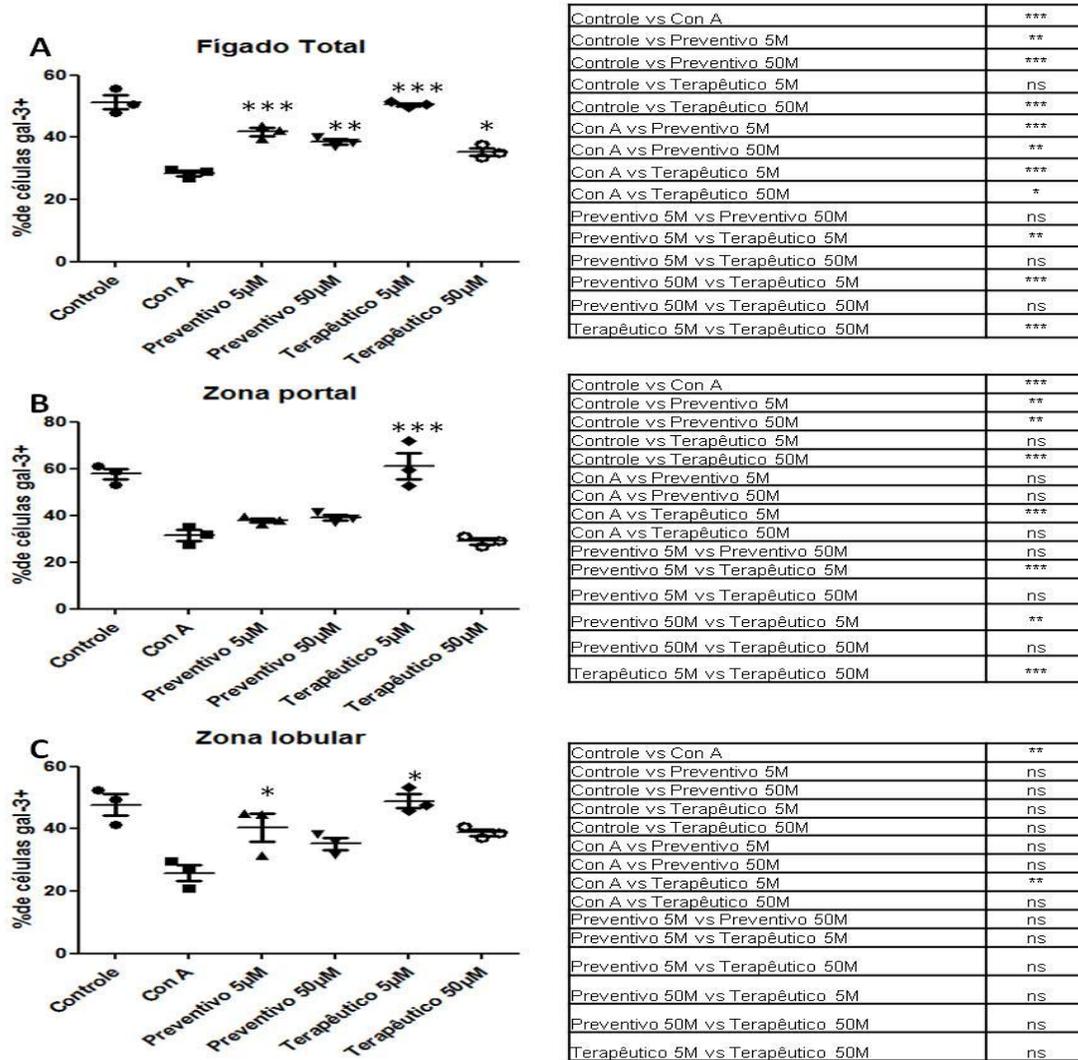


Figura 22: Quantificação das células positivas para galectina-3 no fígado dos animais induzidos pela concanavalina A e tratados com licopeno. (A) Percentual de células galectina-3+ no fígado total (zona portal + zona lobular), ou somente na zona portal (B) e na zona lobular (C). n = 3 animais. As tabelas indicam as análises estatísticas. (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001.

5. DISCUSSÃO

O licopeno é um carotenóide caracterizado por interferir em mecanismos quimiopreventivos e quimioterapêuticos (Srinivasan *et al.*, 2009; Story *et al.*, 2010; El Kaoutari, 2013), geralmente por sua ação antioxidante (Mein *et al.*, 2008). Neste trabalho está sendo proposto que o licopeno pode contribuir com a reorganização histológica do fígado durante resposta inflamatória. Dois protocolos foram testados: (I) consumo preventivo ou (II) consumo terapêutico de licopeno nas concentrações 5 μ M e 50 μ M em animais apresentando um processo inflamatório no fígado, estabelecido pela injeção de concanavalina A, um modelo experimental de hepatite autoimune amplamente utilizado (Wang *et al.*, 2012).

