UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Pedro César Pádua Bonifácio

Papel da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática
após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos

Ribeirão Preto – SP

2021

Pedro César Pádua Bonifácio

Papel da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática
após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando S. Ramalho

Ribeirão Preto – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bonifacio, Pedro Cesar Padua

Papel da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática
após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos.
Ribeirão Preto, 2021

64 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Ramalho, Fernando Silva.

1.Isquemia. 2.Reperfusão. 3.Fígado. 4.Calgranulina B. 5. Estresse
oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BONIFACIO, P.P. Papel da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia
Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, e teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). (Processo: 88882.378573/2019-01).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, sobretudo meus pais, que tanto me apoiaram durante este caminho.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTO

Ao Professor Dr. Fernando Silva Ramalho, por gentilmente ter aberto as portas de seu laboratório e ter caminhado ao meu lado durante todas as etapas da elaboração deste trabalho, dispondo de seu tempo para ensinar o modelo cirúrgico e compartilhar demais experiências, que foram de grande importância para superar obstáculos que surgiram ao longo dessa jornada.

À Dr. Marlei Josiele Augusto, pelo cuidado com os ensaios bioquímicos aqui desenvolvidos, além de sua bondade e companheirismo durante todos os dias que trabalhamos juntos.

À Deisy Mara da Silva, pela grande habilidade e empenho para conseguir sempre os melhores resultados nas técnicas histológicas, além de sua amizade e bom humor ao longo de toda nossa convivência.

Aos meus colegas pós-graduandos, com quem pude dividir não somente o laboratório, mas também minhas alegrias e as frustrações inerentes dessa caminhada. Vocês foram essenciais para tornar os dias mais fáceis.

À todos os funcionários do Departamento de Patologia da FMRP, sobretudo à Camila Luca Gimenes, pela gentileza e dedicação em ajudar sempre que necessário.

À CAPES, pelo investimento e incentivo à pesquisa.

Agradeço também minha família, especialmente meus pais, que sempre estiveram comigo e com quem sempre pude contar. Pela generosidade, carinho e zelo que me permitiram chegar até aqui. Muito obrigado.

RESUMO

BONIFACIO, P.P. **Papel da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A lesão hepática por isquemia e reperfusão (I/R) pode ocorrer em situações clínicas variadas, mas sobretudo nas cirurgias complexas do fígado, como no transplante hepático e nas grandes hepatectomias. O desenvolvimento dessa lesão é resultado, principalmente, da resposta inflamatória e do estresse oxidativo que se instalam no parênquima hepático isquêmico. Por sua vez, a calgranulina B é uma proteína amplamente estudada devido a sua participação nos processos inflamatórios envolvendo tecidos nervosos, cardíacos e renais. Entretanto, estudos abordando a participação da calgranulina B no desenvolvimento de lesões hepáticas ainda são escassos. **Material e métodos:** Camundongos C57BL/6 selvagens (“wild type” - WT) e deficientes (“knock out” - KO) para a calgranulina B foram submetidos à lesão hepática por I/R normotérmica durante 90 minutos, ou cirurgia simulada. Os resultados referentes aos animais oriundos de ambos os grupos foram comparados quanto ao grau de lesão hepática (através das análises bioquímica e microscópica) e do estresse oxidativo hepáticos (dosagem de malondialdeído e glutathiona reduzida). **Resultados:** O grau de lesão hepática, bem como a magnitude do estresse oxidativo secundário à I/R normotérmica hepática foram estatisticamente semelhantes para os grupos WT e KO para a calgranulina B. **Conclusão:** Os resultados obtidos indicam que a deficiência em calgranulina B não produziu alterações significativas sobre a lesão parenquimatosa hepática pós-I/R normotérmica.

Unitermos: Isquemia, Reperfusão, Inflamação, Estresse Oxidativo, Calgranulina B.

ABSTRACT

BONIFACIO,P.P. **Role of calgranulin B on liver damage following normothermic ischemia and reperfusion in mice.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto,2021.

Introduction: Liver damage due to ischemia and reperfusion (I/R) can occur at different clinical occasions, but especially in major liver surgeries, such as hepatectomies and liver transplantation. The development of this lesion is mainly the result of the inflammatory response and oxidative stress in the liver parenchyma. In turn, calgranulin B is a protein widely studied in the pathophysiological development of inflammatory processes in cardiac, renal and nervous tissues, for example. However, studies involving his participation in the development of liver injuries are still scarce. **Material and methods:** C57BL/6 wild type (WT) and knockout (KO) mice for calgranulin B were submitted to liver damage by normothermic I/R during 90 minutes, or simulated surgery. The results were compared as to the degree of the lesion formed (through microscopic analysis); intensity of oxidative stress (MDA and GSH dosage) and inflammatory response (MPO levels). **Results:** The measurement of the degree of liver damage, as well as the oxidative stress caused by hepatic normothermic I / R were statistically similar to calgranulin B WT and KO groups. **Conclusion:** The results obtained indicate that the absence of calgranulin B did not cause significant effects in reduction of the liver damage on the hepatic parenchyma following normothermic I / R.

Keywords: Ischemia, Reperfusion, Inflammation, Oxidative Stress, Calgranulin B

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT= Alanina aminotransaminase

AST= Aspartato aminotransferase

CE= Células endoteliais

CES= Células endotelias sinusoidais

CK= Células de Kupffer

eNOS= Óxido nítrico sintase endotelial

GSH= Glutathiona reduzida

IR= Isquemia e reperfusão

IL-2= Interleucina 2

IL-10= Interleucina 10

iNOS= Óxido nítrico sintase induzida

MDA= Malondialdeído

MPO= Mieloperoxidase

NO= Óxido nítrico

ROS= Espécies reativas de oxigênio (do inglês- Reactive oxygen species)

SOD= Superóxido desmutase

TLR= o inglês- toll-like receptor

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 FÍGADO: ANATOMIA E FUNÇÃO	9
1.2 HISTOLOGIA	9
1.2.1 Hepatócitos.....	9
1.2.2 Células endoteliais sinusoidais (CES).....	10
1.2.3 Células de Kupffer	10
1.2.4 Células estreladas	11
1.3 CIRCULAÇÃO HEPÁTICA	11
1.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA HEPÁTICA	12
1.4.1 Constituintes Celulares	12
1.4.2. Consequências da Resposta Inflamatória	13
1.4.3 Produção de radicais livres	14
1.4.4. Apoptose.....	16
1.4.3. Necrose	19
1.5 PROTEÍNAS S100/CALGRANULINAS.....	20
1.6 ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA HEPÁTICA	22
1.7 INDICADORES DE LESÃO HEPÁTICA	26
1.7.1 ALT (alanina aminotransferase)	26
1.7.2 AST (aspartato aminotranferase)	27
1.7.3 Glutathiona reduzida (GSH).....	27
1.7.4 Mieloperoxidase (MPO)	28
1.7.5 Malondialdeído (MDA)	29
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. ANIMAIS	31
4.1.1 Ambiente	31
4.1.2 Delineamento experimental	31
4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	33
4.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE LESÃO HEPÁTICA	34
4.3.1 Aminotransferases	34
4.3.2 Histologia.....	34
4.4 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	35

4.4.1	Quantificação dos níveis hepáticos de malondialdeído (MDA)	35
4.4.2	Mensuração dos níveis hepáticos de glutathione reduzida (GSH).....	35
4.5	AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	36
4.5.1	Quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	36
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	37
5.1	MORTALIDADE PÓS-CIRÚRGICA	37
5.2	AVALIAÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA APÓS I/R	38
5.3	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	42
5.4	RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	44
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÃO.....	50
8	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 FÍGADO: ANATOMIA E FUNÇÃO

O fígado humano está localizado no quadrante abdominal superior direito e apresenta-se dividido em quatro lobos. Os lobos direito e esquerdo compõem a maior parcela do órgão e são separados pelo ligamento falciforme, responsável por prender a víscera à região ventral da parede abdominal e à porção inferior do diafragma. Os demais lobos, quadrado e caudado, estão localizados abaixo do lobo lateral direito, juntamente com a vesícula biliar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Entretanto, a depender da espécie, a anatomia pode variar. Roedores apresentam maior massa hepática em relação ao peso corporal total, quando comparados aos humanos. Enquanto nos homens encontra-se restrito ao quadrante abdominal direito, nos roedores o fígado pode ocupar toda a extensão da região subdiafragmática. (ARLIN; RENEE, 2018)

Como a maior glândula do corpo humano, o fígado desempenha importante papel no metabolismo de proteínas, carboidratos e compostos lipídicos. É também responsável pelo armazenamento de glicogênio e de vitaminas, neutralização de substâncias tóxicas e biotransformação de drogas e hormônios. (GUYTON, 1997)

1.2 HISTOLOGIA

1.2.1 Hepatócitos

O parênquima hepático é composto principalmente por hepatócitos, os quais correspondem a aproximadamente 80% do peso visceral. Estas células exibem forma poliédrica, cujos lados possuem cerca de 30 µm. Os hepatócitos

são responsáveis por funções que incluem o metabolismo e o armazenamento de carboidratos e lipídeos, além de realizarem intensa síntese proteica. Devido ao seu perfil funcional, o citoplasma é rico em organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). As demais células hepáticas, reconhecidas como células não parenquimatosas, incluem as células endoteliais sinusoidais (CES), células de Kupffer, células epiteliais biliares e células estreladas (NAKATANI, 2004).

