UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Maraíza Silva Gomes

Efeito da pirroloquinolina quinona na regeneração hepática
pós-isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos

Ribeirão Preto - SP

2018

Maraíza Silva Gomes

Efeito da pirroloquinolina quinona na regeneração hepática
pós-isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos

Tese apresentada á Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto para obtenção do título de
Doutor.

Área de Concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando S Ramalho

Ribeirão Preto - SP

2018

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.

Versão corrigida. A versão original se encontra na secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.

Gomes, Maraíza Silva

Efeito da pirroloquinolina quinona na regeneração hepática pós isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos. Ribeirão Preto, 2018.

67 p.: il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Ramalho Silva, Fernando.

1. Isquemia- 2. Reperfusão- 3. Estresse Oxidativo- 4. Cofator PQQ- 5. Antioxidantes.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Jerônimo e Lucelena que me apoiaram e
torceram por mim. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTO

Ao Professor Dr. Fernando Silva Ramalho, por ter continuado nessa caminhada que se iniciou no mestrado, pela disposição em ensinar o modelo cirúrgico, pelo apoio nas diversas tentativas na execução da metodologia, por não me deixar desanimar. Agradeço também pelas diversas discussões sobre o estudo e pela liberdade nas decisões quanto à tese e ao próprio desenvolvimento do doutorado.

À Dra Marlei Josiele Augusto, pelo apoio nas diversas etapas do trabalho e da vida. Não conseguiria descrever aqui o quanto foi valiosa sua presença no laboratório e na minha vida nesses anos.

À minha querida amiga e companheira de experimentos, a doutora Leticia de Araujo Apolinário, pelo companheirismo, amizade e presença nos diversos momentos durante o doutorado.

À Dra Leandra Náira Zambelli Ramalho, pelos diversos ensinamentos.

À Deisy Mara da Silva pelo apoio, pela amizade, pela execução das técnicas histológicas e pela incansável busca para obtenção de resultados na imunoistoquímica na qual, infelizmente não obtivemos êxito.

Aos secretários do departamento, Camila Luca Zambonini Gimenes e Rodrigo, pela gentileza e disposição em ajudar.

Ao Carlos Henrique de Carvalho por receber e cuidar dos animais durante o experimento no biotério.

Ao Antônio de Pádua e aos demais funcionários do departamento pelo apoio nas diversas atividades durante o doutorado.

Aos meus colegas de laboratório, agora doutores, Natália Alle, Maurício Trotta, Lívia Della Porta, Sergio Figueiredo, Diego Forti, Jéssica pelo apoio e companheirismo.

Às minhas amigas, Rafaela Felício e Pamela Viani, pelo compartilhamento dos diversos momentos vividos na pós-graduação e na universidade.

Às minhas companheiras de apartamento, Daíse de Felipe, Tâmara Paula e Thaís Oliveira pela torcida e compreensão nos momentos de ausência.

Às minhas amigas Lara Thaiane, Jane Pereira e Karine Coelho que me apoiaram mesmo distante.

Aos meus pais de Ribeirão Preto, meus tios Lindomar e Suely por todo apoio e torcida.

Ao meu irmão Tiago Silva Gomes e minha cunhada Susana Gomes e toda minha família, pela admiração, interesse e torcida pelo meu trabalho.

Em especial agradeço aos meus amados pais, pela confiança e apoio, por nunca me deixarem desistir nem esquecer o verdadeiro sentido dessa caminhada.

A Deus por me permitir sentir sua presença em minha vida e em todas as etapas que tenho vivido.

À CAPES, pelo investimento e incentivo à pesquisa.

E às todas as pessoas, que não citei, mas que também contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, meu sincero agradecimento.

RESUMO

GOMES, M.S. **Efeito da pirroloquinolina quinona na regeneração hepática pós- isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos**. 2018. 73 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: A lesão hepática por isquemia e reperfusão (I/R) ocorre em situações clínicas diversas, como nas grandes hepatectomias e no transplante hepático. A fisiopatologia desta lesão é composta, principalmente, por intensa resposta inflamatória aguda e estresse oxidativo hepático. Em consequência a essa lesão a proliferação pós hepatectomia pode ser prejudicada. Por outro lado, Pirroloquinolina Quinona (PQQ) é um cofator que vem sendo estudado em virtude de suas ações antioxidantes e de estimulação de crescimento.

Materiais e métodos: Camundongos balb-c foram submetidos à lesão hepática por I/R normotérmica seguida de hepatectomia e tratados com PQQ (10mg/kg de peso corporal) ou solução salina. Foram avaliados o grau de lesão hepatocelular (nível sérico de aminotransferases e escore histológico de agressão tecidual), a intensidade do estresse oxidativo (dosagem de MDA, GSH, NRF2 e eNOS hepáticos), a intensidade da resposta inflamatória aguda (quantificação de NFkB, IL-1 β e TNF- α no fígado) e a proliferação hepatocelular (quantificação hepática de PCNA e ciclina D1). **Resultados:** PQQ reduziu significativamente os parâmetros de lesão hepática. Adicionalmente, os animais tratados com PQQ exibiram reduzido estresse oxidativo hepático devido à preservação da reserva antioxidante de GSH, à estimulação de expressão de NRF2 e à diminuição dos níveis hepáticos de MDA. Todavia, os níveis de eNOS não sofreram alteração com o tratamento. A atividade inflamatória aguda também foi reduzida com regulação da expressão hepática de NFkB e IL-1 β . Entretanto, TNF- α , PCNA e Ciclina D1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. **Conclusão:** Os resultados obtidos indicam que PQQ é capaz de proteger o fígado contra a lesão por IR normotérmica seguida de hepatectomia e que essa proteção foi relacionada à sua ação antioxidante e anti- inflamatória. Todavia, a capacidade proliferativa hepática não foi alterada pelo tratamento no tempo avaliado.

Unitermos: Isquemia, Reperfusão, Estresse Oxidativo, Cofator PQQ, Antioxidantes.

ABSTRACT

GOMES, M.S. **Effect of pyrroloquinoline quinone on liver regeneration after normothermic ischemia and reperfusion in mice.** 2018. 73 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Liver injury following ischemia and reperfusion (IR) occurs in several clinical situations such as major hepatectomies and liver transplantation. The physiopathology of this damage is composed for hepatic acute inflammatory response and oxidative stress. As a result of this injury the proliferation can be impaired. In other hand, Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) is a cofactor that has been studied because has antioxidant activity and stimulates growth. **Materials and Methods:** Balb-c mice were underwent to hepatic injury by normothermic I/R followed by partial hepatectomy, and treated with PQQ (10mg/kg body weight) or saline solution. We evaluate the degree of hepatocellular damage (Serum level of aminotransferases and histological score of tissue damage), the intensity of liver oxidative stress (measurement of MDA, GSH, NRF2 and eNOS hepatic levels), the intensity of inflammatory response (measurement of NFkB, IL-1 β e TNF- α hepatic levels). **Results:** PQQ significantly reduced the parameters of hepatocellular damage. PQQ-treated animals showed decreased hepatic oxidative stress by preserving antioxidant reserve of GSH, expression stimulation of NRF2 and reduced hepatic level of MDA. However, eNOS levels didn't change with the treatment. Inflammatory activity was also reduced by the down-regulation of NFkB and IL1- β . Nevertheless, TNF- α and PCNA and D1 Cyclin did not show significant differences between the animal groups. **Conclusion:** These data indicate that PQQ was able to protect the liver against normothermic IR injury followed by hepatectomy and that protection was related with its antioxidant and anti-inflammatory capability. Although, the hepatic proliferative capacity was not altered by the treatment in the evaluate time.

Key words: Ischemia, Reperfusion, Oxidative Stress, PQQ Cofactor, Antioxidants

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT= Alanina aminotransaminase

AST= Aspartato aminotransferase

CE= Células endoteliais

EGF= Fator de crescimento epidermoide

eNOS= Oxido nítrico sintase endotelial

HGF= Fator de crescimento de hepatócitos

IR= Isquemia e reperfusão IL-2=

Interleucina 2

IL-10= Interleucina 10

LPS= Lipopolissacarídeo

iNOS= Óxido nítrico sintase induzida

MDA = Malondialdeído

MPT= do inglês- Mitochondrial Permeability Transition

NRF2= do inglês- Nuclear Factor Erythroid-Related Factor 2

NMDA= Ácido N-metil-d-aspartico NFκB= Fator nuclear

kappa B

NO= Oxido nítrico

PQQ= Pirroloquinoline Quinona

PQQH2= Pirroloquinoline Quinona Reduzida

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

SOD= Superóxido desmutase

STAT-3= Fatores ativador de transcrição-3

TLR= o inglês- toll-like receptors

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O FIGADO E ARQUITETURA HEPÁTICA	11
1.2 LESÃO HEPÁTICA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO	12
1.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA	15
1.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO	19
1.5 PIRROLOQUINOLINA QUINONA	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 ANIMAIS	27
4.1.1 Ambiente e gaiolas	27
4.1.2 Delineamento experimental	27
4.2 AVALIAÇÃO DO GRAU DE LESÃO HEPÁTICA	29
4.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	30
4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA HEPÁTICA	31
4.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	32
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 O FIGADO E ARQUITETURA HEPÁTICA

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo: representa cerca de 2,5% do peso corporal em humanos e 4% em ratos (PALMES; SPIEGEL, 2004). Trata-se de uma víscera extremamente bem perfundida, apresentando duplo suprimento sanguíneo composto pela artéria hepática, que fornece sangue oxigenado, e pela veia porta, que traz sangue rico em nutrientes oriundo do território esplâncnico. Em humanos, o sangue portal representa aproximadamente 75% do fluxo sanguíneo hepático, enquanto a artéria hepática responde por 25% desse fluxo (TYGSTRUP et al., 1962). A ramificação arterial e venosa ocorre em conjunto com os ductos biliares, constituindo os tratos portais no interior do fígado. A presença dessas estruturas juntamente com os hepatócitos compõe uma organização funcional denominada lóbulo hepático. O lóbulo hepático possui forma hexagonal, em cujos vértices estão localizadas as tríades portais, e com uma veia centrolobular ocupando a região central. Os hepatócitos são organizados em cordões que estabelecem a ligação da tríade portal à veia centrolobular. O suprimento sanguíneo flui de maneira centrípeta entre os cordões de hepatócitos no interior dos capilares sinusóides (Figura 1). A bile, o produto da secreção exócrina hepática, é lançada no interior dos canalículos biliares presentes na região apical do hepatócito (CAST; WALTER; HUPPER, 2015).

Os sinusóides hepáticos são revestidos internamente por um epitélio simples fenestrado e descontínuo constituído pelas células endoteliais (CEs). Entre as CEs e os hepatócitos está localizado o espaço de Disse, onde se encontram as células estreladas hepáticas. As células de Kupffer compõe o sistema fagocítico mononuclear do fígado, e encontram-se fixadas à face luminal do endotélio sinusoidal. O fígado contém também linfócitos, incluindo número relativamente grande de células “natural killer” (NK) (KUMAR et al., 2016).