No modelo de inflamação induzida pela Con A, caracteriza-se uma hepatite mediada por resposta inflamatória aguda, primariamente estabelecida pela ativação e recrutamento de linfócitos T para o fígado. As similaridades deste modelo experimental com a patogênese de hepatites autoimunes, virais ou medicamentosas, quando se trata dos mecanismos que levam a ativação do sistema imune (Heymann *et al.*, 2015), tornam-no interessante para o estudo de vias celulares e moleculares envolvidas, bem como possíveis intervenções terapêuticas. Neste sentido, o licopeno tem sido descrito como uma substância com ação biológica capaz de suprimir a proliferação celular, angiogênese e inflamação com redução de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células de Kupffer e hepatócitos quando lesionados (Hazlewood *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2013).

A administração de licopeno 5 μ M foi mais eficiente que 50 μ M em alguns aspectos cruciais, como por exemplo, percentual de células inflamatórias no parênquima hepático, lesões hidrópicas nos hepatócitos, modulação da resposta linfóide T no timo e no próprio fígado, e quantidade de macrófagos relacionados à galectina-3, um marcador de diferenciação macrófágica (Morin, 2012). Não há um consenso na literatura sobre uma concentração ótima de licopeno no soro. Dietas com consumo elevado de alimentos ricos em licopeno sua concentração fisiológica varia de 1-2 μ M e um desequilíbrio esta diretamente proporcional ao risco de neoplasias (Eliassen *et al.*, 2012). Apesar dos benefícios à saúde, altas concentrações de licopeno estão associadas à atividade pró-oxidante e possivelmente citotóxicas (Young e Lowe, 2001).

A suplementação oral de licopeno 5 μ M, tanto de forma preventiva quanto terapêutica, reduziu o percentual de leucócitos na zona portal. Além disso, animais tratados preventivamente com licopeno 5 μ M apresentaram menor percentual de tríades portais contendo infiltrado inflamatório. Nestas regiões do fígado, passam ramos da veia porta-hepática, da artéria hepática e ductos biliares, sendo assim, uma região com intensa atividade metabólica que recebe substâncias para serem detoxificadas pelos hepatócitos (Gadd *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que a utilização do licopeno de forma preventiva pode ser um potente aliado na prevenção de hepatite mediada por inflamação, porém de forma finamente controlada, pois concentrações elevadas podem reduzir seu efeito benéfico ou ainda produzir certa toxicidade.

Em experimentos com camundongos suplementados com metabólitos de licopeno demonstraram redução significativa da inflamação hepática (diminuição focos inflamatórios, TNF α , IL-6, NF-kB p65, e a ativação da STAT3) e hepatocarcinogênese em camundongos suplementados com 10mg/kg por 24 semanas. Estudos complementares avaliaram a eficácia da CMO2 e sugeriram que dependendo de sua presença ou ausência o licopeno pode apresentar efeitos quimiopreventivos distintos (Ip *et al.*, 2013; Ip *et al.*, 2014). Ambos os estudos sugerem que metabólitos de licopeno poderiam ser agentes dietéticos eficazes para a prevenção do câncer de fígado ou reduzir o risco de câncer para pacientes com esteatose hepática não alcoólica. Os dados exibidos neste trabalho corroboraram com a literatura, sugerindo que o licopeno pode ser um importante modulador de respostas inflamatórias em processo iniciais de hepatites.

Medicamentos e substâncias tóxicas podem levar a inflamação e degeneração gordurosa do fígado através de lesão nas mitocôndrias do fígado, levando a incapacidade de metabolizar adequadamente as gorduras no órgão e ainda levar à destruição de células e inflamação (Yeaman *et al.*, 2000). Quando avaliamos a presença de inclusões lipídicas no tecido hepático observamos que o protocolo preventivo com licopeno 5 μ M reduziu a presença dos vacúolos citoplasmáticos típicos de deposição lipídica. Por outro lado, estes animais apresentaram inflamação na zona lobular. O grupo tratado de forma terapêutica com licopeno 5 μ M apresentou degeneração hidrópica, mas sem formação de vacúolos evidente. Este ponto levanta uma questão interessante sobre o equilíbrio entre a resposta inflamatória local e a deposição de gordura no parênquima hepático, um ponto de controvérsias na literatura.