1.2.2 Células endoteliais sinusoidais (CES)

São células pequenas, com apenas 7 μm de diâmetro, sendo responsáveis pelo revestimento da luz dos capilares sinusóides. Apresentam múltiplas fenestrações e ausência de lâmina basal, o que as mantêm separadas dos hepatócitos unicamente pelo espaço de Disse e favorecendo um fluxo bidirecional de macromoléculas entre os hepatócitos e o plasma. Quando estimuladas são capazes de efetuar endocitose e secreção de citocinas. (BRUNT *et al.*, 2014)

1.2.3 Células de Kupffer

São os macrófagos residentes no parênquima hepático. Por estarem localizadas nos capilares sinusóides juntamente com as CES, são responsáveis pela fagocitose de pequenas estruturas, como patógenos e moléculas resultantes do metabolismo hepático (BERTRAND, 2012). Por receber grande volume sanguíneo oriundo das regiões entéricas, o parênquima hepático exhibe a maior quantidade de macrófagos residentes do corpo. Além de realizar

fagocitose local, as células de Kupffer também secretam importantes citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) (LE COUTER *et al.*,2008).

1.2.4 Células estreladas

São células localizadas no espaço de Disse, cujo citoplasma exhibe projeções dendríticas características; possuem poucas organelas e um núcleo alongado (KIERSZENBAUM, 2013). As projeções dendríticas envolvem os capilares sinusóides e estabelecem comunicações com as demais células hepáticas, sobretudo hepatócitos, com os quais podem realizar trocas de substâncias. Citocinas e demais estímulos presentes no meio extracelular podem estimular as projeções dendríticas subendoteliais, as quais respondem regulando o fluxo sanguíneo nos capilares sinusoidais através da contração celular. Por estarem muito próximas a terminações nervosas presentes no espaço de Disse, também possuem a capacidade de regular respostas hormonais dependentes de estímulo nervoso. (FRIEDMAN, 2008; HELLERBRAND, 2013)

1.3 CIRCULAÇÃO HEPÁTICA

Por desempenhar intensa atividade metabólica, o fígado é reconhecido como um dos órgãos mais bem perfundidos do corpo humano – aproximadamente 25% do débito cardíaco irriga o parênquima hepático. Existem dois grandes vasos responsáveis pela perfusão do fígado: a artéria hepática e a veia porta. A drenagem, por sua vez, é realizada pelas veias

hepáticas para a veia cava inferior. A veia porta ramifica-se no interior do lóbulo hepático e, em conjunto com a artéria hepática, os canalículos biliares, vasos linfáticos e terminações nervosas, constitui o espaço porta. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999)

Em consequência da acentuada performance metabólica, os hepatócitos requerem grandes quantidades de oxigênio e de nutrientes. Por isso, situações que conduzem a um comprometimento do suprimento sanguíneo hepático resultam, geralmente, em importante dano hepatocelular. (SILVESTRE *et al.*, 2014)

1.4. RESPOSTA INFLAMATÓRIA HEPÁTICA

1.4.1 Constituintes Celulares

1.4.1.1 Neutrófilos

São granulócitos polimorfonucleares, com aproximadamente 10 µm de diâmetro. São as primeiras células a chegarem ao sítio inflamatório, sobretudo nos casos de infecção bacteriana (DELLMAN, H., 1982).

Seu citoplasma é rico em grânulos contendo enzimas digestivas, como fosfatases, peroxidases e hidrolases. São dotados de intensa capacidade fagocítica acompanhada, via de regra, de acentuado consumo de oxigênio. Exibem vida média curta em comparação aos demais elementos figurados do sangue. (CHEVILLE, 1980).

1.4.1.2 Macrófagos

Os macrófagos são derivados de células precursoras presentes na medula óssea que, após maturação, originarão os monócitos circulantes. Possuem capacidade migratória em resposta a agentes diversos à homeostase orgânica.

Secretam ativamente uma série de citocinas envolvidas na resposta inflamatória, como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), fator ativador de plaquetas (PAF), e fator quimiotático para neutrófilos (ROBBINS & COTRAN,1989).

1.4.1.3 Células Endoteliais

O endotélio desempenha importante papel na manutenção do tônus vascular ao secretar localmente diversos hormônios, com destaque para o óxido nítrico, tromboxanos e endotelinas. Participa ativamente da resposta inflamatória ao alterar a expressão de moléculas de aderência que atuam na interação com integrinas presentes nas membranas de neutrófilos e macrófagos (PANNEN BH *et al.*, 1998).

1.4.2. Consequências da Resposta Inflamatória

1.4.2.1 Migração celular

A ocorrência de lesão tecidual resulta em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular locais, favorecendo o extravasamento de plasma e de proteínas para o interstício. Com a viscosidade sanguínea aumentada, há redução da velocidade do fluxo, permitindo que componentes celulares se aproximem do endotélio vascular. (ROBBINS & COTRAN,1989)

Citocinas presentes no sítio inflamatório induzem a expressão de receptores na superfície de leucócitos capazes interagir com proteínas localizadas nas membranas das células endoteliais. Em seguida, há os fenômenos de rolamento e de adesão de leucócitos à parede do endotélio. Fatores quimioatraentes

promovem, na sequência, a transmigração de neutrófilos e de macrófagos através das junções entre as células endoteliais até a região da inflamação (ABBAS AK., 2006).

1.4.3 Produção de radicais livres

Compostos derivados do metabolismo do oxigênio podem ser encontrados em todos tecidos. Durante a respiração aeróbia ocorre redução de O_2 e formação de H_2O . Nesse processo, espécies intermediárias são geradas e recebem o nome de radicais livres: moléculas que apresentam elétrons desemparelhados em seus orbitais mais externos. Esta configuração eletrônica os torna extremamente reativos, devido à elevada instabilidade. O agente oxidante, então, recebe elétrons da estrutura que oxida, provocando a desconfiguração de sua morfologia normal. Os principais alvos celulares são as membranas lipoproteicas e o DNA. Dentre espécies de radicais oxidantes, a hidroxila foi a que apresentou maior potência lesiva para membranas biológicas (HALLIWELL *et al.*, 1992). Demais compostos formados são os radicais superóxidos (SOD), peróxido de hidrogênio e hidroperoxila.

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) está presente na maioria das células que realizam respiração aeróbica, sua formação ocorre após a redução de O_2 , reação processada principalmente pela ativação de neutrófilos. Apresenta pouca reatividade devido seu curto período de meia-vida, além de não atravessar membranas biológicas, sendo convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (OLSZEWER, 1995; ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado pela dismutação do superóxido ou adição de dois elétrons ao oxigênio. Por não apresentar elétrons desemparelhados em sua camada de valência, não pode ser considerado como um radical livre clássico. Entretanto, sua capacidade de interagir e atravessar membranas lipoproteicas permite uma maior reatividade com componentes estruturais celulares, sobretudo oxidando compostos sulfidrilas e desconfigurando a cadeia de DNA (FERREIRA *et al.*, 1997). Por sua vez, o radical hidroperoxila (HO_2) é formado pela protonação do radical superóxido pela adição do hidrogênio. Apresenta maior reatividade quando comparado ao superóxido, devido sua capacidade de iniciar interação com membranas lipoproteicas (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

O radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) é formado pela quebra da molécula de peróxido de hidrogênio, ou pela reação desta com o íon superóxido. Está entre os compostos derivados do metabolismo aeróbico com maior reatividade, podendo reagir facilmente com aminoácidos, DNA e moléculas de RNA, além de promover a lipoperóxidação de ácidos graxos presentes na membrana plasmática. Por apresentar meia-vida extremamente curta atua sobretudo no próprio local de sua produção, que inclui, principalmente, a cadeia transportadora de elétrons. Outras importantes fontes de geração de $\text{OH}^\cdot$ são a β -oxidação dos ácidos graxos por peroxissomos, além do sistema xantina-oxidase, que atua na conversão de hipoxantina em xantina através de reação enzimática (Fig. 1). (VALKO *et al.*, 2007)

A degradação de ATP e a redução de seus níveis no período de isquemia resulta na geração de AMP pela adenilato quinase promovendo acúmulo de hipoxantina intracelular. Por sua vez, hipoxantina combina-se com proteases ativadas durante a grande entrada de cálcio. O passo seguinte é a conversão de xantina desidrogenase para a forma oxidase. O O_2 que chega através do processo de reperfusão é usado, então, como aceptor de elétrons (no lugar de NADPH) e formação de O_2^- , altamente instável (SJODIN *et al.*, 1990).

Através de reações consecutivas, o superóxido (SOD) formado é convertido em peróxido de hidrogênio e este em radical hidroxil, pela atuação catalítica do íon ferroso liberado nos tecidos pela isquemia. Dessa forma a peroxidação lipídica é iniciada (GRACE PA., 1994).

Figura 1. Produção de agentes oxidantes e radicais livres através do sistema xantina/xantina-oxidase após privação sanguínea seguida de reperfusão. Adaptado de: MIRANDA, C. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. *Acta Cir. Bras.* 2004.

1.4.4. Apoptose

A apoptose é um processo altamente regulado geneticamente e dependente de ATP. Ocorre pela ativação das vias intrínsecas (mitocondrial) e extrínsecas (receptores presentes na membrana celular) das caspases, levando a célula a um processo de morte “limpa”. Diversos eventos fisiológicos normais envolvem a apoptose, principalmente durante os estágios da vida embrionária. Também está presente em quadros patológicos, como exposição celular a radiação e quimioterápicos. (GUJRAL., 2001).

Os estímulos que induzem o processo apoptótico podem ser originados por exemplo, através de danos à estrutura do DNA ou desbalanços no controle do ciclo celular. Fatores externos, como queda nos níveis de oxigenação do sangue, também podem ativar vias apoptóticas por meio de receptores de morte. Dessa forma, proteases presentes no citosol, conhecidas como caspases, são ativadas e iniciam a cascata de eventos de regulam a morte celular programada. A ativação de caspases ocorre através de clivagem da enzima inicial em regiões com a presença de ácido aspártico. Uma vez ativadas, as mesmas podem catalisar a conversão de demais representantes da família das caspases em suas conformações ativas, aumentando, assim, o sinal inicialmente recebido. O afinado controle do processo apoptótico deve-se, entre muitos fatores, a alta afinidade que as caspases possuem com substratos específicos. Os alvos incluem, principalmente, proteínas de reparo do DNA e da manutenção da arquitetura celular. (THOMPSON CB., 1999).