Alterações estruturais tanto da veia porta quanto da artéria hepática estão presentes em diversas situações que resultam em obstrução do fluxo sanguíneo sinusoidal. O dano endotelial ocorre, muitas vezes, devido à sensibilidade das CEs à isquemia, radiação, toxinas, quimioterapia e medicamentos. A alteração da morfologia das CEs pode levar tanto a obstrução do fluxo sanguíneo quanto à falha da barreira endotelial (DELEVE et al., 2004).

Figura 1 - Ilustração parcial de um lóbulo hepático representando a triáde portal composta pela veia porta hepática (roxo), artéria hepática (vermelha), ducto biliar (verde), capilares sinusóides e veia centrolobular (azul), e hepatócitos (bege) (CAST; WALTER; HUPPER, 2015).

1.2 LESÃO HEPÁTICA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A lesão hepática por isquemia e reperfusão (IR) está presente em diversas situações clínicas, como nas paradas cardíocirculatórias, no infarto agudo do miocárdio, no politraumatismo, na septicemia, no trauma hepático grave e no transplante de fígado. No transcorrer de cirurgias hepáticas existe frequente perda sanguínea que culmina em necessidade de transfusão sanguínea e em complicações pós-operatórias. A manobra de Pringle é uma estratégia na qual o pedículo hepático é ocluído, permitindo que cirurgião realize procedimentos de reparo e ressecção enquanto os vasos aferentes do fígado estão fechados (PRINGLE, 1908). No entanto, tendo em vista a elevada demanda metabólica hepática, a ausência de perfusão durante esse período resulta em hipóxia tecidual e disfunção microvascular graves (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Desta forma, o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo é recomendado no sentido de se evitar os danos causados pela hipóxia prolongada. No entanto, a reperfusão é capaz de induzir dano adicional ao fígado devido à ativação do sistema imunológico e à produção de espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species” - ROS). O dano tecidual produzido durante esse período é reconhecido como lesão por reperfusão (YANG et al, 2018; YELLON; HAUSENLOY, 2007). A parada cardíocirculatória revertida é exemplo de uma condição na qual há completa interrupção do

fluxo sanguíneo ao organismo seguida do seu restabelecimento, conduzindo à lesão por isquemia e reperfusão em diversos órgãos (YELLON; HAUSENLOY, 2007). Os transplantes de órgãos e as cirurgias nas quais se faz necessária a completa interrupção do fluxo sanguíneo exemplificam os casos de lesão por IR em órgãos isolados. Percebe-se, no entanto, que a lesão por IR num órgão isolado é capaz de ativar todo o sistema imunológico, com ocorrência de dano a múltiplos órgãos (KUPIEC-WEGLINSKI; BUSUTTIL, 2005; PARK et al., 2011; PERALTA, JIMÉNEZ-CASTRO, GRACIA-SANCHO, 2013).

Durante a isquemia, há redução da atividade da enzima adenilato ciclase, diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, edema celular e aumento da permeabilidade vascular (OGAWA et al., 1992). A hipóxia também estimula a ativação de células do sistema imune, sobretudo macrófagos teciduais. Como na lesão por IR não há associação de agentes biológicos, exceto nos casos em que há propagação de bactérias intestinais, a resposta inflamatória que acompanha essa lesão é quase sempre do tipo estéril (VAN GOLEN et al., 2013). Dessa forma, a ativação do sistema imunológico tem como principal consequência o dano tecidual. A resposta imunológica estéril apresenta algumas similaridades com aquela direcionada a padrões moleculares associados a patógenos, com o reconhecimento de receptores do tipo Toll ("Toll-like receptors" – TLRs), recrutamento e ativação de leucócitos e ativação do sistema complemento (IADECOLA; ANRATHER, 2012). A ativação e a interação com TLRs conduz à ativação de vias relacionadas à resposta pró-inflamatória, como a ativação do fator de transcrição NFκB, da proteína quinase ativada por mitógenos e vias do interferon tipo I (CHEN; NUÑEZ, 2010).

O TLR4 é responsável pela mediação da resposta inflamatória direcionada a bactérias gram negativas em virtude de sua ativação pelo lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície dessas bactérias (ARBOUR et al., 2000). Esse receptor também pode ser ativado pelo estresse oxidativo que acompanha a lesão por IR, de modo que a ativação de TLR4 interliga o estresse oxidativo com a resposta inflamatória (POWERS et al., 2006). O TLR2 é outro receptor de reconhecimento de patógeno que pode ser ativado pela hipóxia ou inflamação (WOLFS et al., 2002). A resposta inflamatória e o estresse oxidativo representam as principais causas de disfunção tecidual na lesão por IR.

A patogênese da lesão por IR pode ser subdividida em duas fases: uma aguda e outra crônica ou subcrônica. A fase aguda ocorre entre 3 e 6 horas após a reperfusão, e é acompanhada pela hiperprodução de ROS e pela ativação de macrófagos e linfócitos. A fase seguinte ocorre 18 a 24 horas após a reperfusão, e é caracterizada por importante infiltrado neutrofílico tecidual. A transmigração dos neutrófilos até o sítio da lesão é mediada pela interação dos leucócitos com citocinas e quimiocinas (SANCHO; RAMÍREZ; PERALTA, 2015). Além do acúmulo local de neutrófilos e da elevada produção de ROS, a patogenia da lesão por IR é composta por importante disfunção mitocondrial, ativação do fator de transcrição NFkB, ativação de proteases e fosfolipases, e ativação de quinases apoptóticas (CANNISTRÀ et al., 2016; MA et al., 2017).

A proteção contra a lesão por IR se dá a partir da produção de citocinas anti-inflamatórias por leucócitos. A interleucina (IL)- 10, por exemplo, atua reduzindo os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e ROS, os quais estão intimamente envolvidos na gênese do dano tecidual secundário à IR (IADECOLA; ANRATHER, 2012).

As ROS são moléculas instáveis com capacidade para modificar proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Essas alterações podem conduzir a severa disfunção e morte celular. Diversas são as fontes de geração de ROS. Entre estas estão o desequilíbrio do sistema xantina/xantina oxidase (ELTZSCHIG; COLLARD, 2004), as mitocôndrias, principal fonte de ROS na I/R hepática, sobretudo do ânion superóxido (JAESCHKE; WOOLBRIGHT 2012; INDO et al., 2015), os neutrófilos com o peróxido de hidrogênio, e as células de Kupffer com a produção de NO e ácido hipocloroso (JAESCHKE; WOOLBRIGHT, 2012; KARATZAS et al., 2014). O ânion superóxido pode reagir com o NO para formar o peroxinitrito, potente pró-oxidante responsável por intenso dano celular por meio dos processos de peroxidação lipídica, inibição da atividade da ATPase Na⁺/K⁺ e das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, e nitrilação dos resíduos de tirosina das proteínas da membrana celular (BECKMAN et al., 1990).

Outro evento que pode ser observado durante a IR é o fenômeno do “no reflow”, o qual atrasa a reperfusão de algumas partes do órgão devido à intensa vasoconstrição induzida pela IR. Há, ainda, excessiva agregação plaquetária e acúmulo de neutrófilos nos sinusóides, com aumento da formação de trombos e consequente prejuízo da reperfusão (COLLO; PEPPER, 1993; ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). Além da vasoconstrição, outras alterações vasculares acompanham a lesão

por IR, como a ativação endotelial, o aumento da permeabilidade vascular, a ativação da cascata da coagulação e a ativação do sistema complemento (YELLON et al., 2007).

Na lesão por IR, as vias de morte celular apoptose, autofagia e necrose encontram-se ativadas. Quanto à necrose, observa-se tumefação celular associada ao rompimento das membranas e ao extravasamento do conteúdo celular. A presença do conteúdo celular no meio intersticial representa um potente indutor da produção de citocinas e da ativação de células do sistema imunológico. Embora menos relevante, a apoptose também participa do processo de lesão por IR. A regulação dessa via de morte celular ocorre por uma complexa cascata de sinalização com participação de fatores pró-apoptóticos, como o p53, e anti-apoptóticos, como fator de transcrição NF- κ B. Em virtude dos corpos apoptóticos permanecerem com a membrana íntegra até o final do processo, há menor estimulação do sistema imunológico em comparação com a morte por necrose (CHEN; NUÑEZ, 2010; HOTCHKISS, 2009; WAWRYK-GAWDA et al., 2014). A autofagia aparece como um processo adaptativo estimulado pela hipóxia, e sua ativação está associada à prevenção do dano tecidual (SALA-MERCADO et al., 2010) .

1.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O fígado se diferencia dos demais órgãos adultos por sua intensa capacidade regenerativa. Essa habilidade é reconhecida desde a Antiguidade segundo a fábula mitológica grega do Prometheus. De acordo com a mitologia, por ter roubado dos deuses o segredo do fogo e o revelado aos homens, Prometheus foi castigado por Zeus a ser acorrentado às montanhas do Cáucaso e ter seu fígado diariamente devorado por uma águia (figura 2). Entretanto, durante a noite, o fígado de Prometheus se regenerava, provendo à águia constante alimentação, e conduzindo Prometheus a interminável tortura (CHEN; CHEN,1994).

Figura 2 - Representação da figura mitológica de Prometeus acorrentado, com uma águia alimentando-se do seu fígado como castigo de Zeus. Disponível em: <http://oquevidomundo.com/entendendo-a-mitologia-o-mito-de-prometeu/> acessado em: 10.07. 2018.

Devido ao elevado grau de diferenciação, o hepatócito é uma célula que raramente sofre divisão. No fígado adulto normal, apenas um em 20.000 hepatócitos se encontra no ciclo celular. Todos os demais estão na forma quiescente, ou seja, no estágio G0 do ciclo celular (MANGNALL, BIRD, MAJEED, 2003). No entanto, a transição do estágio G0 para a fase G1, ou seja, a saída do estado de quiescência e a entrada no ciclo celular podem ser induzidas por qualquer tipo de agressão ao fígado, seja de natureza isquêmica, viral, tóxica ou cirúrgica, o qual destrua ou remova percentual significativo do parênquima hepático. A perda tecidual rapidamente desencadeia o processo proliferativo hepatocelular até que a massa hepática original seja recuperada. O ciclo celular é um processo extremamente bem regulado. Para que as células consigam atingir todas as etapas do ciclo, os pontos de restrição devem ser vencidos. A passagem pelos pontos de restrição é estimulada por proteínas como fatores de crescimento, ciclinas e citocinas pró-inflamatórias (HEATH, 2000). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por exemplo, é secretado quando os hepatócitos sofrem lesão por hipóxia ou toxinas, bem como pós-hepatectomias. Na sequência, o TNF- α estimula a secreção de IL-6 pelas células de Kupffer. Essas duas citocinas se interagem a receptores na superfície dos hepatócitos, e estimulam a secreção de fatores de transcrição, como o fator ativador de transcrição-3 (STAT-3) e o fator nuclear Kappa-B (NFkB), induzindo, desse modo, a passagem para as fases G1 e S, a replicação do DNA e a mitose

(SHIFFMAN et al., 2002). Como o TNF- α , o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator transformador do crescimento alfa (TGF- α) são exemplos de fatores de crescimento que participam da regeneração favorecendo a resposta mitogênica hepatocelular. Por outro lado, o fator transformador do crescimento beta (TGF- β), os glicocorticoides e o glucagon apresentam efeito inibitório sobre a regeneração hepática (YOKOYAMA; NAGINO; NIMURA, 2007).