Processos inflamatórios hepáticos crônicos são capazes de provocar alterações no metabolismo de carboidrato gerando resistência a insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Vanni *et al.*, 2016). Os grupos com tratamento preventivo e terapêutico foram avaliados quanto à alteração da glicemia quando suplementados com licopeno nas concentrações 5 μ M e 50 μ M após indução de hepatite por Con A. Os grupos não apresentaram alteração glicêmica considerando os valores referência de glicemia pós-prandial de 140 mg/dl para pré-diabetes e 200 mg/dl (Rerup e Lundquist, 1966). Realizando-se a análise semi-quantitativa das inclusões PAS-positivas, foi possível verificar a diminuição do glicogênio hepático na zona 3 acinar, ou seja, proximal à veia centrolobular no grupo induzido pela Con A. A administração preventiva de licopeno 5 μ M apresentou diminuição de glicogênio nas três zonas acinares (zona 1 periportal e zona 2 lobular). Já o tratamento com licopeno 5 μ M recuperou a organização das células PAS+ e apresentou estrutura similar ao fígado normal. Estes dados sugerem que o tratamento com licopeno 5 μ M pode amenizar os distúrbios metabólicos causados pela con A, em relação ao armazenamento de glicogênio, embora a glicemia não tivesse sido afetada neste tempo de resposta inflamatória. As formas preventivas não surtiram o mesmo efeito.

A citometria de fluxo permitiu a geração de um mapa de células envolvidas com a resposta inflamatória à Con A e modulação mediada pelo licopeno. Granulócitos CD11b⁺SSC^{high} não apresentaram alterações percentuais depois da administração do licopeno nos animais previamente induzidos com con A. Nestes animais entretanto, o percentual de células CD11b⁺SSC^{low}, fenótipo semelhante a monócitos e macrófagos, estava significativamente aumentado após o tratamento com licopeno 5 e 50 μ M, indicando que o licopeno modificou a resposta mono-macrofágica nos animais induzidos com con A. Além disso, células dendríticas CD11c⁺ também apresentaram redução percentual, indicando menor capacidade fagocítica e apresentação de antígenos após o tratamento com licopeno. Já os linfócitos B não sofreram alterações percentuais significativas.

Os linfócitos T CD4 e CD8 também aumentaram em termos percentuais no fígado após o tratamento com licopeno. Consistentemente, o timo apresentou uma redução percentual de células CD4 e CD8 no grupo tratado com licopeno 5 μ M. Entretanto, não houve diferença significativa no timo entre os animais tratados com licopeno 50 μ M e induzidos com Con A, cujos valores de células CD4 e CD8 foram muito parecidos. Estes dados sugerem que o tratamento com

licopeno 5 μ M via oral influenciou na resposta local no fígado e sistêmica, pois o timo também respondeu ao tratamento. Não ficou muito claro porque o tratamento com licopeno 50 μ M não modificou o padrão CD4/CD8 no timo. Os efeitos sistêmicos ficaram ainda mais evidenciados na medula óssea, uma vez que o tratamento com licopeno modificou o número de leucócitos totais, indicando resposta ao carotenóide neste modelo.

Na busca de um possível mecanismo molecular para explicar as alterações na resposta inflamatória induzida pela con A, foi realizada uma análise baseada na quantidade de células galectina-3⁺. Galectina-3 é uma proteína potencialmente capaz de reconhecer grupos β -galactosídeos presentes na maioria das células e tecidos. No meio extracelular, galectina-3 regula interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Dumic *et al.*, 2006). No fígado, é produzida por células de kupffer e células de Ito, frequentemente envolvidas com eventos que regulam inflamação e fibrose (Nelson, 2012; El-Saad *et al.*, 2016; Piña-Zentella *et al.*, 2016).

Pela localização sinusoidal, estas células foram majoritariamente macrófagos (células de Kupffer) nos animais normais. A resposta inflamatória causada pela con A foi caracterizada por uma redução no percentual de células galectina-3⁺. O tratamento com licopeno de forma preventiva e terapêutica, com ambas as concentrações 5 μ M e 50 μ M, aumentou significativamente o percentual de células galectinas 3⁺ na zona portal e zona lobular quando avaliadas em comparação com o grupo induzido pela Con A. Análises morfológicas da zona portal revelaram que tais células positivas para galectina-3 apresentaram um formato heterogêneo, como por exemplo, leucócitos derivados do sangue (formato circular) e macrófagos (células alongadas sinusoidais), indicando o potencial regulador de inflamação desta lectina. Já na zona lobular, o formato alongado de praticamente todas as células positivas para galectina-3 permite sugerir que as células de Kupffer estavam aumentadas após a administração de licopeno, sugerindo que macrófagos galectina-3⁺ possam ter um papel-chave na modulação da resposta inflamatória e conseqüentemente na patogênese da hepatite, neste modelo experimental.

Galectina-3 exerce um papel imunomodulador em macrófagos direcionando respostas do tipo M2, classicamente conhecida por exacerbar mecanismos humorais (produção de anticorpos), angiogênese e eventos pró-fibróticos em tecidos com alto grau de lesões (Jia *et al.*, 2013). Em processos inflamatórios, a ativação de macrófagos M2 pode ser induzida por células apoptóticas,

IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β (Murray *et al.*, 2014). Estes podem ser possíveis alvos genéticos a serem investigados na continuação deste trabalho.