Entre os principais representantes do grupo de receptores de morte presentes na membrana celular estão componentes da família dos receptores para o fator de necrose tumoral (TNF), que encaminham sinais do meio externo até resíduos localizados na face interna da membrana plasmática, conhecidos

como domínios de morte (*death domain*). Hepatócitos apresentam receptores de morte celular do tipo Fas (CD95 ou APO-1) e são responsáveis pela manutenção da homeostase do parênquima hepático. O receptor Fas promove a ativação de caspase-8 durante as fases iniciais do processo apoptótico. Em condições fisiologicamente normais do fígado, Fas está expresso em baixas quantidades. Entretanto, ambientes com alto estresse oxidativo ou a ativação da proteína p-53 podem induzir uma maior expressão desses receptores. (GALLE PR *et al.*, 1995)

Fatores intracelulares como alterações no pH, liberação de espécies reativas de oxigênio ou aumento na concentração de cálcio podem ativar a morte celular dependente da mitocôndria. Em tais condições proteínas da família Bcl-2 (Bax e Bid) são translocadas do citoplasma celular para o interior das mitocôndrias, que liberam citocromo-c existente no espaço intermembranas para o citoplasma. Dessa forma citocromo-c consegue se ligar ao fator ativador de apoptose 1 e à pró-caspase 9. Na presença de ATP pode formar o complexo ativador da caspase-9, esta, por sua vez, ativa caspases efetoras (Fig. 2). (KAPLOWITZ *et al.*, 2004).

O controle da liberação de citocromo-c é realizado através da regulação de abertura ou fechamento de poros presentes na membrana mitocondrial. Os mesmos permanecem fechados por diferentes mecanismos, como presença de magnésio intracelular, expressão de superóxido dismutase mitocondrial e potencial elevado da membrana. Por sua vez, desbalanços que incluem: ligação em receptores Fas, TNF- α ou fator de crescimento transformador- β 1, induzem a abertura dos poros. Nesse processo perforina também pode atuar, facilitando a entrada de granzima B liberada por linfócitos T. Ademais, uma vez ativada,

caspase-8 consegue clivar proteínas Bid presentes no citoplasma. O componente formado pela quebra da proteína inicial liga-se, então, à membrana mitocondrial, aumentando sua permeabilidade (Fig. 2). (FELDMANN G. *et al.*, 2000).

Figura 2. Ativação da cascata apoptótica por vias extracelular e mitocondrial. Adaptado de KAPLOWITZ et al. (2004).

1.4.3. Necrose

Necrose é o processo de morte celular presente nos quadros patológicos, e, ao contrário da apoptose, ocorre sem qualquer controle tecidual e sem gasto energético. Os lisossomos das células em necrose sofrem ruptura, com liberação de enzimas, sobretudo hidrolases, que promovem autólise celular. Há edema

celular, em virtude da perda de equilíbrio osmótico, além do comprometimento das células adjacentes devido à lise das membranas celulares e extravasamento de seus conteúdos citoplasmáticos. Na sequência, há indução de resposta inflamatória com quimioatração de leucócitos. (MAJNO G., 1995)

Alterações microscópicas indicam a morte celular necrótica. Entre elas: alterações na afinidade citoplasmática para a coloração por H/E, que passa a apresentar eosinofia, principalmente devido a desnaturação do RNA citoplasmático. O núcleo torna-se visivelmente menor e mais denso, fenômeno conhecido por picnose. A fragmentação da cromática (cariólise) induz ao colapso nuclear (cariorexis). (FINK SL *et al.*, 2005).

Fatores químicos que provoquem desconfiguração na estrutura de proteínas ou na organização de lipomembranas; físicos, como extremos de temperatura e exposição à radiação ou agentes biológicos como toxinas de organismos patogênicos, por exemplo, representam as principais causas para o início de um processo irreversível de morte celular. (LEMASTERS JJ *et al.*, 1999).

1.5 PROTEÍNAS S100/CALGRANULINAS

A família de proteínas S100 é composta por aproximadamente vinte membros que possuem em comum uma região ligante de cálcio e baixo peso molecular (10–14 kDa). A proteína S100A8 também é conhecida como calgranulina A ou proteína mielóide-relacionada (MRP8), enquanto S100A9 recebe o nome de **calgranulina B** ou proteína MRP9. O heterodímero S100A8/A9 é denominado calprotectina (FOELL *et al.*, 2004). A proteína S100A12, por sua vez, apresenta sítios de ligação com RAGE (receptor

transmembranal semelhante à imunoglobulina) e cálcio. Essas três proteínas compõe a família das CALGRANULINAS. (OESTERLE, A. BOWMAN, 2015)

As calgranulinas são secretadas por granulócitos e monócitos, e exibem a capacidade de se ligarem a metais, como os cátions zinco e manganês, impedindo que os mesmos sejam captados por patógenos, sobretudo bactérias, retardando sua proliferação (KOY, M. *et al.*, 2013).

As calgranulinas podem permanecer dentro das células ou serem secretadas para o espaço extracelular, participando de diferentes atividades celulares como proliferação, diferenciação e apoptose, da formação do citoesqueleto promovendo a manutenção da arquitetura celular e do tráfego vesicular interno, além de regular processos inflamatórios (DONATO *et al.*, 2013).

Quando ativados, neutrófilos, monócitos e células dendríticas passam a secretar parte de suas proteínas localmente, incluindo as calgranulinas A e B, pois ambas perfazem quantidades significativas de seus conteúdos citoplasmáticos (AVERILL *et al.*, 2012). Dessa forma, as calgranulinas são capazes de atuar como citocinas sobre receptores de superfície celular, principalmente receptores do tipo Toll-4 (TLR-4) e RAGE. Os membros da família S100 são identificados como os principais representantes dos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) na resposta inflamatória asséptica (VOGL T. *et al.*, 2007).

Calgranulina B pode atuar sobre os próprios tipos celulares responsáveis por sua secreção (secreção autócrina). Os neutrófilos são estimulados a expressarem mediadores pró-inflamatórios, realizarem diapedese e fagocitose. Em monócitos também há estímulo para migração tecidual e alteração para o perfil pró-inflamatório. A maior atividade desse grupo celular pode estar relacionada com a inflamação tecidual observada em doenças crônicas, como a aterosclerose por exemplo. (AVERILL, M; KERKHOFF, 2011)

Em condições normais, as concentrações de calprotectina no soro humano situam-se abaixo de 1 µg/ml. Entretanto, doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, fibrose cística, alterações brônquicas e alguns tipos de tumores podem fazer com que os valores séricos de calprotectina estejam mais elevados, sendo considerada um marcador de investigação patológica. (POULLIS A. *et al.*, 2003; GHAVAMI S. *et al.*, 2004).

1.6 ISQUEMIA E REPERFUSÃO NORMOTÉRMICA HEPÁTICA

A interrupção do fluxo sanguíneo hepático por meio da manobra de Pringle é uma prática comum durante grandes cirurgias envolvendo o fígado. Nessa manobra, os vasos aferentes são ocluídos na altura do pedículo hepático, evitando, assim, hemorragias (PRINGLE, 1908). Entretanto, o bloqueio do fluxo sanguíneo resulta em intensa hipóxia local, responsável pela ativação de diferentes vias de sinalização relacionadas ao estresse celular. O reestabelecimento do aporte sanguíneo ao final do procedimento cirúrgico (reperfusão) acentua profundamente o dano hepatocelular. Ao final, o parênquima hepático apresenta lesões características do processo de isquemia e reperfusão (I/R) normotérmica (VAN RIEL *et al.*, 2016).

O funcionamento normal das mitocôndrias torna-se comprometido em consequência do processo isquêmico, ocorrendo, dessa forma, a interrupção da respiração celular na fase da fosforilação oxidativa, uma vez que o oxigênio não atuará comoceptor final dos elétrons. Como consequência, a produção de trifosfato de adenosina (ATP) fica comprometida. A depleção da reserva energética dos hepatócitos os conduz para o desequilíbrio do gradiente iônico transmembranaral dos cátions sódio (Na^+) e potássio (k^+). O bloqueio da ATPase Na^+/k^+ provoca acúmulo de Na^+ no citoplasma dos hepatócitos e consequente influxo de água. A homeostase de cálcio (Ca^{+2}) também é quebrada e ocorre a

desorganização do citoesqueleto (KUKAN & HADDAD., 2001).

Alguns eventos celulares característicos de formação das lesões permitem a divisão do período de reperfusão em etapas inicial e tardia. A fase inicial compreende às primeiras 2 a 6 horas pós-reperfusão. Durante este período, ocorre a ativação das células de Kupffer e o desenvolvimento de estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species” – ROS) são responsáveis pelo dano tecidual local. As ROS apresentam a capacidade de reagir com os fosfolipídios da membrana plasmática através da peroxidação lipídica, afetando, por este mecanismo, tanto CES, quanto hepatócitos. Além disso, as ROS atuam como agentes de sinalização pró-inflamatória, estimulando a expressão de moléculas de adesão vascular e de citocinas pró-inflamatórias (JAESCHKE, 2003; FAN *et al.*, 1999).

A peroxidação lipídica é considerada como uma das principais formas de dano celular mediado por ROS. Nesse processo, há clivagem do peróxido de hidrogênio e formação do radical hidroxila, que inicia uma cadeia de reações culminando na destruição dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. A agressão do oxigênio reativo às lipoproteínas da membrana resulta na produção de diversos compostos oxidados, com destaque para o malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal (4HNE) e a nitrotirosina, os quais atuam como quimioatraentes das células inflamatórias, potencializando a resposta inflamatória (JAESCHKE & WOOLBRIGHT., 2012).