Imediatamente após a hepatectomia verifica-se o aumento relativo do fluxo sanguíneo esplâncnico no remanescente hepático, implicando em maior exposição dos hepatócitos ao LPS de origem intestinal. O LPS é um potente indutor da ativação de células de Kupffer e da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Adicionalmente, a ação mecânica do maior fluxo sanguíneo sobre as CEs favorece a secreção de IL-6 por essas células. Esses importantes estímulos à produção de citocinas ocorrem precocemente após a cirurgia (KAWAI et al., 2002; YOKOYAMA; NAGINO; NIMURA, 2007).

O processo de regeneração é composto por uma fase inicial, descrita como “iniciação”, quando os hepatócitos deixam o estadio G0, entram no ciclo celular e tornam-se aptos a replicar. Uma segunda fase, denominada fase de proliferação, quando as células sofrem intensa divisão em função de recuperar a massa perdida. E a fase de terminação, quando a proliferação atinge seu objetivo restabelecendo a massa original. Usualmente, a proliferação dos hepatócitos inicia-se na região periportal, num intervalo de aproximadamente 24 horas após a lesão, seguindo até a região pericentral, 36 a 48 horas após a indução. Esse intervalo de tempo pode variar em função da espécie do animal. Quanto ao aspecto histológico, inicialmente observa-se uma arquitetura lobular composta por hepatócitos desorganizados distribuídos ao longo de vias vasculares imaturas. Após uma semana, a estrutura lobular é recomposta, porém com lóbulos menores do que os habituais (ZIMMERMANN, 2002; COURT et al. 2002).

Uma característica interessante é que a maioria dos hepatócitos maduros prolifera uma única vez, enquanto poucos proliferam duas vezes, o que permite o controle da atividade proliferativa até o completo restabelecimento da massa original. Os hepatócitos localizados na periferia do lóbulo hepático próximos aos espaços portais apresentam maior aptidão para a proliferação em comparação àqueles localizados nas proximidades da veia centrolobular (FAUSTO, 1997). Sabe-

se que a regeneração hepática é o resultado da resposta proliferativa de hepatócitos maduros. As células progenitoras hepáticas ("stem cells") participam da regeneração apenas em situações muito específicas, como nos casos de maciça destruição do parênquima hepático ou quando os hepatócitos estão impedidos de se replicar (MIYAJIMA; TANAKA; ITOH, 2014).

O processo regenerativo hepático conta tanto com a hipertrofia como com a hiperplasia das células do fígado. Após uma hepatectomia parcial 70% (HP70%), por exemplo, um dos principais modelos empregados para o estudo da regeneração hepática, o fígado exibe aumento de seu volume tanto por aumento do número de células, como pelo acréscimo de volume às mesmas. A intensidade da resposta regenerativa pode ser avaliada pela quantificação da massa hepática, pela identificação de proteínas envolvidas no ciclo celular através da imunoistoquímica (p.ex. PCNA e Ki67), ou por quantificação de radioatividade após inserção de nucleotídeos radioativos (p.ex. timidina tritiada) (PALMES; SPIEGEL, 2004).

A extensão da ressecção hepática está diretamente associada com a intensidade da resposta regenerativa. Observa-se que nas hepatectomias parciais em que há remoção de 40% a 70% da massa hepática há rápida e intensa resposta proliferativa (BUCHER; SWAFFIELD, 1964). À medida que a extensão da hepatectomia é diminuída, a capacidade e a velocidade de regeneração também reduzem. Hepatectomias em que a ressecção é inferior a 40% da massa hepática implicam em resposta proliferativa reduzida em comparação com ressecções superiores a 40%. Adicionalmente, hepatectomias com perda menor que 10% possuem resposta regenerativa mínima, enquanto que hepatectomias menores que 5% resultam em aumento de apenas 0,5% no número de células (FURCHTGOTT; CHOW; PERIWA, 2009). Por outro lado, as hepatectomias podem ser letais quando ultrapassam um limite máximo de perda tecidual. As hepatectomias são seguras quando há ressecção de até 70% da massa hepática (PANIS; MCMULLAN; EMOND, 1997). Ressecções superiores a 75% podem resultar em excessiva demanda funcional aos hepatócitos remanescentes, além de maior estresse às células de Kupffer e aumento exacerbado da pressão portal, podendo culminar com falência hepática aguda (PANIS; MCMULLAN; EMOND, 1997; KIM et al., 2018).

O modelo experimental de HP70% é amplamente empregado para o estudo da regeneração hepática em virtude da grande uniformidade anatômica dos lobos hepáticos em ratos e camundongos. Com esse modelo o pesquisador obtém

elevado nível de reprodutibilidade e acurácia nas cirurgias. A regeneração pode ser avaliada sem interferência de necrose e inflamação, além de permitir a definição precisa do início do estímulo regenerativo. Por outro lado, esses aspectos tornam esse modelo menos fidedigno em relação às situações clínicas mais frequentemente observadas em humanos (EMOND et al. 1996; SAKAMOTO et al. 2000). A HP70% é uma cirurgia simples e bem tolerada pelos animais, com baixíssima mortalidade pós-cirúrgica. No entanto, quando a extensão da ressecção se aproxima de 90%, são observadas complicações relacionadas à insuficiência hepática aguda, como a encefalopatia e a coagulopatia. Nesses casos, a taxa de mortalidade é bastante elevada (MAKINO et al., 2005).

A cinética da resposta regenerativa após a HP70% está bem determinada em ratos e camundongos. Em ratos, a síntese de DNA se inicia 12 horas após a HP70% com o pico em 24 horas após a cirurgia. As mitoses se iniciam 24 horas pós-hepatectomia, e o pico é atingido 32 horas após a cirurgia. Em camundongos, a síntese de DNA atinge o pico em 30 horas após a HP70%, enquanto as mitoses atingem o máximo em 36 horas após a cirurgia (BUCHER; SWAFFIELD, 1964).

Outros métodos são também empregados para indução da regeneração hepática, como o uso de substâncias hepatóxicas. O tetracloreto de carbono, a tioacetamida, o acetaminofeno (paracetamol), a d-galactosamina e o etanol são bastante utilizados com o objetivo de promover necrose hepática e subsequente regeneração. Esse tipo de modelo experimental apresenta algumas limitações, como a dificuldade em se determinar o início da resposta regenerativa e a variabilidade da extensão do dano hepático, que é dependente da resposta individual dos animais. Entretanto, o emprego de hepatotoxinas possui maior proximidade com a realidade clínica (NOSTRANT et al. 1978).

1.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA APÓS ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Os mecanismos de lesão hepática envolvidos durante o processo de IR também estão presentes na patogênese da IR associada à hepatectomia parcial. A extensão da isquemia normotérmica precedendo a hepatectomia parece ser crucial para a gravidade das lesões observadas no fígado remanescente. Além disso, doenças prévias como a cirrose e a esteatose hepáticas podem influenciar na

tolerância dos hepatócitos à IR, acentuando o dano tecidual e prejudicando a regeneração (MENDES-BRAZ et al., 2013; VAN RIEL et al., 2016).

Os hepatócitos remanescentes exibem elevada demanda energética durante o período regenerativo. Esse fato serve de estímulo para que as mitocôndrias forneçam mais energia às células em regeneração. Dessa forma, a geração de ROS se acentua nas mitocôndrias em exacerbada atividade (GUERRIERI et al., 1995). O estresse oxidativo produzido pelo desequilíbrio entre as ROS e os agentes antioxidantes ativa proteínas capazes de inibir o ciclo celular (BARNOUIN et al., 2002). Por isso, na hepatectomia pós- IR se observa importante retardo na síntese de DNA e na mitose dos hepatócitos em proliferação, o que implica em maior incidência de falência hepática aguda e menor taxa de sobrevivência (BEDIRLI et al., 2005; BOLITHO et al., 1993).

Recente estudo clínico abordando 23 pacientes submetidos à hepatectomia parcial associado a IR identificou importantes alterações no metabolismo hepático relacionadas ao favorecimento da resposta regenerativa. Foi observado um maior consumo de lipídeos em detrimento dos carboidratos durante o metabolismo energético dos hepatócitos em proliferação. Além disso, os níveis dos aminoácidos valina e triptofano apresentavam-se elevados nos fígados em regeneração, e guardavam relação com o volume ressecado, o tempo de isquemia e a função hepática (SAITO et al., 2018).

1.5 PIRROLOQUINOLINA QUINONA

Pirroloquinolina Quinona (PQQ) foi descrito inicialmente como um cofator enzimático de bactérias (HAUGE, 1964). Está envolvido em reações de oxirredução, atua como cofator para uma classe especial de desidrogenases/oxidoredutases (STITES; MITCHELL; RUCKER, 2000; OUCHI et al., 2009). Este cofator também é conhecido como metoxantin e alguns autores o descrevem como uma vitamina do Complexo B (KASAHARA; KATO, 2003)

PQQ é sintetizado por bactérias e seus genes já foram identificados em organismos como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Methylobacterium extorquens* AM1, *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconobacter oxydans*, *P. fluorescens* B16, *P. fluorescens* Pf0-1 e *P. fluorescens* (MISRA; RAJPUROHIT; KHAIRNAR, 2012; KUMAZAWA et

al.,1995; RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009). Possui como características principais, ser termooestável, hidrossolúvel e pode ser encontrada em diversos tipos de alimentos (KUMAZAWA et al.,1995).

Embora PQQ seja pouco conhecida nos tratamentos habituais ela parece estar presente no meio ambiente desde o início da evolução terrestre, de modo que alguns autores sugerem que exista PQQ na poeira interestrelar. Fato que estimula o desejo pelo entendimento de seu papel nas formas mais simples de vida e na evolução (KRUEGER et al., 2004). Apesar de ser produzida por uma variedade de bactérias, a microbiota intestinal de mamíferos parece não ser capaz de sintetizar PQQ (RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009). A presença de pequenas concentrações de PQQ em tecidos humanos e de ratos (KUMAZAWA et al., 1992) e no leite humano (MITCHELL et al., 1999) demonstra a importância da obtenção dessa substância pela alimentação.

Estudos nos quais se utilizou dieta deficiente em PQQ foi possível notar sua relevância para a saúde de mamíferos. Nestes experimentos pôde ser observado que animais que receberam dieta livre de PQQ apresentaram retardo no crescimento, comprometimento da resposta imunológica e prejuízo do desempenho reprodutivo. Por outro lado, quando a dieta destes animais foi modificada pela adição de altas doses de PQQ, foi observada modulação do conteúdo mitocondrial e alteração no metabolismo lipídico (BAUERLY et al, 2011; RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009). Bauerly et al. (2011) demonstraram relação destas propriedades de PQQ com a ação cardioprotetora encontrada no estudo.