Con A causa hepatotoxicidade mediada por linfócitos T, cuja ativação depende de TNF- α e INF- γ secretados pelas células de Kuffer, definindo um padrão Th1 de resposta inflamatória (Morita *et al.*, 2003). Aliás, estes fatores estão diretamente correlacionados com os danos nos hepatócitos (Schumann *et al.*, 2000). Em suma, a resposta imune Th1 contribui diretamente com a hepatotoxicidade da Con A e galectina-3 está tendenciada a uma resposta M2. Os dados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura, pois a redução percentual das células galectina-3⁺ foi significativa quando os animais foram induzidos pela Con A.

A administração de licopeno promoveu um aumento percentual das células positivas para galectina-3 nos animais induzidos pela Con A, indicando um papel imunomodulador M1-para-M2 ainda não descrito na literatura. Os efeitos benéficos a serem estudados posteriormente consistem na resposta M2, possivelmente observada na presença de licopeno, como por exemplo, maior capacidade fagocítica das células de Kupffer, produção de componentes de matriz extracelular, cicatrização, fatores angiogênicos, e genes supracitados (IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β). Dessa forma, o tratamento com licopeno parece ser uma estratégia promissora para a regulação da resposta inflamatória que precede os danos funcionais da hepatite no modelo experimental da indução por concanavalina A. E considerando os resultados encontrados nossa sugestão é que o licopeno na concentração de 5 μ M quando administrado via oral preventivamente e terapêuticamente poderia atuar como regulador da resposta macrofágica M1/M2 no fígado quando submetido à indução de hepatite por concanavalina A (Figura 23)

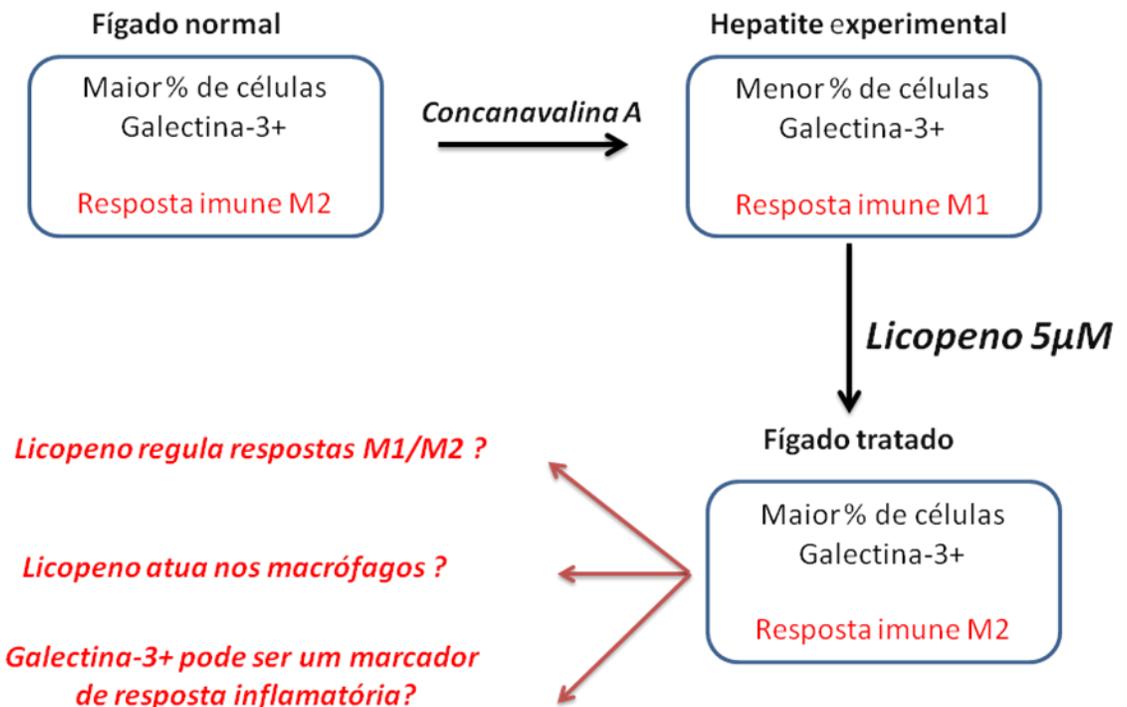


Figura 23: Esquema representando às possíveis atuações do licopeno no fígado de camundongos induzidos a hepatite por Concanavalina A

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo sugere um novo papel para o licopeno, como um fator nutracêutico capaz de desviar resposta imune Th1/M1 danosa ao fígado inflamado para resposta Th2/M2 humoral e regenerativa. E demonstra evidências benéficas da suplementação do licopeno em camundongos sobre a função hepática no fígado inflamado, entretanto mais estudos são necessários para explicar sua ação mecanística.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E.-S.; RABALSKI, I. Composition of Lutein Ester Regioisomers in Marigold Flower, Dietary Supplement, and Herbal Tea. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 44, p. 9740-6, Nov 2015. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26496496> >.