A reperfusão induz as CES a produzirem menores quantidades de óxido nítrico (NO) assim como aumentarem a liberação de ROS e citocinas pró-inflamatórias (CARDEN & GRANGER, 2000). O NO é um radical livre gasoso que participa como mediador primário da lesão hepática, mas também atua como fator de proteção aos hepatócitos enquanto promove a vasodilatação sinusoidal.

A produção de NO está diretamente relacionada ao funcionamento adequado da enzima óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS). Entretanto, sua

atividade encontra-se comprometida devido aos baixos níveis de oxigênio e de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) dos períodos de hipóxia. A consequência é a queda na concentração de NO nos tecidos afetados, favorecendo a vasoconstrição sinusoidal. Enquanto isso, a maior entrada de Ca^{+2} nas CES durante a reperfusão induz a produção excessiva de NO pela óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), intensificando o estresse nitrosativo por meio da síntese de peroxinitrito (KARATZAS *et al.*, 2014).

O ambiente hipóxico, caracterizado por elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres, propicia que CES, células de Kupffer e células estreladas secretem quantidades consideráveis de endotelina, uma proteína com grande atividade vasoconstrictora (McCUSKEY *et al.*, 1996). A vasoconstrição crescente oclui os sinusóides durante a reperfusão, o que compromete a circulação sanguínea e aumenta o tempo de hipóxia no parênquima dos lóbulos hepáticos, tornando a isquemia mais lesiva (CLEMENS & ZHANG, 1999; VOLLMAR *et al.*, 1994).

Entre 6 e 48h posteriores ao retorno da circulação sanguínea inicia-se a fase tardia da reperfusão. Observa-se eventos característicos, como a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos para o parênquima hepático, sobretudo devido à atividade pleiotrópica de $\text{TNF-}\alpha$ secretado pelas células de Kupffer ativadas durante a hipóxia. O $\text{TNF-}\alpha$ também participa da hiperexpressão de moléculas de adesão nas membranas das CES. Os macrófagos residentes no fígado são ainda responsáveis pela secreção de interleucina ($\text{IL-1}\beta$), cuja intensa atividade pró-inflamatória induz a produção de ROS por neutrófilos, além de estimular a síntese de $\text{TNF-}\alpha$. As citocinas quimioatrativas para neutrófilos, especialmente as CXC quimiocinas, atuam como fatores cruciais na ligação da fase inicial de ativação das células de Kupffer à fase tardia da lesão hepática mediada por neutrófilos. Uma vez recrutados para o interior do interstício hepático, os neutrófilos secretam substâncias

extremamente nocivas aos hepatócitos, como ROS e proteases, exacerbando, desta forma, o dano parenquimatoso hepático (TEOH & FARRELL, 2003; KARATZAS *et al.*, 2014).

A ativação das vias indutoras de dano tecidual promove a morte celular, porém não há consenso com relação ao tipo predominante de morte celular nas situações de isquemia e reperfusão hepáticas. Sabe-se que, tanto apoptose quanto a necrose oncótica, compartilham uma cascata de eventos: os poros da membrana mitocondrial interna são abertos levando a um aumento da permeabilidade da membrana, edema e perda de função mitocondrial. A caracterização do tipo de morte celular mais prevalente, necrose ou apoptose, dependerá principalmente do grau e do tempo em que tal agressão atuou sobre o tecido. Danos mais graves ao parênquima hepático, na maior parte das vezes, resultam em necrose tecidual. Levando em consideração que a sinalização pró-apoptótica exige gasto energético e que o parênquima hepático encontra-se depletado de seus estoques intracelulares de ATP devido à hipóxia, a sinalização apoptótica encontra-se bloqueada, e a morte celular ocorre principalmente por meio de necrose nos quadros isquêmicos (GUJRAL *et al.*, 2001; CASILLAS-RAMÍREZ *et al.*, 2006).

1.7 INDICADORES DE LESÃO HEPÁTICA

O dano hepático pode ser mensurado através de compostos liberados na corrente sanguínea provenientes do rompimento de células, principalmente hepatócitos. Os valores observados podem indicar o tempo e tamanho das lesões (dano agudo ou crônico) e, em associação com demais achados clínicos, indicar a presença de patologias hepáticas. (THALL *et al.*, 2015). Dentre os principais mediadores estão:

1.7.1 ALT (alanina aminotransferase)

Também conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), a ALT está presente no citoplasma dos hepatócitos, sendo responsável por realizar a transaminação da alanina e do 2-cetoglutarato a piruvato e glutamato. Quando lesionado de forma irreversível, o hepatócito sofre ruptura de sua membrana, com exteriorização do seu conteúdo. Dessa forma, a presença de ALT no plasma circulante acima dos níveis basais indica comprometimento hepatocelular (THRALL, 2015). A ALT não é uma enzima exclusiva dos hepatócitos. Também pode ser encontrada em células musculares (estriadas e cardíacas) e em eritrócitos, embora em menores quantidades. Assim, danos a esses tipos celulares elevam moderadamente a concentração de ALT circulante, quando comparado aos valores normais. A mensuração de ALT plasmática pode indicar uma elevação compatível com o grau da lesão e ser um fator investigativo da presença de inflamações e danos resultantes de hipóxia ao parenquima hepático. (GONZALEZ; SILVA, 2006)

1.7.2 AST (aspartato aminotransferase)

Também conhecida como transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), a AST induz a transaminação do aspartato e do 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato. A AST é encontrada no citoplasma dos hepatócitos, assim como a ALT. Entretanto, apresenta menor especificidade hepática quando comparada a enzima descrita anteriormente. Por estar presente em maiores quantidades no citosol das células musculares, os níveis plasmáticos de AST podem estar elevados como consequência de lesão muscular decorrente da atividade física intensa, por exemplo. Por apresentar meia vida curta, funciona como marcador da fase aguda da inflamação tecidual. (GONZALEZ; SILVA, 2006).

1.7.3 Glutationa reduzida

A glutathione é um tripeptídeo (L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) que pode estar sob as formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) no organismo e apresenta características antioxidantes (TOWNSEND *et al.*, 2003). Sua presença dentro de mitocôndrias mostra-se de extrema importância para o funcionamento das mesmas, bem como para a manutenção da homeostase tecidual, ao passo que realiza a eliminação de ROS gerado durante o metabolismo celular. (NEUMAN, 2004). Variações significativas nas concentrações de glutathione podem indicar disfunções causadas por infecções ou administração de drogas que alteram a metabolização do oxigênio, por exemplo. (HALL, R., 1986)

Os ácidos graxos presentes nas membranas celulares são alvos para o ataque de radicais livres presentes no meio. Os danos resultantes podem estar envolvidos com o surgimento de doenças relacionadas ao desequilíbrio do sistema de defesa enzimático formado por glutathione (OBERLEY, T., 1997). A GSH pode oferecer evidências bioquímicas da regulação antioxidante nos tecidos, bem como o estado de lipoperoxidação que associado a demais fatores, comprovem o funcionamento regular hepático (ROVER, L., *et al.* 2000).

1.7.4 Mieloperoxidase

A enzima mieloperoxidase (MPO) é o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Apresenta-se na forma de dois dímeros unidos por uma ligação entre os radicais sulfeto. Cada dímero apresentando uma cadeia leve e outra pesada, totalizando o peso molecular de 144 kDa. Quando estimulados, os neutrófilos liberam seus grânulos no interstício tecidual. Assim, a MPO participa da defesa imune inata contra diferentes agentes. (HANSSON M., *et al.* 2006)

A mieloperoxidase participa ativamente do desenvolvimento do ambiente inflamatório. Reagindo com o peróxido de hidrogênio, a MPO forma compostos

oxidantes e radicais livres que atuam contra agentes infecciosos, como bactérias e demais patógenos. Entretanto, radicais livres recém-formados podem também atuar sobre o tecido do hospedeiro.(NICHOLLS SJ; BRENNAN ML, 2003).

1.7.5 Malondialdeído

O malondialdeído (MDA) é um dialdeído de baixo peso molecular e de cadeia curta, sendo amplamente utilizado como um marcador de estresse oxidativo (DRAPER; HADLEY, 1990). Forma-se a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados com três ou mais duplas ligações. Também pode ser formado enzimaticamente, como resultado da reação da ciclooxigenase no metabolismo das prostaglandinas (DRAPER; HADLEY, 1986). O malondialdeído pode interagir com a estrutura do DNA e funcionar como fator mutagênico (WANG, M. *et al.*, 2002). A monitoração dos níveis de MDA foi descrita como um importante indicador de dano tecidual resultante de injúria pós-isquêmica (DIPAK, K., 2002).

2 Justificativa

A lesão hepática secundária à I/R representa uma complicação bastante presente nas grandes cirurgias hepáticas. A intensa resposta inflamatória aguda e o estresse oxidativo produzidos pela liberação de ROS são confirmados como importantes fatores na patogenia da lesão por I/R.

Considerando as calgranulinas como um relevante grupo de moléculas reguladoras da resposta inflamatória frente a agentes infecciosos, além de interferir no desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes e

crônicas, conjecturou-se se a calgranulina B poderia participar no processo inflamatório agudo asséptico induzido pela isquemia e reperfusão hepática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da calgranulina B no desenvolvimento da lesão hepática em modelo experimental de I/R normotérmica em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a sobrevivência de camundongos “selvagens” (wild type – WT) e deficientes (knockout - KO) em calgranulina B após procedimento de indução de I/R normotérmica parcial hepática.

Avaliar e comparar o dano parenquimatoso hepático de camundongos “selvagens” (WT) e deficientes (KO) em calgranulina B após indução de I/R normotérmica parcial hepática.