A privação de PQQ na dieta pode resultar ainda em redução dos níveis de interleucina-2 (IL-2). Neste caso, como a IL-2 é necessária na formação de células T de memória, a suplementação com 1 nmol de PQQ por grama da dieta aumenta a sensibilidade de células B e T à mitogênese (STEINBERG; GERSHWIN; RUCKER, 1994).

Estudos clínicos desenvolvidos envolvendo suplementação de dietas com PQQ mostraram que baixas doses de PQQ (0,3mg/kg por 3 dias) conferem diminuição nos níveis plasmáticos de proteína C reativa em comparação aos níveis basais, sugerindo a participação de PQQ na atenuação da resposta inflamatória, uma vez que a diminuição da proteína C reativa foi acompanhada por redução dos níveis plasmáticos de IL-6 (HARRIS et al.,2013). Adicionalmente, foi observado que a suplementação diária com 20 mg de PQQ está associada a substancial benefício

em indicadores de qualidade de vida em humanos, como melhora do humor, apetite, sono, dor e obsessão (NAKANO et al., 2012).

PQQ pode atuar em importantes vias de sinalização celular. PQQ atua na regulação dos níveis de glicose e de lipídeos, na formação de corpos cetônicos e manutenção do conteúdo mitocondrial hepático. Essas ações podem ser evidenciadas pela interação desta substância com alguns genes, como PGC-1 α e os genes da família Ras, que regulam processos de metabolismo energético e multiplicação celular. (BAUERLY et al., 2011; STITES et al. 2006; RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009; SATO; TORIYAMA, 2009). PQQ previne a morte neuronal in vitro causada por estresse oxidativo de forma mais eficiente que vitamina C e E (HARA; HIRAMATSU; ADACHI, 2007; NUNOME et al., 2008).

Diversos estudos sobre idade avançada foram realizados nos quais foram testados a capacidade de memorização e desempenho cognitivo. A ingestão de PQQ demonstrou maiores pontuações de memória recente, melhores níveis de aprendizado em comparação com os grupos que receberam placebo. O tratamento com PQQ melhorou o desempenho cognitivo mesmo nas situações de estresse oxidativo (OHWADA et al., 2008; TAKATSU et al., 2009). Estudos com o objetivo de avaliar essas possíveis utilizações de PQQ vêm sendo desenvolvidos tanto em modelos experimentais como em humanos (NAKANO et al., 2012; NAKANO et al., 2015).

A capacidade antioxidante de PQQ destaca-se entre suas propriedades orgânicas. Estudos sobre a ação antioxidante da PQQ revelam que ela é encontrada nas células em sua forma reduzida, PQQH₂, sendo esta a forma responsável pela eliminação de radicais livres. Foi constatado que a capacidade de eliminação de radicais livres por PQQH₂ é 7.4 vezes maior que do ácido ascórbico (OUCHI et al, 2009). Corroborando essa informação, existem experimentos como o de Pandey et al. (2014) que introduziu cepas de E. coli contendo gene para produção de PQQ na luz intestinal de ratos que sofreram lesão oxidativa pelo uso de 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Nesse experimento foi observado que os ratos que receberam as cepas e. coli modificadas exibiam maior capacidade antioxidante intestinal em comparação com aqueles que foram tratados com ácido ascórbico. Esse tratamento resultou em maior proteção do cólon e do fígado, sobretudo pela restauração de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase.

Devido essa propriedade antioxidante PQQ vem sendo empregada em estudos envolvendo isquemia tecidual. Em modelo experimental de isquemia cardíaca, foi observada redução da extensão da área infartada do miocárdio nos animais tratados com PQQ. Foi observado, nesse estudo que a dose utilizada de PQQ foi inversamente proporcional ao tamanho da área infartada. Os animais tratados com PQQ sofreram redução dos níveis miocárdicos de malondialdeído, um indicador de peroxidação lipídica. A dose ótima observada nesse estudo foi de 15mg/kg, embora doses menores também mostraram ser eficazes. Foi demonstrado que PQQ atua como eliminador de radicais livres no miocárdio isquêmico, sendo considerado um agente altamente efetivo na cardioproteção contra lesões por IR (ZHU et al, 2004). Ao se comparar os efeitos protetores miocárdicos da PQQ com aqueles induzidos pelo metropolol, um antagonista seletivo de $\beta 1$ adrenoceptor utilizado na terapia do infarto do miocárdio, foi encontrada uma proteção similar exercida pelos dois tratamentos, sendo que a combinação de ambos resultou em potencialização do efeito. Observou-se, entretanto, que apenas a PQQ induziu efetiva diminuição da peroxidação lipídica e proteção às mitocôndrias (ZHU et al., 2006).

Estudos in vitro também demonstram proteção a cardiomiócitos pelo uso de PQQ. Esse tratamento é capaz de diminuir os efeitos do estresse oxidativo induzidos pela adição de peróxido de hidrogênio à cultura. O pré-tratamento com PQQ previne morte celular por meio da menor exposição dos cardiomiócitos às ROS. Esta proteção se dá primariamente pela prevenção do aumento dos níveis celulares de ROS que são produzidos principalmente pelas mitocôndrias. Outro efeito da PQQ sobre as mitocôndrias é o retardo na formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) (TAO et al., 2007). Em outro estudo, empregando mitocôndrias isoladas do fígado, foi observado que a PQQ é um efetivo antioxidante mitocondrial que protege as mitocôndrias contra o estresse oxidativo induzido pela peroxidação lipídica e pela inibição da cadeia respiratória mitocondrial (HE et al., 2003).

Além da proteção cardíaca PQQ também apresenta proteção frente à isquemia cerebral. Um estudo empregando modelo de IR cerebral demonstrou que tanto doses de PQQ de 3mg/kg quanto de 10mg/Kg resultaram em diminuição da área infartada e melhor comportamento neuronal após a lesão (ZHANG; FEUSTEL; KIMELBERG, 2006). PQQ parece atuar modulando o sítio de oxidoredução do ácido

N-metil-d-aspartico (NMDA) executando função neuroprotetora em estudos experimentais de acidente vascular cerebral e de lesão medular. Deste modo, a administração de PQQ é efetiva na recuperação da lesão medular em ratos submetidos à hemitransecção da medula espinhal. Esse tipo de proteção é acompanhada pela diminuição dos níveis de RNAm para a iNOs (HIRAKAWA et al, 2009). De forma similar, Jensen et al. (1994) demonstraram o efeito protetor de PQQ em estudo com modelo experimental de hipóxia e isquemia cerebral. Neste estudo, o tratamento com PQQ foi efetivo na redução da extensão da área de infarto cerebral. Adicionalmente, a infusão intraperitoneal de PQQ após três horas de isquemia conseguiu reduzir o volume da área infartada em comparação com os animais tratados somente com o veículo (JENSEN et al, 1994; ZHANG; FEUSTEL; KIMELBERG, 2006).

No fígado já foi observada proteção pelo uso de PQQ em modelos que utilizaram como agentes lesivos o tetracloreto de carbono, galactosamina, tioacetamida e etanol (TSUCHIDA et al., 1993, HOBARA et al., 1988).

A toxicidade de PQQ é extremamente baixa. Em testes de toxicidade oral de dose única realizado em ratos, observou-se que a dose aproximadamente letal de PQQ está entre 500 e 1000 mg/kg. Não há evidências de efeitos de toxicidade aguda induzidos pela PQQ em quantidades de até 60 mg por dia para humanos, ou até 500mg por quilo de dieta em animais (RUCKER; CHOWANADISAI; NAKANO, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

As grandes cirurgias hepáticas são comuns no meio clínico e estas muitas vezes são acompanhadas pela ocorrência da lesão hepática por IR. No transplante hepático essa lesão representa importante fator para o sucesso do procedimento visto que a mesma pode diminuir a capacidade proliferativa do enxerto. A fisiopatologia da lesão por IR é complexa e apresenta participação de diferentes mecanismos, com destaque para a produção tecidual de radicais livres e o desencadeamento de intensa resposta inflamatória aguda hepática. Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver estratégias capazes de minimizar os danos teciduais secundários à IR e que promova a proliferação hepática. A propriedade antioxidante do PQQ torna promissor o seu uso nessas situações e nos estimulou a avaliar pela primeira vez o comportamento desta substância no modelo experimental de IR hepática seguida de hepatectomia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento com PQQ na lesão hepática e na proliferação hepatocelular em modelo experimental de IR normotérmica hepática seguida de hepatectomia em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência do tratamento na lesão hepática induzida pelo modelo cirúrgico.

Quantificar as aminotransferases séricas dos animais dos grupos experimentais.

Avaliar o dano parenquimatoso dos animais dos grupos experimentais.

Avaliar a resposta inflamatória aguda hepática dos animais dos grupos experimentais.

Avaliar o estresse oxidativo dos animais dos grupos experimentais.

Avaliar a proliferação celular dos animais dos grupos experimentais.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 ANIMAIS

4.1.1 Ambiente e gaiolas

Setenta e seis camundongos Balb/c 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 (número do processo: 103/2016).

4.1.2 Delineamento experimental

4.1.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

1. Sham ($n=6$) – animais foram submetidos à anestesia e à cirurgia simulada (laparotomia, manipulação das vísceras e sutura da parede abdominal). Após anestesia com quetamina e xilazina, metade dos camundongos foi submetida à eutanásia 6 horas após a cirurgia e a outra metade 30 horas após a cirurgia.

2. Grupos Isquemia / Reperfusão e Hepatectomia (**Grupo Controle**) ($n=40$) – 2 subgrupos com 20 animais (Controle 6h e Controle 30h) – os animais foram submetidos a 45 minutos de isquemia normotérmica do lobo hepático mediano seguido de ressecção dos lobos restantes (hepatectomia parcial a 70%) conforme procedimento descrito abaixo. Os animais deste grupo receberam duas doses de Ringer lactato que, além de hidratar os animais, foi utilizado como veículo na solução de PQQ. A primeira dose foi administrada 15 minutos antes do início da isquemia e a segunda dose duas horas após o início da reperfusão. Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia 6 e 30 horas após a reperfusão.

3. Grupos Isquemia / Reperfusão e Hepatectomia + PQQ (**Grupo PQQ**) (n= 30) – 2 subgrupos com 15 animais (PQQ 6h e PQQ 30h) – os animais foram submetidos a 45 minutos de isquemia normotérmica no lobo hepático mediano seguido de ressecção dos lobos restantes (hepatectomia parcial a 70%) conforme procedimento descrito abaixo. Os animais deste grupo receberam 10mg/kg de PQQ (ZHANG; FEUSTEL ; KIMELBERG, 2006; YANG et al., 2014) dissolvido em Ringer lactato e dividido em duas doses: a primeira dose foi administrada 15 minutos antes do início da isquemia e a segunda dose duas horas após o início da reperfusão (RAMALHO et al., 2014). Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia 6 e 30 horas após a reperfusão.