AGARWAL, A. et al. Lycopene Content of Tomato Products: Its Stability, Bioavailability and In Vivo Antioxidant Properties. **J Med Food**, v. 4, n. 1, p. 9-15, 2001. ISSN 1557-7600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639283> >.

ANTOINE, D. J.; WILLIAMS, D. P.; PARK, B. K. Understanding the role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity: state of the science. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 4, n. 11, p. 1415-27, Nov 2008. ISSN 1742-5255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950283> >.

ASAHINA, K. et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 998-1011, Mar 2009. ISSN 0270-9139.

BAO, Q.; HUGHES, R. C. Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 8), p. 2791-800, Aug 1995. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593320> >.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB J**, v. 3, n. 8, p. 1927-32, Jun 1989. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656356> >.

BERLANGA, A. et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 7, p. 221-39, 2014. ISSN 1178-7023.

BERNAL, C. et al. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 11, p. 1870-81, Nov 2013. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23972952> >.

BI, Y. et al. Endocytosis of collagen by hepatic stellate cells regulates extracellular matrix dynamics. **Am J Physiol Cell Physiol**, Jul 2014. ISSN 1522-1563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080486> >.

BOLTJES, A. et al. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. **J Hepatol**, v. 61, n. 3, p. 660-671, Sep 2014. ISSN 0168-8278.

CASTRONOVO, V. et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. **J Pathol**, v. 179, n. 1, p. 43-8, May 1996. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8691344> >.

CHANG, C. P. et al. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 286-96, Feb 2007. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17256764> >.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-23, Jun 24 2011. ISSN 0036-8075.

CRISPE, I. N. The liver as a lymphoid organ. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 147-63, 2009. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302037> >.

CUI, L. et al. Immunological basis of stem cell therapy in liver diseases. **Expert Rev Clin Immunol**, p. 1-12, Jun 2014. ISSN 1744-8409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24964800> >.

DAMBECK, M.; SANDMANN, G. Antioxidative activities of algal keto carotenoids acting as antioxidative protectants in the chloroplast. **Photochem Photobiol**, v. 90, n. 4, p. 814-9, Jul 2014. ISSN 1751-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24483595> >.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**, v. 274, n. 2, p. 532-8, Nov 1989. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2802626> >.

DIACONESCU, N.; NETESCU, I.; VELEANU, C. **Comparative studies of the development of dynamics of the thoracolumbar vertebrae and the division of lobes of the liver in primates and humans**. Amsterdam: 2^o, 1966.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 4, p. 616-35, Apr 2006. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002.

EL KAOUTARI, A. **Exploration des enzymes du microbiome intestinal humain impliquées dans la dégradation des sucres complexes**. S.l.: s.n., 2013.

EL-SAAD, A. A. et al. Lycopene attenuates dichlorvos-induced oxidative damage and hepatotoxicity in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 35, n. 6, p. 654-65, Jun 2016. ISSN 1477-0903. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231422> >.

ELIASSEN, A. H. et al. Circulating carotenoids and risk of breast cancer: pooled analysis of eight prospective studies. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, n. 24, p. 1905-16, Dec 19 2012. ISSN 0027-8874.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-88, 2014. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473231> >.

FORD, N. A. et al. Loss of carotene-9',10'-monooxygenase expression increases serum and tissue lycopene concentrations in lycopene-fed mice. **J Nutr**, v. 140, n. 12, p. 2134-8, Dec 2010. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962153> >.

GADD, V. L. et al. The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 1393-405, Apr 2014. ISSN 0270-9139.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 3, p. 311-35, Aug 2001. ISSN 0272-8087 (Print)

0272-8087.

HAMMOND, B. R.; RENZI, L. M. Carotenoids. **Adv Nutr**, v. 4, n. 4, p. 474-6, Jul 2013. ISSN 2156-5376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23858095> >.

HAZLEWOOD, L. C. et al. Dietary lycopene supplementation suppresses Th2 responses and lung eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 1, p. 95-100, Jan 2011. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392623> >.

HERNANDEZ-MARIN, E.; GALANO, A.; MARTÍNEZ, A. Cis carotenoids: colorful molecules and free radical quenchers. **J Phys Chem B**, v. 117, n. 15, p. 4050-61, Apr 2013. ISSN 1520-5207. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23560647> >.

HERRMANN, J. et al. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. **J Biol Chem**, v. 268, n. 35, p. 26704-11, Dec 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253805> >.

HEYMANN, F. et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. **Lab Anim**, v. 49, n. 1 Suppl, p. 12-20, Apr 2015. ISSN 0023-6772.