Quantificar e comparar as concentrações de aminotransferases séricas de animais “selvagens” (WT) e deficientes (KO) em calgranulina B após indução de I/R normotérmica parcial hepática.

Mensurar o estresse oxidativo hepático dos animais oriundos dos grupos experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

4.1.1 Ambiente

Camundongos C57BL/6 machos (20 ± 3 g de peso corporal) foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclos luz-escuro de 12 horas, em caixas de polipropileno e alimentados com ração padrão no Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Todos os animais foram adaptados às condições acima por no mínimo uma semana antes do início dos experimentos. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (processo nº 151/2018).

4.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

1. **Sham** (n=6) – Os animais foram submetidos à anestesia geral com cetamina (10 mg/kg de peso corporal) e xilazina (5 mg/kg de peso corporal), e à cirurgia simulada (laparotomia, manipulação das vísceras e sutura da parede abdominal). A eutanásia dos animais foi realizada sob anestesia geral seis horas após a cirurgia simulada.
2. **Grupo Isquemia / Reperusão WT** (n=15) – camundongos “selvagens” (“wild-type” – WT) foram submetidos a 90 minutos de isquemia normotérmica dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo conforme procedimento descrito abaixo. Após recuperação anestésica, foi realizada hidratação por infusão subcutânea de 1ml de solução salina 0,9%. Os animais foram

submetidos à eutanásia sob anestesia geral seis horas após o início da reperfusion hepática.

3. **Grupo Isquemia / Reperfusion KO** (n=6) – camundongos deficientes (“*knockout*” - KO) em calgranulina B foram submetidos a 90 minutos de isquemia normotérmica dos lobos hepáticos lateral esquerdo e mediano. Após recuperação anestésica, foi realizada hidratação por infusão subcutânea de 1ml de solução salina 0,9%. Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia seis horas após o início da reperfusion hepática.

Esquema do delineamento experimental

Figura 3. Delineamento experimental – diferentes grupos experimentais, respectivos procedimentos, e período de isquemia normotérmica seguido por reperfusion.

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE INDUÇÃO DA ISQUEMIA HEPÁTICA

Os animais foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg de peso corporal) e cetamina (10 mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal, e mantidos em decúbito dorsal. Após laparotomia mediana, foi realizada a instalação de um clipe metálico nos pedículos dos lobos mediano e lateral esquerdo para indução de isquemia hepática normotérmica. Nesse modelo, a congestão intestinal é evitada devido à preservação do fluxo sanguíneo através dos lobos hepáticos lateral direito e caudado. Ao final de **90 minutos de isquemia normotérmica**, o clipe metálico foi removido, permitindo a reperfusão dos lobos mediano e lateral esquerdo. A parede abdominal foi suturada e a analgesia pós-operatória foi realizada com tramadol (10mg/kg) por via subcutânea, em dose única, imediatamente após recuperação anestésica.

Figura 4. Procedimento cirúrgico de indução de isquemia hepática. A: abertura da parede abdominal por incisão xifoumbilical; B: identificação e separação dos lobos hepáticos lateral esquerdo e mediano (*); C: indução de isquemia hepática normotérmica por meio da instalação de um clipe metálico nos pedículos vasculares dos lobos lateral esquerdo e mediano.

Os animais foram mantidos em decúbito ventral sobre placa aquecida (37°C) até completa recuperação da anestesia, quando foi permitido livre acesso à água e à alimentação. Completadas **seis horas após a reperfusão**, os animais foram novamente anestesiados e submetidos à eutanásia. Foi realizada a punção da veia cava inferior para coleta de sangue, seguida de ressecção dos lobos hepáticos isquêmicos (lobos mediano e lateral esquerdo). A hemorragia advinda da hepatectomia foi suficiente para conduzir os animais ao óbito. Foram coletados fragmentos hepáticos para avaliação do grau da lesão parenquimatosa.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 minutos, e o plasma estocado a -80°C. As amostras hepáticas foram resfriadas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C, ou fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas e incluídas em blocos de parafina.

4.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE LESÃO HEPÁTICA

4.2.1 Aminotransferases – a dosagem das atividades das aminotransferases alanina (ALT) e aspartato (AST) foram realizadas utilizando-se kit comercial (Analisa Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

4.2.2 Histologia – a intensidade da lesão hepática foi avaliada em preparações histológicas coradas por hematoxilina/eosina (H&E) por meio da análise de 30 campos microscópicos em aumento de 200x. As avaliações seguiram o seguinte escore de dano parenquimatoso (escore necroinflamatório): Grau 0 – mínima ou nenhuma evidência de lesão hepatocelular; Grau 1 – lesão discreta representada por vacuolização citoplasmática e picnose nuclear focal; Grau 2 –

lesão moderada a grave, evidenciada por picnose nuclear difusa, hipereosinofilia citoplasmática e perda dos contornos celulares; Grau 3 – necrose extensa com desintegração dos cordões de hepatócitos, infiltrado neutrofílico e hemorragia (SERAFIN *et al.*, 2002).

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.1 Quantificação dos níveis hepáticos de malondialdeído (MDA)

Os fragmentos hepáticos foram porcionados em amostras de 200 mg e posteriormente homogeneizados em tampão fosfato de sódio, seguindo para centrifugação (5 min / 4000 rpm) .Posteriormente, em 200 uL do sobrenadante obtido na etapa anterior foram adicionados metanol e 1-metil-2-fenilindol perfazendo o volume de 650 uL. 150 uL de ácido hidrocloreídrico (40%) foram adicionados à mistura que estava em reação. O produto final foi encubado por 50 minutos a 45°C e centrifugados, posteriormente, durante 5 minutos. Para a curva padrão de MDA foi empregada a hidrólise de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano em ácido sulfúrico (1%). A leitura da absorbância foi executada com o comprimento de onda de 586 nm. Os resultados foram obtidos em nanomoles de MDA por peso da amostra em gramas (nmol / g amostra).

4.3.2 Mensuração dos níveis hepáticos de glutathiona reduzida (GSH)

A quantificação dos níveis hepatocelulares de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada utilizando 50 mg de amostra de fígado homogeneizado em solução de EDTA (0,02 M). Com uma alíquota deste produto foi obtido o valor para a concentração proteica. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água miliQ juntamente com 0,25 mL de ácido tricloroacético em uma amostra de 1,25 mL do homogenato, seguido por repouso durante 15 minutos. A amostra foi, então, centrifugada (15 min./4000rpm).

1 mL do sobrenadante obtido foi transferido para um tubo, onde foram incluídos 2 mL de solução Tris-HCL (0,4M). Após repouso de 5 minutos foi realizada a leitura de absorbância em comprimento de onda de 412 nm. Os valores foram obtidos em nanomoles de GSH por miligrama de proteína (nmol / mg proteína).

4.4 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO HEPÁTICO

4.4.1 Quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

As amostras teciduais hepáticas (100 mg) foram homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato I e centrifugadas (15 min / 3000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 5 ml de solução de NaCl 0,2% (para promover a lise osmótica). O volume de 10 ml foi completado com NaCl 1,6% e centrifugado (15 min / 3000 rpm). O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspensionado em 1 ml de tampão fosfato contendo 0.5% de HTBA (brometo de hexa-1,6-bis-diciltrimetilamônio). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas à 60°C, por 3 vezes consecutivas. Posteriormente foram encubadas, durante 2 horas, à 60 °C e centrifugadas por (20 min / 4000 rpm). 200 uL do sobrenadante foram coletados para dosagem da MPO, acrescentando 200 uL de TMB (3,3',5,5';-tetrametilbenzidina). No tempo zero foi acrescentado 1,4 ml de tampão fosfato III com H₂O₂ (0,05%) e a cinética enzimática foi determinada obtendo as absorbâncias a cada 15 segundos durante 5 minutos no comprimento de onda de 630 nm. O sobrenadante restante foi empregado para quantificação proteica pelo método de Bradford. A unidade enzimática foi determinada como a quantidade de enzima que

produz aumento de uma unidade de absorbância por minuto. Os valores foram expressos em U/mg PT x 10⁻⁴.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Dada à natureza das variáveis, as comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou a análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn quando a hipótese de nulidade foi rejeitada. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados significantes. A análise estatística foi realizada com o auxílio de um microcomputador equipado com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 MORTALIDADE PÓS-CIRÚRGICA

A quantificação das mortes ocorridas dentro dos grupos experimentais, em diferentes momentos do procedimento cirúrgico (durante a isquemia ou após a reperusão) foi realizada como um parâmetro indicador do processo de padronização do procedimento cirúrgico, evitando que possíveis eventos relacionados ao ato cirúrgico interferissem nos resultados e nas análises posteriores. Não foram observadas mortes nos grupos cirurgia simulada (SHAM) e deficientes em calgranulina B (KO). Apenas um óbito ocorreu no grupo dos animais “selvagens” (WT), sem, entretanto, resultar em diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1).

TAXA DE MORTALIDADE					
Grupos experimentais	Número de animais	ÓBITOS isquemia	ÓBITOS pós-reperfusão	ÓBITOS TOTAIS	%
SHAM	06	--	--	00	00
WT	15	00	01	01	6,7
KO	06	00	00	00	00

Tabela 1. Taxas de mortalidade observadas nos camundongos dos grupos Cirurgia simulada (Sham), e grupos isquemia/reperfusão (I/R) em animais “selvagens” (WT) e animais deficientes em calgranulina B (KO).