4.1.2.3 Esquema do delineamento experimental

Figura 3. Esquema representativo dos grupos experimentais, dos períodos de isquemia e reperfusão, do tratamento e respectivas doses, e dos momentos de eutanásia dos animais.

4.1.2.3 Procedimento cirúrgico

Os animais receberam anestesia inalatória pelo Isoflurano e foram mantidos em decúbito dorsal. Após laparotomia mediana, foi realizada a ligadura do pedículo do lobo hepático lateral esquerdo e a instalação de clipe metálico no pedículo do lobo mediano para indução de isquemia hepática normotérmica. Na sequência, foi

realizada a ressecção do lobo hepático lateral esquerdo. Nesse modelo, a congestão intestinal é evitada devido à preservação do fluxo portal através dos lobos hepáticos lateral direito e caudado. Ao final do período isquêmico (45 minutos), o clipe metálico foi removido do pedículo do lobo mediano. Na sequência, foi realizada a ligadura dos pedículos e a ressecção dos lobos lateral direito e caudado, restando apenas o lobo mediano submetido à isquemia. A parede abdominal foi suturada, e a analgesia pós-operatória foi realizada com Tramadol (10mg/kg), via subcutânea, dose única, imediatamente após a recuperação da anestesia. Os animais foram mantidos em decúbito ventral sobre uma placa aquecida a 37°C até completa recuperação anestésica. Após o término da anestesia, foi permitido aos animais livre acesso à água e à alimentação. Os animais foram novamente anestesiados e submetidos à eutanásia 6 e 30 horas após a reperusão. Foi realizada a punção da veia cava inferior para coleta de sangue seguida de ressecção do lobo hepático isquêmico remanescente (lobo mediano). A hemorragia advinda da hepatectomia foi suficiente para conduzir os animais ao óbito. Foram coletados fragmentos hepáticos para avaliação do grau da lesão parenquimatosa e da taxa de proliferação hepática.

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

Aminotransferases – as dosagens das aminotransferases séricas alanina (ALT) e aspartato (AST) foram realizadas utilizando-se kit comercial (Análise Diagnóstica, São Paulo, Brasil).

Histologia – a intensidade da lesão parenquimatosa hepática foi avaliada em preparações histológicas coradas por hematoxilina/eosina por meio da análise de 30 campos microscópicos aumento de 200x. As avaliações seguiram a seguinte escala: 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)

As amostras teciduais hepáticas (200mg) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M e centrifugadas por 5 min a 4000 rpm. Em seguida, 200 uL do sobrenadante foram adicionados a 650 uL de uma solução de 1-metil-2-fenilindol e acetonitrila com metanol. Cento e cinquenta microlitros de ácido hidrocloreídrico a 37% foram adicionados à reação. Essa solução foi encubada por 40 minutos a 45°C em banho maria e centrifugados por 5 minutos na sequência. Como padrão de MDA para a reação foi utilizada a hidrólise de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano (TMP) em ácido sulfúrico a 1%. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 586 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA pelo peso da amostra em gramas (nmol / g amostra).

4.3.2 Mensuração da Glutathiona Reduzida

Para mensurar os níveis hepáticos de glutathiona reduzida (GSH), 50 mg de fígado foram homogeneizados em solução de EDTA 0,02 M. Foi retirada uma alíquota deste homogenato para determinação da concentração proteica e normalização do teste. Foi adicionado 1 mL de água miliQ e 0,25 mL de ácido tricloroacético 50% em 1,25 mL do homogenato. A solução ficou em repouso por 15 min e posteriormente foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min em temperatura ambiente. Foi transferido 1 mL deste sobrenadante para um tubo onde foram adicionados 2 mL de solução Tris-HCL 0,4M, pH 8,9 e 50 µL de DTNB. Após 5 min de repouso, a placa de leitura foi montada e as absorbâncias foram determinadas por espectrofotometria a 412 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de GSH por miligrama de proteína (nmol / mg proteína).

4.3.3 Quantificação da expressão hepática de NRF-2 e eNOS por Western Blotting

Fragmentos de fígado (50mg) foram homogeneizados em 1 mL de tampão de lise contendo inibidores de protease com auxílio do Homomixer. As suspensões foram incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C por 20 min.

O sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -80°C. A concentração de proteína foi mensurada pelo método colorimétrico de Bradford. Cinquenta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Após bloqueio com Solução TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado por 2 h à temperatura ambiente, a membrana foi incubada “overnight” a 4°C com os anticorpos monoclonais primários anti-Nfr2 (Ab31163), 1:200, Abcam, anti-eNOS (9572S) Cell Signaling e GAPDH (D16H11), diluição 1:200, Cell Signaling. O anticorpo secundário foi utilizado na proporção 1:10.000 em TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado, com incubação por 1 hora. Foram realizados 3 ciclos de lavagem com TBS contendo 0,05% Tween 20 entre as incubações das membranas. ECL primer (Amersham Biosciences) foi o reagente utilizado para revelar o sinal quimioluminescente. As imagens foram fotografadas por câmara CCD, equipamento ChemiDoc™ XRS, BioRad. Utilizamos software Image Lab, BioRad para quantificar a intensidade das bandas.

4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA HEPÁTICA

4.4.1 Quantificação da expressão hepática do Fator Nuclear Kappa B (NFκB) por Western Blotting

Fragmentos de fígado (50mg) foram homogeneizados em 1 mL de tampão de lise contendo inibidores de protease com auxílio do Homomixer. As suspensões foram incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 13.000 rpm à 4°C por 20 min. O sobrenadante foi alíquotado e armazenado -80°C. A concentração de proteína foi mensurada pelo método colorimétrico de Bradford. Cinquenta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Após bloqueio com Solução TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado por 2 h à temperatura ambiente, a membrana foi incubada “overnight” a 4°C com os anticorpos monoclonais primários anti-NFκB, sc-372, 1:500, e GAPDH (D16H11), diluição 1:200, Cell Signaling. O anticorpo secundário foi utilizado na proporção 1:10.000 em TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado, com incubação por 1 hora. Foram realizados 3 ciclos de lavagem com

TBS contendo 0,05% Tween 20 entre as incubações das membranas. ECL primer (Amersham Biosciences) foi o reagente utilizado para revelar o sinal quimioluminescente. As imagens foram fotografadas por câmara CCD, equipamento ChemiDoc™ XRS, BioRad. Utilizamos software Image Lab, BioRad para quantificar a intensidade das bandas.

4.4.2 Avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL1- β e TNF- α por reação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Amostras hepáticas coletadas e congeladas imediatamente em solução de RNA Later (R0901-Sigma) foram utilizadas para a quantificação da expressão gênica dos genes IL1- β e TNF- α . Os fragmentos teciduais foram homogeneizados e submetidos à extração do RNA total utilizando kit específico (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemanha). Na sequência, o DNA complementar foi obtido por transcrição reversa a partir de 1 μ g de RNA total utilizando kit de retro-transcrição (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads e pd(N)6 Random Hexamer, Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, EUA). A amplificação gênica com simultânea quantificação foi realizada por meio do Sistema PCR “real-time” StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se primers específicos para os genes murinos da IL1- β e TNF- α (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems), e a enzima Taq Polimerase (TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG - 2X, Applied Biosystems,). Foi empregado o método Δ CT para a análise das diferenças entre as amostras, utilizando-se o gene GAPDH como gene referência.

4.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

4.5.1 Quantificação da expressão hepática de PCNA e Ciclina D1 por Western Blotting

Fragmentos de fígado (50mg) foram homogeneizados em 1 mL de tampão de lise contendo inibidores de protease com auxílio do Homomixer. As suspensões foram incubadas em gelo por 15 min e centrifugadas a 13.000 rpm à 4°C por 20 min. O sobrenadante foi alíquotado e armazenado -80°C. A concentração de proteína foi mensurada pelo método colorimétrico de Bradford. Cinquenta microgramas de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e

transferidas para membrana de PVDF (Amersham Biosciences). Após bloqueio com Solução TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado por 2 h à temperatura ambiente, a membrana foi incubada “overnight” a 4°C com os anticorpos monoclonais primários anti-PCNA (Sc-7907), 1:200, Santa Cruz, anti-Ciclina D1 (92G2), Cell Signaling e GAPDH (D16H11), diluição 1:200, Cell Signaling. O anticorpo secundário foi utilizado na proporção 1:10.000 em TBS (pH 7,4) contendo 0,05% Tween 20 (Sigma) e 5% de leite desnatado, com incubação por 1 hora. Foram realizados 3 ciclos de lavagem com TBS contendo 0,05% Tween 20 entre as incubações das membranas. ECL primer (Amersham Biosciences) foi o reagente utilizado para revelar o sinal quimioluminescente. As imagens foram fotografadas por câmara CCD, equipamento ChemiDoc™ XRS, BioRad. Utilizamos software Image Lab, BioRad para quantificar a intensidade das bandas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio de um microcomputador equipado com o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Todos os dados foram descritos como média $\pm$ erro padrão da média. Comparações estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal–Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ou Mann–Whitney. Valores de probabilidade menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DO PQQ NA LESÃO PARENQUIMATOSA APÓS IRH

O grau de lesão hepática foi avaliado tanto pela dosagem sérica das transaminases hepáticas quanto pela avaliação do dano parenquimatoso por meio da observação de lâminas produzidas a partir de fragmentos hepáticos corados em H&E. Nas duas análises foram encontradas alterações relacionadas às consequências exercidas pela lesão por isquemia e reperfusão nos animais, nos quais, o modelo experimental foi realizado. Foi observado no grupo controle (animais que foram submetidos ao procedimento de isquemia e reperfusão seguida de hepatectomia) aumento na concentração sérica das aminotransferases ALT ($1937 \pm 220,4$) e AST ($3119 \pm 161,3$), bem como elevado escore de dano parenquimatoso ($1,197 \pm 0,10$) em comparação com os animais do grupo SHAM (grupo submetido à cirurgia simulada) ($28,13 \pm 1,576$), ($42,00 \pm 14,36$) e ($0,23 \pm 0,088$), respectivamente ($p < 0,01$). As alterações encontradas nas lâminas variaram desde vacuolizações no citoplasma até necrose e hemorragia (Figura 2). Por outro lado, no grupo dos animais que receberam PQQ como tratamento esses valores foram significativamente diminuídos ($1230 \pm 285,4$), ($2281 \pm 128,7$) e $0,36 \pm 0,058$ em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 4 e 5).

Figura 4: Fotomicrografias de fragmentos hepáticos corados em H&E (aumento de 400x). Observa-se nas imagens alterações secundárias a lesão por isquemia e reperfusão. Observa-se vacuolização citoplasmática (A), hipereosinofilia celular (B), necrose (C) e congestão e hemorragia (D).