HU, C. T. et al. Reactive oxygen species-mediated PKC and integrin signaling promotes tumor progression of human hepatoma HepG2. **Clin Exp Metastasis**, v. 28, n. 8, p. 851-63, Dec 2011. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21842414> >.

HUSSAIN, A. et al. Carotenoid Content in Organically Produced Wheat: Relevance for Human Nutritional Health on Consumption. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 11, p. 14068-83, Nov 2015. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26540066> >.

IACOBINI, C. et al. Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver. **J Hepatol**, v. 54, n. 5, p. 975-83, May 2011. ISSN 0168-8278.

ILIC, D. Lycopene for the prevention and treatment of prostate disease. **Recent Results Cancer Res**, v. 202, p. 109-14, 2014. ISSN 0080-0015 (Print)

0080-0015.

IP, B. C. et al. Lycopene metabolite, apo-10'-lycopenoic acid, inhibits diethylnitrosamine-initiated, high fat diet-promoted hepatic inflammation and tumorigenesis in mice. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 6, n. 12, p. 1304-16, Dec 2013. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24085778> >.

_____. Lycopene attenuated hepatic tumorigenesis via differential mechanisms depending on carotenoid cleavage enzyme in mice. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 7, n. 12, p. 1219-27, Dec 2014. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25293877> >.

_____. Lycopene and apo-10'-lycopenoic acid have differential mechanisms of protection against hepatic steatosis in β -carotene-9',10'-oxygenase knockout male mice. **J Nutr**, v. 145, n. 2, p. 268-76, Feb 2015. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25644347> >.

IP, B. C.; WANG, X. D. Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: implications for lycopene intervention. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 124-62, Jan 2014. ISSN 2072-6643.

ITO, M.; ADACHI-AKAHANE, S. Inter-organ communication in the regulation of lipid metabolism: focusing on the network between the liver, intestine, and heart. **J Pharmacol Sci**, v. 123, n. 4, p. 312-7, 2013. ISSN 1347-8613.

JAECKEL, E.; HARDTKE-WOLENSKI, M.; FISCHER, K. The benefit of animal models for autoimmune hepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 25, n. 6, p. 643-51, Dec 2011. ISSN 1532-1916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22117631> >.

JIA, W. et al. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. **Am J Pathol**, v. 182, n. 5, p. 1821-31, May 2013. ISSN 0002-9440.

JUZA, R. M.; PAULI, E. M. Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians. **Clin Anat**, v. 27, n. 5, p. 764-9, Jul 2014. ISSN 0897-3806.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738.

KATO, J. et al. Interferon-gamma-mediated tissue factor expression contributes to T-cell-mediated hepatitis through induction of hypercoagulation in mice. **Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 362-72, Jan 2013. ISSN 0270-9139.

KHOO, H. E. et al. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1710-38, 2011. ISSN 1420-3049.

KIERSZENBAUM, A. L. **Glândulas digestórias** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 499-504.

KONG, L. C. **Les études cliniques des relations entre l'alimentation, la flore intestinale et l'obésité l'hypothèse d'adaptation**. S.l.: s.n., 2011. 195 p.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 6, p. 459-516, Dec 2005. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16309738> >.

KURCER, M. A. et al. Effect of lycopene on caspase-3 enzyme activation in liver of methanol-intoxicated rats: comparison with fomepizole. **J Med Food**, v. 13, n. 4, p. 985-91, Aug 2010. ISSN 1557-7600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20482279> >.

LARREY, D. Drug-induced liver diseases. **J Hepatol**, v. 32, n. 1 Suppl, p. 77-88, 2000. ISSN 0168-8278 (Print)

0168-8278.

LIN, H. Y. et al. Antineuroinflammatory effects of lycopene via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- α 1/heme oxygenase-1 pathways. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 1, p. 191-202, Jan 2014. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906616> >.

LIU, F. T. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **Am J Pathol**, v. 147, n. 4, p. 1016-28, Oct 1995. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573347> >.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, Jan 2005. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630413> >.

LOTAN, R. et al. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. **Glycoconj J**, v. 11, n. 5, p. 462-8, Oct 1994. ISSN 0282-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7696849> >.

LOTZ, M. M. et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 8, p. 3466-70, Apr 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682704> >.

MA, T.; DENG, Z.; LIU, T. Microbial production strategies and applications of lycopene and other terpenoids. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 32, n. 1, p. 15, Jan 2016. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715120> >.

MARTÍ, R.; ROSELLÓ, S.; CEBOLLA-CORNEJO, J. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. **Cancers (Basel)**, v. 8, n. 6, 2016. ISSN 2072-6694. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27331820> >.

MASSA, S. M. et al. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. **Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 260-7, Jan 1993. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418845> >.