5.2 AVALIAÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O dano parenquimatoso hepático foi mensurado através da avaliação dos níveis séricos das aminotransferases ALT e AST. Os resultados das dosagens de ALT e AST indicam significativa elevação nos níveis séricos de ambas as aminotransferases dos animais submetidos à I/R hepática, quando comparados aos animais que passaram apenas por cirurgia simulada (SHAM) (ALT: $28,2 \pm 3$; AST: $32,8 \pm 5$). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos das aminotransferases dos grupos de animais “selvagens” (WT) (ALT: 1.832 ± 40 ; AST: 3.332 ± 95) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) (ALT: 1.764 ± 67 ; AST: 3.214 ± 202). (Fig. 5)

Figura 5. Representação gráfica dos valores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) observados no grupo submetido à cirurgia simulada (Sham) e nos grupos de animais “selvagens” (WT) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) submetidos a isquemia hepática normotérmica por 90 minutos, seguida de reperusão. Os valores são mostrados como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ - Sham x WT; Sham x KO.

A intensidade da lesão parenquimatosa hepática foi também mensurada por exame histopatológico utilizando-se uma escala padronizada de escores, os quais variavam entre 0 (nenhum indício de lesão tecidual) até 3 (lesão grave com focos de necrose coagulativa e áreas de hemorragia). Animais submetidos à cirurgia simulada (SHAM) não apresentaram lesão parenquimatosa hepática. Por outro lado, a isquemia normotérmica seguida por reperusão resultou em necrose coagulativa hepatocelular nas imediações da veia centrolobular (zona 3 do ácino hepático), associada a congestão, hemorragia e desintegração dos cordões de hepatócitos (Fig. 6).

Figura 6. Fotomicrografias representativas do parenquima hepático do grupo submetido à cirurgia simulada (Sham), e dos grupos de animais “selvagens” (WT) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) submetidos à isquemia hepática durante 90 minutos, seguida de reperusão. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (aumento de 200x). A I/R normotérmica determinou extensas áreas de necrose coagulativa pericentral (C e E), associadas a congestão sinusoidal, hemorragia e desintegração dos cordões de hepatócitos (D e F). Os animais submetidos a cirurgia simulada não exibiram dano parenquimatoso hepático (A e B).

A mensuração do escore de dano parenquimatoso hepático (escore necroinflamatório) nos cortes histológicos indicou ausência de lesão no grupo cirurgia simulada (SHAM), enquanto o grupo de animais “selvagens” (WT) exibiu escore médio de 2,4 ($2,4 \pm 0,2$) e o grupo de animais deficientes em calgranulina B (KO) apresentou escore médio de 2,1 ($2,1 \pm 0,1$), numa escala variando entre zero (parênquima hepático normal) e 3 (extensas áreas de necrose aliada a focos de hemorragia) (Fig. 7).

Figura 7. Representação gráfica do escore necroinflamatório obtido por meio da análise de cortes histológicos hepáticos de animais do grupo cirurgia simulada (Sham), e dos grupos de animais “selvagens” (WT) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) submetidos à isquemia hepática normotérmica por 90 minutos, seguida de reperusão. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M.; * $p < 0,05$ - Sham x WT; Sham x KO.

5.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

O estresse oxidativo foi mensurado por meio da dosagem de malondialdeído (MDA) no parênquima hepático. Os valores mais elevados foram observados nos grupos submetidos à I/R normotérmica. Animais “selvagens” (WT) apresentaram média de 565,4 nmol/g ($565,4 \pm 23$), enquanto o grupo deficiente para calgranulina B exibiu um valor médio de 573,9 nmol/g ($573,9 \pm 51$), não sendo observada diferença estatisticamente significativa. Por sua vez, o grupo Sham apresentou valor médio de 31,3 nmol/g ($31,3 \pm 5,3$), compatível com o estado basal de lipoperoxidação das membranas celulares (Fig. 8).

Figura 8. Representação gráfica dos valores de MDA obtidos por meio de análise das amostras hepáticas oriundas de animais do grupo cirurgia simulada (Sham), e dos grupos de animais “selvagens” (WT) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) submetidos à isquemia hepática normotérmica por 90 minutos, seguida de reperusão. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M; * $p < 0,05$ - Sham x WT; Sham x KO.

A intensidade do estresse oxidativo hepático foi também avaliada por meio da dosagem dos níveis hepáticos de glutathiona reduzida (GSH). Foram observadas concentrações reduzidas de GSH no fígado dos animais submetidos à I/R normotérmica, indicando uma maior produção de ROS nesses animais, quando comparados ao grupo Sham. Neste grupo, os níveis hepáticos de GSH ($3.925,60 \pm 42,30$) mostraram-se significativamente mais elevados ($p < 0,05$) em comparação aos valores obtidos das amostras hepáticas oriundas dos animais “selvagens” (WT) ($1.057,06 \pm 145,27$) e dos animais deficientes em calgranulina B (KO) ($1.037,67 \pm 353,46$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT e KO (Fig. 9).

Figura 9. Representação gráfica dos valores de GSH obtidos por meio de análise das amostras hepáticas oriundas de animais do grupo cirurgia simulada (Sham), e dos grupos de animais “selvagens” (WT) e de animais deficientes em calgranulina B (KO) submetidos à isquemia hepática normotérmica por 90 minutos, seguida de reperusão. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M; * $p < 0,05$ - Sham x WT; Sham x KO.

5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA HEPÁTICA

As concentrações hepáticas da enzima mieloperoxidase (MPO), um indicador de magnitude da resposta inflamatória, foram mais elevadas ($p < 0,05$) nos animais submetidos à I/R normotérmica, quando comparados aos animais submetidos à cirurgia simulada (SHAM) ($2,1 \times 10^{-9} \pm 0,2 \times 10^{-9}$). Adicionalmente, foram observados maiores níveis de MPO ($p < 0,05$) nos fígados de animais do grupo “selvagem” (WT) ($13 \times 10^{-9} \pm 2 \times 10^{-9}$) em comparação aos fígados de animais deficientes em calgranulina B (KO) ($4,9 \times 10^{-9} \pm 0,1 \times 10^{-9}$) (Fig. 10).

Figura 10. Representação gráfica dos valores de MPO obtidos por meio de análise das amostras hepáticas de animais do grupo cirurgia simulada (Sham), e dos grupos de animais “selvagens” (WT) e deficientes em calgranulina B (KO) submetidos à isquemia hepática normotérmica por 90 minutos, seguida de reperfusão. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M; * $p < 0,05$ - Sham x WT; * $p < 0,05$ - WT x KO.

6 DISCUSSÃO

Lesões parenquimatosas hepáticas decorrentes de eventos isquêmicos seguidos por reperfusão representam um importante agravante aos procedimentos cirúrgicos envolvendo o fígado. No presente estudo, a indução de isquemia normotérmica hepática parcial durante 90 minutos não resultou em aumento significativo da taxa de mortalidade pós-operatória, quando comparada à cirurgia simulada, o que é de grande importância para a eliminação de possíveis eventos relacionados ao ato cirúrgico - complicações anestésicas, hemorragias, etc. - na análise comparativa da mortalidade dos animais. O tempo elevado de permanência isquêmica foi possível graças ao bloqueio apenas parcial do fluxo que adentrava ao parênquima hepático, o procedimento foi viável devido à divisão anatômica do fígado de camundongos. Como demonstrado por Mackenzie e colaboradores (1997), em modelos animais onde a interrupção do fluxo sanguíneo não pode ser setorizada o bloqueio total de irrigação ao parênquima hepático resulta em óbitos de todos indivíduos da amostra em poucos minutos.

O tempo em que os hepatócitos permanecem em hipóxia também deve ser levado em consideração para avaliar a intensidade do dano hepático instalado. Noventa minutos de isquemia hepática parcial foram capazes de induzir intensa resposta inflamatória aguda no parênquima hepático, compatível com os resultados obtidos por outros autores demonstrando que, a partir desse tempo, os hepatócitos estariam submetidos à condições inviáveis para a manutenção de seu metabolismo, evoluindo para o processo de morte celular (PERALTA C. *et al.*, 2019). Desta forma, garantindo o padrão cirúrgico em todos os animais, é possível inferir que as diferenças observadas nos parâmetros

avaliados, quando presentes, ocorreram exclusivamente em virtude das consequências decorrentes da própria lesão por I/R.

Os valores séricos das aminotransferases representam um importante indicador de comprometimento hepático, como descrito por Baptista e colaboradores (1999). Tendo em vista que a ALT encontra-se localizada principalmente no citoplasma dos hepatócitos, níveis séricos aumentados dessa enzima indicam um provável rompimento de suas membranas plasmáticas, como foi observado nos animais submetidos à isquemia I/R normotérmica do presente trabalho (Fig. 5).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de ALT e de AST entre os grupos de animais “selvagens” e de animais deficientes para a calgranulina B, diferentemente do observado em inflamações de caráter crônico ou autoimune, onde as proteínas da família das calgranulinas encontram-se em níveis elevados (OMETTO, 2017). É possível que nos processos inflamatórios agudos resultantes de I/R hepática não ocorra mediação das calgranulinas.

Ademais, componentes da família das calgranulinas estão envolvidos na ativação de neutrófilos em resposta à infecções por patógenos virais e bacterianos. Entretanto, o desenvolvimento inflamatório da I/R ocorre sem relação com tais agentes biológicos, a menos que haja comprometimento da barreira intestinal (VAN GOLEN *et al.*, 2013). Desta forma, em ambiente estéril, constatou-se que a calgranulina B não participa do processo inflamatória agudo associado à I/R normotérmica hepática.

A avaliação histológica do dano hepático indicou que o fígado dos animais submetidos à I/R apresentou diversos focos inflamatórios, com

frequentes áreas de hemorragia e necrose, e com afluxo de neutrófilos para esses focos de lesão. Grande número de campos microscópicos receberam a pontuação máxima do escore necroinflamatório (escore 3), refletindo, provavelmente, o tempo de isquemia do modelo experimental utilizado. Em virtude dos hepatócitos exigirem grandes quantidades de oxigênio para a manutenção de sua elevada taxa metabólica normal, 90 minutos de isquemia foram mais que suficientes para que o fígado evoluísse com extensas áreas de necrose isquêmica. Ademais, a reperfusão tecidual, na sequência, favoreceu o estabelecimento da lesão, tendo em vista o elevado aporte de ROS ao interstício hepático.