Tabela dos valores de ALT, AST e Dano parenquimatoso dos grupos SHAM, Controle e PQQ. Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

	SHAM	CONTROLE	PQQ
ALT	28,13 $\pm$ 1,576	1937 $\pm$ 220,4	1230 $\pm$ 285,4
AST	42,00 $\pm$ 14,36	3119 $\pm$ 161,3	2281 $\pm$ 128,7
DANO PARENQUIMATOSO	0,23 $\pm$ 0,088	1,197 $\pm$ 0,10	0,36 $\pm$ 0,058

Figura 5: Representação gráfica da avaliação da lesão parenquimatosa. Representação da avaliação dos grupos experimentais pelo escore do dano parenquimatoso (A) feito pela avaliação das lâminas coradas em H&E. Representação gráfica da dosagem sérica de aspartato aminotransferase (AST) (B) e alanina aminotransferase (AST) (C) dos grupos experimentais. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. • $p < 0,05$ CONTROLE x SHAM; * $p < 0,05$ CONTROLE x PQQ.

Figura 6: Fotomicrografias de fragmentos hepáticos corados em H&E (aumento de 400x). Observa-se que o tratamento com PQQ reduziu o dano parenquimatoso. A: Animais do grupo SHAM, B: Animais do grupo Controle, C: Animais do grupo PQQ.

Após a realização do modelo experimental, um grupo de animais foi mantido por seis horas e o outro grupo por trinta horas. No grupo de trinta horas de reperfusão é possível notar a modificação da morfologia dos hepatócitos (Figura 6), bem como uma melhor caracterização das lesões (Figura 7).

Figura 7: Fotomicrografias de fragmentos hepáticos corados em H&E (aumento de 400x). Fotomicrografias representativa dos animais do grupo mantido vivo por 6 (A) e 30 horas (B) após o desenvolvimento do modelo experimental. Observa-se alteração na arquitetura dos cordões de hepatócitos devido a resposta ao estímulo de proliferação 30 horas após a hepatectomia.

Figura 8: Fotomicrografias de fragmentos hepáticos corados em H&E (aumento de 400x). Observa-se que a melhor caracterização das lesões observadas em 6 horas. A: fragmento hepático dos animais do grupo SHAM, B: fragmento hepático dos animais do grupo Controle, C: fragmento hepático dos animais do grupo PQQ.

5.2 EFEITOS DO PQQ NO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS IRH

Na avaliação do estresse oxidativo realizada pela dosagem do MDA, um produto da peroxidação lipídica, foi observado que o tratamento com PQQ foi capaz de reduzir a formação desse produto. Foram encontrados níveis significativamente diminuídos de MDA no grupo PQQ ($61,21 \pm 1,729$) em comparação ao grupo controle ($79,57 \pm 5,181$) ($p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9. Representação gráfica da avaliação do estresse oxidativo avaliado pela dosagem de MDA hepático. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ CONTROLE x PQQ.

O estresse oxidativo também foi avaliado pela dosagem da glutathiona hepática reduzida. O tratamento com PQQ foi capaz de preservar os níveis de GSH hepático após a lesão por IRH sendo observados níveis elevados no grupo PQQ ($0,41 \pm 0,036$) em comparação ao grupo controle ($0,29 \pm 0,026$). Os níveis de GSH encontrados no grupo PQQ foram semelhantes aos do grupo SHAM ($0,5168 \pm 0,05521$), ($p = 0,30$) (Figura 10).

Figura 10. Representação gráfica da avaliação do estresse oxidativo avaliado pela dosagem de GSH hepático. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ CONTROLE x PQQ; • $p < 0,05$ CONTROLE x SHAM.

A fim de avaliar a resposta desenvolvida contra o estresse oxidativo no fígado, foram mensuradas as concentrações hepáticas do fator de transcrição NRF2 por meio da técnica de Western Blotting. Os níveis hepáticos de NRF2 foram avaliados nos animais dos grupos de 6 horas e de 30 horas e a expressão desse fator ocorreu da seguinte forma: No grupo de 6 horas foi observado que as médias de expressão de NRF2 estavam mais altas no grupo controle ($1,24 \pm 0,083$) e no grupo PQQ ($1,11 \pm 0,027$) em comparação ao grupo SHAM ($0,72 \pm 0,05$). Embora a diferença tenha sido apenas marginalmente significativa na comparação entre grupo controle e SHAM ($p = 0,057$). Também não foi observada diferença estatística na comparação entre o grupo controle e PQQ ($p = 0,19$). No grupo de 30 horas foi observado que os níveis hepáticos de NRF2 apresentaram-se aumentados no grupo PQQ ($1,181 \pm 0,06$) em relação àqueles encontrados nos animais do grupo controle ($0,9038 \pm 0,06$) ($p < 0,05$) demonstrando que a resposta protetora não pôde ser sustentada no grupo controle e que o tratamento com PQQ auxiliou a manutenção dessa resposta. Todavia a diferença em relação ao grupo SHAM não foi estatisticamente significativa ($p = 0,11$) (Fig. 11).

Fig. 11. A: Representação das bandas de NRF2 e GAPDH obtidas por Western blotting dos grupos SHAM, Controle e PQQ. B: Representação gráfica da quantificação do conteúdo tecidual de NRF2. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ CONTROLE 30h x PQQ 30h.

Visto que a expressão da Oxido nítrico sintase endotelial (eNOS) está associada à produção natural de NO, foi avaliada a expressão hepática dessa proteína por Western blotting. Os níveis de expressão de eNOS dos animais dos grupos controle de 6 horas ($0,289 \pm 0,0315$) e PQQ de 6 horas ($0,259 \pm 0,0174$) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando foi comparado com o grupo SHAM ($0,25 \pm 0,022$) ou entre si ($p = 0,38$, $p = 0,69$, respectivamente). Os níveis de expressão de eNOS apresentaram-se diminuídos quando comparado o grupo controle de 30 horas ($0,094 \pm 0,010$) com o grupo SHAM ($0,25 \pm 0,022$) ($p < 0,05$). O

mesmo ocorreu na comparação entre o grupo PQQ de 30 horas ($0,092 \pm 0,004$) com o grupo SHAM ($0,25 \pm 0,022$) ($p < 0,05$). Porém o tratamento com PQQ parece não ter influenciado na expressão hepática da eNOS visto que na comparação entre grupos controle e PQQ não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,90$).

A

B

Fig. 12. . A: Representação das bandas de NRF2 e GAPDH obtidas por Westernblotting dos grupos SHAM, Controle e PQQ. B: Representação gráfica da quantificação do conteúdo tecidual de NRF2. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. * $p < 0,05$ CONTROLE 30h x PQQ 30h.

5.3 EFEITOS DO PQQ NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA HEPÁTICA APÓS IRH

A avaliação da resposta inflamatória foi realizada pela quantificação hepática de NFκB, um fator de transcrição envolvido na regulação da resposta inflamatória, e pela quantificação da expressão gênica hepática das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL1β.

O conteúdo hepático de NFκB dos animais pertencentes ao grupo controle foi aumentado ($1,58 \pm 0,06$) em comparação ao grupo SHAM ($0,94 \pm 0,07$) ($P < 0,05$). Porém esses níveis foram reduzidos nos grupo PQQ ($1,06 \pm 0,07$) ($P < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13: A: Representação das bandas de NFκB e GAPDH obtidas por Westernblotting dos grupos SHAM, Controle e PQQ. B: Representação gráfica da quantificação do conteúdo tecidual de NFκB. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. • $p < 0,05$ CONTROLE x SHAM; * $p < 0,05$ CONTROLE x PQQ.

Os níveis de expressão de IL-1 β apresentaram-se significativamente aumentados no grupo controle ($6,08 \pm 1,95$) em comparação ao grupo SHAM ($0,95 \pm 0,10$). Contudo, esses níveis foram significativamente diminuídos nos animais tratados com PQQ ($1,49 \pm 0,39$) ($p < 0,05$). A outra citocina pró- inflamatória analisada, TNF- α , apresentou a média menor nos animais pertencentes ao grupo tratado com PQQ ($4,23 \pm 0,85$) em relação ao grupo controle ($5,01 \pm 1,6$), embora a diferença entre eles não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa ($P = 0,78$). (Fig.14).

A

B

Figura 14: Representação gráfica da avaliação da expressão gênica das citocinas IL-1 β (A) e TNF- α (B). Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M. • $p < 0,05$ CONTROLE x SHAM; * $p < 0,05$ CONTROLE x PQQ.

5.4 EFEITOS DO PQQ NA PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS IRH

Para avaliar o efeito do tratamento com PQQ na proliferação celular foram analisadas a expressão hepática de PCNA e de Ciclina D1 por Western blotting. Essa análise foi realizada nos fragmentos hepáticos dos animais pertencentes ao grupo mantido por 30 horas após a reperfusão. Os níveis de expressão de PCNA e da Ciclina D1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando foi comparado o grupo controle ($0,56 \pm 0,039$) com o grupo PQQ ($0,45 \pm 0,062$) ($p=0,11$, $p=0,41$, respectivamente) (Fig.15, Fig 16).

Fig. 15. Representação gráfica da avaliação da proliferação avaliada pela quantificação de PCNA por Westernblotting. A: Representação das bandas de PCNA e GAPDH obtidas por Westernblotting dos grupos SHAM, Controle e PQQ. B: Representação gráfica da quantificação do conteúdo tecidual de PCNA. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M.

Fig. 16. Representação gráfica da avaliação da proliferação avaliada pela quantificação de Ciclina por Westernblotting. A: Representação das bandas de Ciclina e GAPDH obtidas por Westernblotting dos grupos SHAM, Controle e PQQ. B: Representação gráfica da quantificação do conteúdo tecidual de PCNA. Os dados são mostrados como média $\pm$ S.E.M.

6 DISCUSSÃO

A lesão por IR é um evento frequente nas cirurgias hepáticas, como em hepatectomias para exérese tumoral, em cirurgias de reparo do trauma hepático e nos transplantes de fígado. Em todas essas condições cirúrgicas, o fígado é submetido temporariamente a uma completa interrupção do seu suprimento sanguíneo. A consequência desse fato não se restringe à ocorrência de lesões capazes de comprometer o funcionamento hepático pós- cirúrgico, mas se estende ao prejuízo da capacidade replicativa dos hepatócitos remanescentes. Fígados submetidos à ressecção parcial aliada à IR exibem menor atividade proliferativa hepatocelular em comparação a fígados submetidos apenas à ressecção (SELZNER; CAMARGO; CLAVIEN, 1999). Desse modo, estratégias que diminuam a lesão por IR e favoreçam a regeneração hepática apresentam potencial terapêutico para as situações de transplantes e ressecções hepáticas (SAIDI et al., 2014 a; SEKI et al., 2012; SELZNER; CAMARGO; CLAVIEN, 1999). O PQQ apresenta-se como uma substância promissora na proteção do fígado contra a lesão por IR. No presente estudo observamos uma significativa redução do dano parenquimatoso hepático nos camundongos administrados com o PQQ em relação aos animais controle. Esse achado foi acompanhado pela redução dos níveis séricos das aminotransferases ALT e AST no grupo tratado com o PQQ em comparação ao grupo Controle. Resultados semelhantes foram relatados em estudos prévios nos quais o PQQ foi também empregado em situações de lesão por IR. A administração do PQQ resultou em atenuação do dano pós-IR em órgãos como o coração (BAUERLY et al., 2011; ZHU et al., 2004; ZHU et al., 2006) e o cérebro (JENSEN et al., 1994; ZHANG; FEUSTEL; KIMELBERG, 2006).