MEIN, J. R.; LIAN, F.; WANG, X. D. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. **Nutr Rev**, v. 66, n. 12, p. 667-83, Dec 2008. ISSN 1753-4887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019036> >.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. [Carotenoid pigments: structural and physicochemical considerations]. **Arch Latinoam Nutr**, v. 57, n. 2, p. 109-17, Jun 2007a. ISSN 0004-0622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992973> >.

_____. Carotenoids, color, and ascorbic acid content of a novel frozen-marketed orange juice. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 4, p. 1347-55, Feb 2007b. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17253722> >.

MORIN, S. **Influence de la présence et de la composition du microbiote intestinal sur le développement et la prévention des allergies alimentaires**. Paris: Université Paris Descartes, 2012. 211 p.

MORITA, A. et al. Activated Kupffer cells play an important role in intra-hepatic Th1-associated necro-inflammation in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. **Hepatol Res**, v. 27, n. 2, p. 143-150, Oct 2003. ISSN 1386-6346 (Print)

1386-6346.

MOUATSOS, I. K. et al. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 18, p. 6452-6, Sep 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3306680> >.

MURILLO, A. G.; FERNANDEZ, M. L. Potential of Dietary Non-Provitamin A Carotenoids in the Prevention and Treatment of Diabetic Microvascular Complications. **Adv Nutr**, v. 7, n. 1, p. 14-24, Jan 2016. ISSN 2156-5376. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773012> >.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014. ISSN 1074-7613.

NELSON, K. E. **Genomics applications for the developing world**. New York, NY: Springer New York : Springer e-books : Imprint: Springer : Springer e-books, 2012.

NICKEL, R. **The viscera of the domestic mammals**. SCHUMMER, A. 2. ed. Berlim: Verlag Paul Parey: 401 p. 1979.

NOVO, E. et al. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 548, p. 20-37, Apr 15 2014. ISSN 0003-9861.

PARK, B. K. et al. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 177-202, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822174> >.

PEARCY, D. H.; BARTHOLD, S. W. M. Mouse. In: PEARCY, D. H. e BARTHOLD, S. W. (Ed.). **Comparative studies of the development of dynamics of the thoracolumbar** *Revista Biotemas*, 25 (2), junho de 2012 **115 Morfologia do fígado da paca vertebrae and the division of lobes of the liver in primates and humans.**, v.3. ed, 2007. p.3-125.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med (Berl)**, v. 76, n. 6, p. 402-12, May 1998. ISSN 0946-2716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625297> >.

PIÑA-ZENTELLA, R. M. et al. Lycopene Improves Diet-Mediated Recuperation in Rat Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Med Food**, v. 19, n. 6, p. 607-14, Jun 2016. ISSN 1557-7600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27214602> >.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S54-62, Feb 2006. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447271> >.

RAO, A. V. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 227, n. 10, p. 908-13, Nov 2002. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424333> >.

RERUP, C.; LUNDQUIST, I. Blood glucose level in mice. 1. Evaluation of a new technique of multiple serial sampling. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 52, n. 3, p. 357-67, Jul 1966. ISSN 0001-5598 (Print) 0001-5598.

RODRIGUES, E. et al. Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: application to carotenoids and structure-activity relationship. **Food Chem**, v. 135, n. 3, p. 2103-11, Dec 2012. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953962> >.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. **Forum Nutr**, v. 56, p. 35-7, 2003. ISSN 1660-0347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806788> >.

SANTODOMINGO-GARZON, T.; SWAIN, M. G. Role of NKT cells in autoimmune liver disease. **Autoimmun Rev**, v. 10, n. 12, p. 793-800, Oct 2011. ISSN 1568-9972.

SATO, S.; BURDETT, I.; HUGHES, R. C. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Exp Cell Res**, v. 207, n. 1, p. 8-18, Jul 1993. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8319774> >.

SATO, S.; HUGHES, R. C. Control of Mac-2 surface expression on murine macrophage cell lines. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 1, p. 216-21, Jan 1994. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8020558> >.

SCHUMANN, J. et al. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. **Am J Pathol**, v. 157, n. 5, p. 1671-83, Nov 2000. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440.

SHEIK ABDULAZEEZ, S.; THIRUVENGADAM, D. Effect of lycopene on oxidative stress induced during D-galactosamine/lipopolysaccharide-sensitized liver injury in rats. **Pharm Biol**, v. 51, n. 12, p. 1592-9, Dec 2013. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028090> >.

SHEN, F.; FAN, J. G. [Current status of gut microbiota and metagenome with nonalcoholic fatty liver disease]. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v. 21, n. 11, p. 811-4, Nov 2013. ISSN 1007-3418. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516926> >.

SIEGEL, A. B.; ZHU, A. X. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. **Cancer**, v. 115, n. 24, p. 5651-61, Dec 2009. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834957> >.