A morfologia do dano hepático é bastante característica nos casos relacionados a processos isquêmicos. A desregulação no fluxo sanguíneo capilar promove uma série de mudanças estruturais e funcionais. Entretanto, a lesão secundária, advinda do restabelecimento do aporte sanguíneo, agrava o quadro anterior. No fígado isquêmico os hepatócitos não estão preparados para receber sangue rico em oxigênio, e a consequência é o incremento do dano hepatocelular, devido à exposição a agentes oxidantes altamente lesivos. Os focos de necrose tendem a se concentrar nas imediações da veia centrolobular (zona 3 do ácino hepáticos), cujos hepatócitos são mais susceptíveis à isquemia (Fig. 6C e E). As áreas de hemorragia se estabelecem em virtude da redução na atividade de eNOS, e sequente contração sinusoidal com aumento da pressão sobre os capilares hepáticos. O restabelecimento da circulação sanguínea durante a reperfusão também pode ter induzido ao quadro denominado *no-reflow*, onde, devido a constrição dos capilares sinusoidais, a tentativa em voltar aos padrões circulatórios normais foi ineficiente (KOMATSU H. 1992).

Durante a reperfusão o aporte de oxigênio aos hepatócitos resulta na geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, em virtude do desbalanço no metabolismo mitocondrial do oxigênio que chega ao fígado (GRANGER D). No presente estudo, a avaliação do estresse oxidativo foi realizada pela quantificação da peroxidação lipídica do parênquima hepático. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis hepáticos de MDA entre os animais “selvagens” e os animais deficientes para a calgranulina B (Fig. 8). Tendo em vista que os subprodutos da lipoperoxidação lipídica são convertidos em malondialdeído, pode-se inferir que a calgranulina B não interferiu diretamente no grau de comprometimento das membranas celulares por radicais livres no fígado isquêmico.

Quanto à GSH, observamos que, nos animais do grupo Sham, os níveis desse peptídeo permaneceram preservados. No entanto, nos grupos em que houve interrupção do fluxo sanguíneo hepático, foi observado um consumo desse agente antioxidante para a neutralização de subprodutos da oxidação fosfolipídica, sobretudo H_2O_2 . Além disso, foi possível comprovar que a ausência da calgranulina B não interferiu significativamente nos níveis de GSH do fígado submetido à I/R (Fig. 9).

A enzima mieloperoxidase é um importante componente dos grânulos azurófilos neutrofílicos em situações de inflamação aguda. No atual estudo, os resultados na quantificação da MPO nos grupos experimentais submetidos à I/R demonstram uma maior quantidade de MPO hepática nesses animais em comparação ao grupo cirurgia simulada. Esses achados denotam o estabelecimento de um processo inflamatório agudo nos fígados isquêmicos (Fig. 10). Foi observada, ainda, maior concentração de MPO no grupo de animais

“selvagens”, capazes de produzir calgranulina B, em comparação aos animais deficientes para a referida proteína (KO). Como demonstrado por Tennfjord, Boyum e colaboradores (2010), a MPO atuaria em conjunto com calgranulina B como catalizadores na produção de ácido hipocloroso (HOCl) visando a eliminação de agentes infecciosos. Além do papel sinérgico de ambas, MPO e calgranulina B parecem exercer regulação mútua de suas concentrações no interior dos neutrófilos (TENNFJORD *et al.*, 2010). Esse fino controle na síntese dessas moléculas auxiliaria na manutenção de um adequado perfil inflamatório tecidual. Portanto, no presente estudo, nos animais “*knockout*” para calgranulina B parece ter ocorrido uma redução nos níveis de expressão gênica para a MPO em neutrófilos como decorrência da deficiência de calgranulina B. Dessa forma, pode-se inferir que a redução nas concentrações hepáticas de MPO observada (Fig. 10) não necessariamente indicaria uma menor atividade inflamatória, mas apenas uma diminuição na capacidade de síntese dessa enzima pelos neutrófilos nos animais deficientes em calgranulina B.

O modelo cirúrgico de I/R normotérmica utilizado neste trabalho tem se mostrado altamente eficaz para a compreensão dos processos de desenvolvimento do dano, recuperação teciduais e de resistência celular à hipóxia. A anatomia hepática de camundongos, com lobos e respectivos pedículos vasculares bem definidos, permite o bloqueio cirúrgico parcial do fluxo sanguíneo. Por isso, é possível a manutenção de longos períodos de isquemia hepática, uma vez que não há consequente congestão sanguínea no território entérico, o que, de outra forma, conduziria a óbito em curto espaço de tempo. Adicionalmente, a existência de linhagens de camundongos geneticamente modificados para diferentes características permite uma grande variedade de estudos dos diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da lesão hepática por I/R.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a calgranulina B não é capaz de interferir no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda asséptica e nem no estresse oxidativo decorrentes do processo de I/R normotérmica hepática.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS AK.; KNOECHEL B.; LOHR J.; *et al.* Regulatory T cells in the periphery. **Immunol Ver.** 2006;212:149-62.

ALMEIDA W.; FATIMA A.; HUBER P.; *et al.* Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Qui. Nova.** 2008; v.31 n.5.

ALBELDA SM, SMITH CW, WARD PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J.** 1994; 8: 504-12.

ARLIN B., RENEE Z. Hepatobiliary System. **Comparative Anatomy and Histology.** 2018; segunda edição.

AVERILL M.; KERKHOFF C.; KARIN E. S100A8 and S100A9 in Cardiovascular Biology and Disease. **HSS.** 2011; 32: 223-229.

BAPTISTA A, BIANCHI L, DEGROOTE J. Alcoholic liver disease: morphologic manifestations. **Lancet.** 1981; 1:707-11.

BECKMAN J.; BECKMAN T.; CHEN J.; *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1990; 87: 1620-4.

BERTRAND-MICHAEL, J. Low doses of bisphenol induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. **Hepatology**. 2012; v.55.

BRUNT E.; MATTHEW M. Pathological features of fatty liver disease. **Gastroenterology**.2014; 147: 754-64.

BURRI E. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**. 2014; 8:197-210.

CARDEN DL, GRANGER DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. **J Pathol**. 2000; 190: 255-66.

CASILLAS-RAMÍREZ A.; MOSBAH I.; RAMALHO F. *et al.* Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion with liver transplantation. **Life Sci**. 2006; 79: 1881-94.

CERQUEIRA NF, YOSHIDA WB. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cir Bras**. 2002; 17: 417-42.

CHEVILLE, F. Criteria for development of animal models of diseases of the gastrointestinal system. **Am J Pathol**. 1980; 101(3 Suppl): S67–S76.

CLEMENS MG, ZHANG JX. Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. **Semin Liver Dias**. 19: 383-96, 1999.

DE WOLFE. Monitoring and handling of reperfusion. **Liver Transplant Surg.**

1997; 3: 459-61

DELLMAN, H. Neuronal Secretory Systems. **International Review of Cytology**

.1984; v. 88, p 303-459.

DIPAK K. **Methods in Enzymology**. 2002; v.1.

DRAPER, M HADLEY. H.H. Malondialdehyde determination as index of lipid

Peroxidation. **Methods in Enzymology**. 1990; v. 186, p. 421-431.

ELTZSCHIG HK, COLLARD CD. Vascular ischemia and reperfusion injury. **Br**

Med Bull. 2004; 70: 71-86.

FAN J.; LI Y.; LEVY R.; *et al*. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase

activation inneutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. **J Immunol**. 2007; 178:

6573-80.

FADEEVA N.; KORNEEVA I.; KNYAZEY V.; *et al*. Biomarkers of inflammatory

bowel disease activity. **TerArkh**. 2018; 90: 107-111.

FERREIRA A. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de

defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**. 1997; vol.43 n.1 São

Paulo

FINK S. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Deadand

Dying Eukaryotic Cells. **Infection and immunit**. 2005.

FOELL D.; FROSCH M; SORG C.; *et al*. Phagocyte-specific calcium-

binding S100 proteins as clinicallaboratory markers of inflammation.

Clinica Chimica Acta. 2004; v.344.

FRIEDMAN L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**. 2008; 134: 1655-69.

FUJITA Y, KHATEB A. Regulation of S100A8 Stability by RNF5 in Intestinal Epithelial Cells Determines Intestinal Inflammation and Severity of Colitis. **Cell Rep**. 2018; 24: 3296-3311.

GALLE.; PETTER R.; Apoptosis in liver disease. **Journal of Hepatology**. 1995; v.1.

GONZALEZ F.H.D, SILVA S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2006; 2ª ed c. 8, p. 318-337, 2006.

GRACE PA. Ischaemia-reperfusion injury. **BJS**. 1994.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. Reperfusion injury and reactive oxygenspecies: The evolution of a concept. **Redox Biol**. 2015; 6: 524-51.

GREESNTEIN S. Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells. **J Leukoc Biol**. 2000; 68: 715-22.

GUERRIERI F.; MUOLO L.; CAPOZZA G.; *et al*. Correlation between rat liver regeneration andmitochondrial energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**. 1995; 2: 95-100.

GUJRAL J.; BUCCI T.; FARHOOD A.; *et al*. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? **Hepatology**. 200; 33:

397-405.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1997; 1014p.

HANSSON M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch Biochem Biophys**. 2006 Jan 15; 445:214-24.

HALLIWEL. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Neurochem**. 1992; 59: 1609-23.