O restabelecimento do fluxo sanguíneo ao final do período isquêmico também representa uma etapa de agressão ao parênquima hepático. Um dos principais eventos que compõem a patogênese da lesão pós-reperfusão é o estresse oxidativo (GRANGER; KVIETYS, 2015). No presente estudo, o estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação de um produto da peroxidação lipídica, o MDA. A partir da determinação dos níveis teciduais de MDA pode-se estimar o dano causado às membranas celulares pelas ROS. Adicionalmente, a resposta orgânica contra o estresse oxidativo foi avaliada pela mensuração da reserva antioxidante tecidual

representada pelo conteúdo hepático de GSH. O estresse oxidativo também induz a separação do fator de transcrição NRF2 de seu inibidor, evitando sua degradação e promovendo a transcrição nuclear de enzimas citoprotetoras. No atual estudo, a avaliação da expressão hepática do fator NRF2 revelou um comportamento distinto entre os grupos experimentais de 6 horas e de 30 horas pós- reperusão. Em 6 horas, os níveis teciduais de NRF2 apresentaram-se aumentados nos grupos Controle e PQQ em relação ao grupo Sham, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e PQQ. No entanto, em 30 horas, os níveis hepáticos de NRF2 estavam significativamente mais altos no grupo PQQ em relação ao grupo Controle. Percebe-se que, no fígado dos animais Controle, houve diminuição das quantidades do fator NRF2 em 30 horas em relação aos valores observados em 6 horas pós- reperusão. Kwak et al. (2003) haviam demonstrado que certos tipos de antioxidantes podem induzir resposta contra o estresse oxidativo por meio da estimulação da via NRF2/keap1. Outros estudos demonstraram que a deficiência em NRF2 está ligada a maior susceptibilidade ao estresse oxidativo (ENOMOTO et al., 2001; KRAFT et al., 2004). O NRF2 é conhecido como principal fator ativador de genes que codificam enzimas relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo e xenobióticos (MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2004). Seu inibidor, o fator Keap1, atua como um sensor primário de estresse oxidativo, de forma que em condições livres de estresse este se interage ao NRF2, direcionando-o para a degradação no proteassoma. Dessa forma, a ação de Keap1 impede a transcrição gênica de enzimas antioxidantes (MCMAHON et al., 2003). Considerando que a ativação do NRF2 conduz à transcrição de enzimas que promovem a sobrevivência celular, há a hipótese de que a redução do dano hepático observada nos animais tratados com PQQ no presente estudo possa estar relacionada à maior taxa de ativação do fator NRF2. Recente trabalho confirmou a relação entre baixos níveis de NRF2 e maior ocorrência de necrose tissular (ORRÚ et al., 2018). Esses autores observaram que camundongos geneticamente deficientes em NRF2 exibiram resposta inflamatória mais intensa e maior área de necrose hepática quando submetidos à intoxicação aguda pela dietil-nitrosamina. Anteriormente, Hirayama et al. (2003) já haviam demonstrado que a diminuição das defesas antioxidantes pela deficiência do fator NRF2 resulta em menor capacidade de neutralização das ROS produzidas no fígado. Semelhantemente, Enomoto et al. (2001) demonstraram que a deficiência de NRF2 torna os camundongos mais

susceptíveis ao estresse por xenobióticos por reduzir a expressão de enzimas citoprotetoras.

O principal mecanismo de ação das ROS é a peroxidação lipídica das membranas celulares conduzindo à morte celular. O MDA é um produto central da peroxidação lipídica, participando da patogênese de diversas doenças, como a aterosclerose, o diabetes mellitus e doenças relacionadas à idade avançada (CHIO; TAPPEL, 1969). No presente estudo observou-se que o tratamento com PQQ reduziu os níveis de MDA produzidos pela lipoperoxidação das membranas no fígado isquêmico. Esse achado corrobora os resultados relativos à redução do dano hepático nos animais tratados com PQQ: uma menor lipoperoxidação das membranas e menor ativação da resposta inflamatória pelas ROS resultam em maior preservação do parênquima hepático.

Semelhantemente ao presente estudo, foi demonstrada a atenuação do estresse oxidativo pela redução dos níveis de MDA em miocárdios isquêmicos de animais tratados com PQQ. Esses estudos evidenciaram a diminuição dos níveis de MDA miocárdico tanto em animais cuja dieta foi suplementada com PQQ, como naqueles que receberam pré-tratamento e tratamento com PQQ durante a reperfusão miocárdica (ZHU et al., 2004; ZHU et al., 2006).

Em conformidade com a proteção contra o estresse oxidativo induzida pelo PQQ, constatou-se, ainda, no presente estudo, uma significativa preservação das reservas antioxidantes celulares representadas pelos estoques hepáticos de GSH. O GSH é reconhecido como o antioxidante mais abundante nos hepatócitos, desempenhando importante papel na manutenção da homeostase da oxirredução tecidual (YUAN; KAPLOWITZ, 2009; LU, 2013). Durante a IR normotérmica hepática, sobretudo durante a fase de reperfusão, observa-se um considerável consumo das reservas celulares de agentes antioxidantes (EL-BAHY et al, 2011; GEDIK et al., 2008; VAN DER BILT et al., 2005). Sabe-se, ainda, que animais dotados de elevados níveis celulares de enzimas eliminadoras de ROS exibem maior resistência às lesões por IR (KINOCHI et al., 1991). A proteção contra o estresse oxidativo induzida pelo PQQ foi também observada em outros trabalhos, nos quais o PQQ minimizou o estresse oxidativo tanto por eliminação direta dos radicais livres, quanto pela indução de mecanismos que previnem a geração de ROS (MISRA et al., 2004; TAO et al., 2007, ZHU et al., 2004, ZHU et al., 2006). Em nosso estudo, os camundongos tratados com PQQ apresentaram os níveis

hepáticos de GSH significativamente preservados. Resultados semelhantes foram encontrados quando o PQQ foi utilizado na suplementação da dieta dos animais. O PQQ foi capaz de restaurar os níveis hepáticos de GSH próximo a níveis normais em ratos sob estresse oxidativo secundário à ingestão de etanol (SINGH; PANDEY; KUMAR, 2014) ou devido à idade avançada (SINGH et al., 2015). Nos estudos de Nishigori, Ishida e Ogiwara-Umeda (1993) e Nishigori et al. (1989), o tratamento com PQQ também resultou em preservação dos níveis hepáticos de GSH em modelo de dano hepático induzido por glicocorticóides em ovos fertilizados de galinha.

Tendo em vista que a disfunção vascular integra a patogênese da lesão por IR (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011), e que a produção constitutiva de NO está relacionada à preservação da microvasculatura hepática (KHADDAJ et al., 2017), no presente estudo foi avaliada a expressão hepática da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Foi observada redução significativa da expressão de eNOS nos grupos 30 horas pós-reperfusão, tanto no grupo Controle quanto no grupo PQQ em relação ao grupo Sham. No entanto, não houve diferença entre os níveis hepáticos de eNOS entre os grupos Controle e PQQ. A proteção exercida pelo NO de origem endotelial diante da lesão por IR foi evidenciada por estudos que utilizaram inibidores seletivos da eNOS, cujos resultados demonstraram a exacerbação da lesão hepática em razão do emprego desses inibidores (LIU et al., 1998). Lefer & Lefer (1999) também demonstraram em estudo experimental que níveis reduzidos de eNOS estão relacionados a maior dano intestinal pós-IR. Kawachi et al. (2010) apresentam dados que comprovam que camundongos geneticamente deficientes em eNOS apresentam maior lesão hepática secundária a IR, enquanto aqueles que eram deficientes em iNOS exibem menor intensidade de lesão.

Sabe-se que o estresse oxidativo tecidual pode induzir a ativação de fatores de transcrição e a secreção de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias (LAKHAN; KIRCHGESSNER; HOFER, 2009). No presente trabalho, a resposta inflamatória avaliada pela quantificação do conteúdo hepático de NFκB e da citocina pró-inflamatória IL-1β foi atenuada pelo tratamento com o PQQ. O fator de transcrição NFκB é responsável pela transcrição gênica de diversos mediadores pró-inflamatórios durante a IR. Sua inibição tem sido alvo de diversos estudos sobre IR hepática, com resultados favoráveis relacionados à melhora das lesões isquêmicas (SIMMONS et al., 2016; GUO et al., 2012; WEI et al., 2010). Em nosso estudo, foi demonstrado que a expressão hepática do NFκB encontrava-se elevada em

resposta a IR normotérmica. Esse comportamento já havia sido observado em estudos similares relativos à isquemia hepática (EL-BAHY et al., 2011; WEI et al., 2010). A fim de se avaliar se a resposta protetora induzida pelo PQQ estava relacionada à redução da atividade inflamatória hepática, nós mensuramos a expressão do NFkB no fígado de animais tratados com PQQ e de animais Controle. Observou-se que o tratamento com PQQ foi capaz de reduzir as concentrações hepáticas NFkB em relação ao grupo Controle. Em conformidade com nossos resultados, Yang et al. (2014) demonstraram que o PQQ pode suprimir a ativação do fator NFkB em cultivo primário de células da micróglia estimuladas por lipopolissacáride (LPS). Adicionalmente, o PQQ atenuou a ativação da micróglia no córtex cerebral de camundongos tratados sistemicamente com LPS.

A ativação do NFkB está diretamente envolvida com a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais e pelas células de Kupffer ativadas. Citocinas como o TNF- α e a IL1- β são maciçamente produzidas durante a fase de reperfusão e exercem papel fundamental na fisiopatologia da lesão por IR (KIM, KIM, LEE, 2015; PERRY et al., 2011; WEI et al., 2010). Consistente com a redução dos níveis hepáticos de NFkB obtida pelo tratamento com PQQ, no presente estudo também foi demonstrada redução da expressão gênica da citocina IL1- β no fígado dos camundongos tratados com PQQ em comparação aos camundongos controle. Resultados similares foram relatados por Yang et al. (2014) utilizando cultivo primário de células da micróglia estimuladas por LPS. Esses autores reportaram supressão da expressão dos mediadores pró- inflamatórios TNF- α , IL1- β , IL-6, iNOS e COX2 nas células da micróglia pré-tratadas com o PQQ. O papel anti-inflamatório e antioxidante de PQQ foi também avaliado em estudo com humanos. Marcadores de atividade inflamatória e de estresse oxidativo foram analisados no plasma de voluntários saudáveis após receberem doses orais de PQQ durante 3 dias. Os níveis plasmáticos de proteína C reativa, de IL-6 e de MDA estavam significativamente diminuídos ao final do período de tratamento com o PQQ (HARRIS et al., 2013).