SLATTERY, M. L.; LUNDGREEN, A.; WOLFF, R. K. Dietary influence on MAPK-signaling pathways and risk of colon and rectal cancer. **Nutr Cancer**, v. 65, n. 5, p. 729-38, 2013. ISSN 0163-5581.

SRINIVASAN, M. et al. Lycopene: An antioxidant and radioprotector against gamma-radiation-induced cellular damages in cultured human lymphocytes. **Toxicology**, v. 262, n. 1, p. 43-9, Jul 2009. ISSN 1879-3185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450652> >.

SRIVASTAVA, A. et al. Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. **Handb Exp Pharmacol**, n. 196, p. 165-94, 2010. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020263> >.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. **Mol Biotechnol**, v. 37, n. 1, p. 26-30, Sep 2007. ISSN 1073-6085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914160> >.

_____. Photoprotection by dietary carotenoids: concept, mechanisms, evidence and future development. **Mol Nutr Food Res**, v. 56, n. 2, p. 287-95, Feb 2012. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953695> >.

STORY, E. N. et al. An update on the health effects of tomato lycopene. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 1, p. 189-210, 2010. ISSN 1941-1413 (Print)
1941-1421.

SUN, B.; KARIN, M. Obesity, inflammation, and liver cancer. **J Hepatol**, v. 56, n. 3, p. 704-13, Mar 2012. ISSN 0168-8278.

SUZUKI, Y. et al. Hepatocellular carcinoma patients with increased oxidative stress levels are prone to recurrence after curative treatment: a prospective case series study using the d-ROM test. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 5, p. 845-52, May 2013. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411687> >.

TAKESHIMA, M. et al. Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. **Cancer Sci**, v. 105, n. 3, p. 252-7, Mar 2014. ISSN 1347-9032.

TAN, H. L. et al. β -Carotene-9',10'-oxygenase status modulates the impact of dietary tomato and lycopene on hepatic nuclear receptor-, stress-, and metabolism-related gene expression in mice. **J Nutr**, v. 144, n. 4, p. 431-9, Apr 2014. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553694> >.

TEODORO, A. J. et al. Effect of lycopene on cell viability and cell cycle progression in human cancer cell lines. **Cancer Cell Int**, v. 12, n. 1, p. 36, 2012. ISSN 1475-2867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22866768> >.

_____. Lycopene isomerisation and storage in an in vitro model of murine hepatic stellate cells. **Eur J Nutr**, v. 48, n. 5, p. 261-8, Aug 2009. ISSN 1436-6215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19533199> >.

TSUTSUI, H.; NISHIGUCHI, S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 5, p. 7711-30, 2014. ISSN 1422-0067.

VANNI, E.; BUGIANESI, E.; SARACCO, G. Treatment of type 2 diabetes mellitus by viral eradication in chronic hepatitis C: Myth or reality? **Dig Liver Dis**, v. 48, n. 2, p. 105-11, Feb 2016. ISSN 1590-8658.

VOLAREVIC, V. et al. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1954-64, Jun 2012. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213244> >.

WANG, H. X. et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 2, p. 119-25, Jan 14 2012. ISSN 1007-9327.

WANG, Y. et al. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. **Int J Cancer**, v. 126, n. 8, p. 1788-96, Apr 15 2010. ISSN 0020-7136.

XU, J. et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 167, 2014.

XU, L. et al. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 attenuates concanavalin A-induced hepatitis by regulating macrophage. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 2, p. 329-36, Aug 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453106> >.

YAMAGUCHI, M. et al. Carotenoids modulate cytokine production in Peyer's patch cells ex vivo. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 15, p. 8566-72, Aug 2010. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20681644> >.

YANG, P. M. et al. Lycopene inhibits ICAM-1 expression and NF- κ B activation by Nrf2-regulated cell redox state in human retinal pigment epithelial cells. **Life Sci**, v. 155, p. 94-101, Jun 2016. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27155396> >.

YEAMAN, S. J.; KIRBY, J. A.; JONES, D. E. Autoreactive responses to pyruvate dehydrogenase complex in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. **Immunol Rev**, v. 174, p. 238-49, Apr 2000. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896.

YEFSAH-IDRES, A. et al. Hepatoprotective effects of lycopene on liver enzymes involved in methionine and xenobiotic metabolism in hyperhomocysteinemic rats. **Food Funct**, v. 7, n. 6, p. 2862-9, Jun 2016. ISSN 2042-650X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27232443> >.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch Biochem Biophys**, v. 385, n. 1, p. 20-7, Jan 1 2001. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

ZHOU, M. et al. Blocking TLR2 in vivo attenuates experimental hepatitis induced by concanavalin A in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 21, n. 1, p. 241-6, Jul 2014. ISSN 1878-1705. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830865> >.

ZOU, J. et al. Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 6, p. 1117-22, Jun 2013. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246157> >.