HENDERSON JM. Liver transplantation and rejection: an overview. **Hepatogastroenterol** 1999; 46: 1428-84

JAESCHKE H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and reconditioning. **Liver Physiol**. 2003; 284: 15-26

JAESCHKE H, WOOLBRIGHT BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. **Transplant Ver**. 2012; 26: 103-14.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO C. **Histologia básica**. 2004; 10: 223-37.

KAPLOWITZ. Drug-Induced Liver Injury. **Clinical Infectious Diseases**. 2004; v. 38.

KARATZAS T.; AIKATERINI A.; BAIBAKI M.; et al. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. **J Surg Res**. 2014 191:399-412.

KAWACHI, S. *et al*. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. **Biochem Biophys Res Commun**. 2000; 3: 851-4.

KAWAI, M. Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: clinical and experimental studies. **J Hepatol**. 2002; 37: 240–6.

KIERSZENBAUM, AL. Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia **Ed. Elsevier**, 2004, 654p.

KIM, D.; BAE, W.; HAN, J.; *et al*. Effects of splanchnic vasoconstrictors on liver regeneration and survival after 90% rat hepatectomy. **Ann Surg Treat Res**. 2018; 3: 118-128.

KIM, H. Y.; KIM, S. J.; LEE, S. M. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. **FEBS J**. 2015; 2: 259-70.

KOMATSU, H.; TAO, G.; KOO, A.; *et al*. Contribution of No-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: Evidence for a role for superoxide anion. **Hepatology**. 1992; 15: 507-514.

KOY, M. Recombinant bovine S100A8 and A9 enhance IL-1 β secretion of interferon-gamma primed monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 2013; v. 155.

KUKAN M, HADDAD PS. Role of hepatocytes and bile duct cells in preservation reperfusion injury of liver grafts. **Liver Transpl**. 2001; 7: 381-400.

KUMAR, V.; ROBBINS E COTRAN - **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 2016; 9ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.; BUSUTTIL, R.W. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. **Transplant Proc.** 2005; 37: 1653-6.

KWAK, M. Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. **Molecular and Cellular Biology.** 2003; 23: 8786–8794.

LAKHAN.; KIRCHGESSNER A.; MAGDALENA HOFER.; *et al.* Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med.** 2009; 7: 97.

LEMASTERS J.; QIAN T.; BRADHAM C.; *et al.* Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. **J Bioenerg Biomembr.** 1999 .

LE COUTEUR D.; WARREN A.; COGGER V.; *et al.* Old Age and the Hepatic Sinusoid. **The Anat. Record.** 2008; v.291.

LEFER, A. M.; LEFER, D. J. Nitric Oxide II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation **Am J Physiol.** 1999; 276: 572–575.

LI Y.; CHEN B.; YANG X.; *et al.* S100a8/a9 Signaling Causes Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyocyte Death in Response to Ischemic/Reperfusion Injury. **Circulation.** 2019; 140: 751-764.

LIU P.; XU B.; CARL E.; *et al.* NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. **Am J Physiol.** 1998; 275: 2191-8.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2013; 1830: 3143– 3153.

MA Z.; XIN Z.; DI W.; *et al.* Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury. **Cell Mol Life Sci.** 2017; 74: 3989-3998.

MACKENZIE R.; FURNIVAL C.; WOOD C.; *et al.* The effects of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. **Br J Surg.** 1977; 64: 66-9.

MAJNO G. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol.** 1995 Jan; 146: 3–15.

MAKINO H.; TOGO S.; KUBOTA T.; *et al.* A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. **J Surg Res.** 2005; 127: 171-6.

MANCEAU H. Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. **Clin Chem Lab Med.** 2017; 55: 474-483.

MANGNALL, D.; BIRD, N. C; MAJEED, A. W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. **Liver Int.** 2003; 23: 124–138.

McCUSKEY RS, URBASCHEK R, URBASCHEK B. The microcirculation during endotoxemia. **Cardiovasc Res.** 1996 32: 752-63.

MINUK GY. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. **Can J Gastroenterol.** 1998 Sep; 12: 417-21.

MISRA I. Expression and Purification of Human U-Glutamylcysteine Synthetase. **Protein Expression and Purification.** 1998; 13(2), pp. 268-275.

NAKATANI K.; KANEDA K.; SEKI S.; *et al.* Pit cells as liver-associated natural

killer cells: morphology and function. **Med Electron Microsc.** 2004; 37: 29-36.

NICHOLLS SJ, HAZEN SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1102-11.

NOGUEIRA J.; MATTOS R; PURISHII S.; *et al.* Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica nodiabetes tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2008; v.52 no.7.

OBERLEY LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. **Cancer Res.** 2000; 60:3927-3939.

OESTERLE, A. BOWMAN H. S100A12 and the S100/Calgranulins Emerging Biomarkers for Atherosclerosis and Possibly Therapeutic Targets. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** 2015; 35:2496–2507.

OLSZEWER E. **Radicais livres em medicina.** 1995; 2ª Ed.

OMETTO F.; FRISO L.; ASTORRI D.; *et al.* Calprotectin in rheumatic diseases. **Exp Biol Med.** 2017; 242: 859-873.

PANNEN, BH. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. **Hepatology.** 1998; 27: 755-64.

PATEL T.; GORES G. Apoptosis and hepatobiliary disease. **Hepatology.** 1995;21:1725-41.

PERALTA C.; GRACIA-SANCHO J.; JIMÉNEZ M. *et al.* Inflammasome-Mediated Inflammation in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. **Cells.** 2019 Sep 23; 8:1131.

POULLIS A.; FOSTER R.; MENDALL M.; *et al.* Emerging role of calprotectin in gastroenterology. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2003 18, 756–762.

PRINGLE JH. V. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Ann Surg**. 1908 48: 541-9.

PRUNSTER M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. **Pharmacol Ther**. 2016; 167:120-131.

RAMALHO LN.; PASTA A.; GULIN F.; *et al.* Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. **Food Chem Toxicol**. 2014; 74: 270-8.

ROVER. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona. **Qui. Nova**. 2001; V. 24, n. 1, p. 112-119

SANCHES SC.; RAMALHO LN.; BRAZ M.; *et al.* Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischemia and reperfusion in mice. **Food Chem Toxicol**. 2014; 67:65-71.

SERAFIN A. Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. **Am J Pathol**. 2002; 161: 587-601.

SHABANI F. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. **Inflamm Res**. 2018; 67: 801-812.

SHIRATORI Y. Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by

Kupffer cells. **Dig Dis. Sci** 1994; 39: 1265-72.

SILVESTRE O. Early-onset and late-onset heart failure after liver

SJÖDIN B.; WESTING Y.; APPLE F.; *et al.* Biochemical Mechanisms for Oxygen Free Radical Formation during Exercise. **Sports Med.** 1990; 236–254.

TENNFIJORDV.; BØYUMA.; SKREDE K. *et al.* Calprotectin (S100A8/S100A9) and Myeloperoxidase: Co- Regulators of Formation of Reactive Oxygen Species. **Toxins (Basel)** 2010; 2: 95–115.

TEOH NC, FARRELL GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. **J Gastroenterol Hepatol.** 2003 18: 891-902.

THOMPSON CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial Homeostasis ? **Nature cell biology.** 1999.

THRALL M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** 2015; 2ª ed. Roca, São Paulo, 678p.

TOWNSEND M.; TEW K.; TAPIERO H.; *et al.*, The importance of glutathione in human disease. 2003; **Biomed Pharmacother.** 57:145-55.

TYGSTRUP N.; WINKLER K.; MELLEMGAAARD K.; *et al.* Determination of the hepatic arterial blood flow and oxygen supply in man by clamping the hepatic artery during surgery. **J Clin Invest.** 1962;41: 447-54.

USAMI M.; FURUCHI M.; SHIROIWA H.; *et al.* Effect of repeated portal-triad cross-clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal

and cirrhotic rats. **J Surg Res.** 2003; 57: 541-548.

VAN DER BILT J.; KRANENBURG O.; NIJKAMP M.; *et al.* Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. **Hepatology.** 2005; 42: 165-75.

VAN GOLEN, R. F. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics. **J Gastroenterol Hepatol.** 2013; 28: 394-400.

VAN RIEL W. G. How much ischemia can the liver tolerate during resection? **Hepatobiliary Surg Nutr.** 2016, 5: 58-71.

VALKO M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The Int. Journal of Biochemistry & Cell Biology;** 2007. v. 39

VOGL T. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. **J Clin Invest.** 2018; 128:1852-1866.

VOLLMAR B. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. **Am J Pathol.** 1994; 145: 1421- 31.

WAWRYK-GAWDA, E. *et al.* P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. **Protoplasma.** 2014; 251: 525-33.

WEBBER E. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. **Hepatology.** 1998; 28: 1226–34.

WELBOURN C.; GOLDMAN G.; PATERSON I.; *et al.* Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **Br J Surg.** 1991 Jun; 78: 651-5.

WEI, Y. Carbon monoxide-releasing molecule-2 CORM-2 attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **BMC Gastroenterol.** 2010; 10: 42.

WOLFS, T. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation. **J Immunol.** 2002; 168: 1286–1293.

XIE Y.; LIAO R.; PAN L.; *et al.* ERK pathway activation contributes to the tumor-promoting effects of hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma. **Immunol Lett.** 2017;188: 116- 123.

YAMASHITA, M. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha mRNA and interleukin-6 mRNA in the rat liver after hemorrhagic shock. **Surg Today.** 2002; 32: 701–6.

YANG W.; CHEN J.; MENG Y.; *et al.* Novel Targets for Treating Ischemia-Reperfusion Injury in the Liver. **Int J Mol Sci.** 2018; 5: 1302.

YELLON, D. M.; HAUSENLOY D. J. Myocardial Reperfusion Injury. **N Engl J Med.** 2007; 357: 1121-1135.

WANG S.; JING Z.; WANG Z.; *et al.* S100A8/A9 in Inflammation. **Front Immunol.** 2018; 9:1298.