Alguns estudos demonstraram que a lesão por IR pode reduzir significativamente a capacidade proliferativa dos hepatócitos (BOLITHO et al., 1993; SELZNER; CAMARGO; CLAVIEN, 1999; USAMI et al., 1994). Animais submetidos à hepatectomia parcial após longos períodos de isquemia exibem menor taxa de proliferação hepatocelular quando comparados a animais submetidos apenas à

hepatectomia. Esse fato está relacionado não apenas à lesão celular imposta pela isquemia normotérmica, mas, sobretudo, ao dano tissular advindo da reperfusão sinusoidal. Entretanto, algumas estratégias terapêuticas têm sido propostas com o intuito de minimizar o efeito deletério da IR sobre a proliferação hepatocelular. A utilização de IL-6 recombinante, células tronco mesenquimais, inibidores do sistema complemento e estratégias de pré-condicionamento hepático têm apresentado bons resultados devido ao seu efeito protetor frente à IR aliado à capacidade de estimular os hepatócitos a adentrarem o ciclo celular (BEDIRLI et al., 2005; SAIDI et al., 2014a; SAIDI et al., 2014b; SELZNER; CAMARGO; CLAVIEN, 1999). Em nosso estudo conjecturamos que o PQQ pudesse exercer efeito semelhante em virtude de sua reconhecida capacidade protetora frente ao estresse oxidativo causado pela IR (ZHU et al., 2004, ZHU et al. 2006) associada à sua eficácia em induzir a proliferação de diferentes tipos celulares, inclusive hepatócitos (HUANG; CHEN; MIAO, 2015; KIMURA et al., 2012; KUMAZAWA et al. 2007; NAITO et al., 1993).

O PQQ foi inicialmente descrito como um fator estimulador do crescimento de microrganismos e plantas (CHOI et al., 2008; GHOSH; CHAKRABORTY; RAYCHAUDHURI, 2013). Em seguida foi demonstrado que o PQQ é capaz de estimular a proliferação de hepatócitos, células epiteliais e células do tecido conjuntivo (HUANG; CHEN; MIAO, 2015; KIMURA et al., 2012; KUMAZAWA et al. 2007; LI et al., 2011; NAITO et al., 1993). Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos. Todavia, Huang , Chen e Miao (2015) revelaram que o PQQ inibiu a apoptose e induziu proliferação hepatocelular por meio da inibição de p53 e das proteínas inibidoras do ciclo celular p16, p21 e p27 em modelo murino de lesão hepática produzida pela deleção da proteína BMI-1. Adicionalmente, Kimura et al. (2012) evidenciaram que PQQ estimula a proliferação de células epiteliais em função de sua capacidade de induzir fosforilação do resíduo de tirosina do receptor de EGF, tornando-o ativo. Além disso, PQQ pode inibir a proteína tirosina fosfatase 1B, a qual é responsável pela inibição do EGF. A ativação do EGF pelo PQQ resulta em incremento da expressão celular de ciclina D1 e consequente proliferação in vitro das células epiteliais A431 (KIMURA et al., 2012). Outros estudos demonstraram que PQQ pode também atuar como fator de crescimento para fibroblastos em cultura (KUMAZAWA et al. 2007; NAITO et al., 1993). Kumazawa et al. (2007) observaram que o PQQ induziu ativação da via de sinalização celular mediada por Ras, com fosforilação das proteínas Rb e c-jun, e

inibição de IKappaB e p27, culminando com o favorecimento da progressão dos fibroblastos NIH3T3 através do ciclo celular.

Nossos achados, entretanto, mostraram que, embora tenha exibido importante efeito protetor sobre a lesão hepática pós-IR, o PQQ não foi capaz de estimular a proliferação hepatocelular nos fígados isquêmicos nos períodos avaliados. Nesse sentido, constatamos que os níveis hepáticos de PCNA e de ciclina D1 nos animais tratados com PQQ não foram estatisticamente diferentes dos níveis apresentados pelos animais pertencentes ao grupo Controle. PCNA e ciclina D1 são importantes marcadores da proliferação celular, pois são expressos por células em proliferação na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (BUTT et al., 2005; XIE et al., 2017). Acreditamos que o período escolhido para a avaliação da proliferação celular tenha sido insuficiente para a ocorrência simultânea de proteção frente a IR e incremento da proliferação hepatocelular. No estudo de Selzner, Camargo e Clavien (1999) utilizou-se um período de 30 minutos de isquemia normotérmica aliado a 70% de ressecção hepática e 72 horas de reperfusão. Esses mesmos autores haviam apontado que um período de 45 minutos de isquemia estava associado a 100% mortalidade dos animais após 72 horas de reperfusão. Said et al. (2014a), por outro lado, empregaram um período de 60 minutos de isquemia, 70% de ressecção hepática, e avaliação da proliferação celular apenas 24 horas após a cirurgia. Diante disso, no presente estudo optamos por empregar um período de 45 minutos de isquemia hepática associada a 70% de ressecção, com avaliação da atividade proliferativa 30 horas após a cirurgia.

Outra possível justificativa para a ausência de efeito do PQQ sobre a proliferação hepatocelular no presente estudo foram os achados relativos à ação inibitória do PQQ sobre a expressão hepática do fator de transcrição NFkB. Sabe-se que o NFkB está envolvido na transcrição gênica de proteínas indutoras de proliferação celular, e que seu bloqueio está relacionado com menor resposta proliferativa (PLUMPE et al., 2000).

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo fornecem evidências de que o PQQ é capaz de proteger o parênquima hepático contra a lesão induzida pela IR normotérmica associada à hepatectomia em função de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A partir dos resultados obtidos fica evidenciada a importante redução dos indicadores de lesão hepática por meio de mecanismos que parecem estar relacionados à atenuação do estresse oxidativo tecidual, confirmada pela diminuição da peroxidação lipídica das membranas, preservação da reserva antioxidante celular e pela ativação de mecanismos antioxidantes protetores. O PQQ atuou, ainda, por meio da modulação da resposta inflamatória aguda demonstrada pela redução da expressão hepática do fator de transcrição NFkB e de citocinas pró-inflamatórias.

Tendo em vista todos os efeitos benéficos do PQQ demonstrados no presente estudo e por outros autores, e que o PQQ aparentemente não apresenta toxicidade para humanos, ensaios clínicos poderiam avaliar o potencial de utilização do PQQ na terapia de doenças inflamatórias e/ou de processos patológicos envolvendo estresse oxidativo agudo.

REFERÊNCIAS

ARBOUR, N. C. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nat Genet** . v. 25, p. 187–191, 2000.

BARNOUIN, K. et al. H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. **J Biol Chem**, v. 277, n. 16, p. 13761-70, 2002.

BAUERLY, K. et al. Altering pyrroloquinoline quinone nutritional status modulates mitochondrial, lipid, and energy metabolism in rats. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-13, 2011.

BECKMAN J.S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 4, p. 1620-4, 1990.

BEDIRLI, A. et al. Effects of ischemic preconditioning on regenerative capacity of hepatocyte in the ischemically damaged rat livers. **J Surg Res** , v. 125, n. 1, p. 42-8, 2005.

BOLITHO, G. et al. Liver regeneration after hepatic ischemia and reduced liver autotransplantation in the rat. **Hepatology** , v. 17, p. 273-279, 1993.

BUCHER, N. L.; SWAFFIELD, M. N. The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. **Cancer Res** , v. 24, p. 1611–1625, 1964.

BUTT, A. J. et al. Downstream targets of growth factor and estrogen signaling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. **Endocr Relat Cancer** , v. 12, p. S47–59, 2005.

CANNISTRÀ, M. et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. **Int J Surg** , v. 33, p. S57-70, 2016.

CAST, A. E.; WALTER, T.J.; HUPPERT, S.S. Vascular patterning sets the stage for macro and micro hepatic architecture. **Dev Dyn** , v. 244, n. 3, p. 497-506, 2015.

CHEN, G.Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol** , v. 10, p. 826–837, 2010.

CHEN, T.S.; CHEN, P.S. The myth of Prometheus and the liver. **J R Soc Med** , v. 87, n. 12, p. 754-755, 1994.

CHIO, K. S.; TAPPEL, A. L. Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. **Biochemistry** , v. 8, p. 2827–32, 1969.

CHOI, O., et al. Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. **Plant Physiol** , v. 146, p. 657–668, 2008.

COLLO, G.; PEPPER, M. S. Endothelial cell integrin $\alpha 5 \beta 1$ expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. **J Cell Sci** , v. 112, n. 4, p. 569-78, 1999.

COURT, F. G. et al. The mystery of liver regeneration. **Br J Surg** , n. 89 v. 9, p. 1089–95, 2002.

DELEVE, L.D. et al. Rat liver sinusoidal endothelial cell phenotype is maintained by paracrine and autocrine regulation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** , v. 287, p. G757–763, 2004.

EL-BAHY, A. A. et al. Antiapoptotic effect of DDB against hepatic ischemia reperfusion injury. **J Toxicol Sci** , v. 36, n. 2, p. 145-54, 2011.

ELTZSCHIG, H. K. ; COLLARD, C. D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. **British Medical Bulletin**, v. 70, p. 71–86, 2004.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. **Nat Med** , v. 17, n. 11, p. 1391-401, 2011.

EMOND, J. C. et al. Functional analysis of grafts from living donors. Implications for the treatment of older recipients. **Ann Surg** , n.224,p. 544–52, 1996.

ENOMOTO, A. et al. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. **Toxicol Sci** , v. 59, p. 169–177, 2001.

FAUSTO, N. Hepatocytes break the rules of senescence in serial transplantation studies. Is there a limit to their replicative capacity? **Am J Pathol** , v. 151, n. 5, p. 1187-9, 1997.

FURCHTGOTT, L. A.; CHOW, C. C.; PERIWAL, V. A Model of Liver Regeneration, v. 96,n.10,p. 3926-3935, 2009.

GEDIK, E. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. **World J Gastroenterol** , v. 14, n. 46, p. 7101-6, 2008.

GHOSH, S.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. Pyrroloquinoline quinone a redox cofactor and its involvement in biological system. **Int J Sci Nat** , v. 4, p. 371– 380, 2013.

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

GUERRIERI, F. et al. Correlation between rat liver regeneration and mitochondrial energy metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1272, n. 2, p. 95-100, 1995.

GUO, R. B. et al. Paeoniflorin protects against ischemia-induced brain damages in rats via inhibiting MAPKs/NF- κ B-mediated inflammatory responses. **PLoS One** , v. 7, n. 11, p. e49701, 2012.

HARA, H.; HIRAMATSU, H.; ADACHI, T. Pyrroloquinolinequinone is a potente neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurochem Res** ,v. 32, n. 3, p. 489-95, 2007.

HARRIS, C.B. et al. Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects. **J Nutr Biochem** , v. 24, n. 12, p. 2076-84, 2013.

HAUGE, J.G. Glucose Dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an Enzyme with a Novel Prosthetic Group. **J Biol Chem** , v. 239, n. 11, p. 3630-3639, 1964.

HE, K. et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. **Biochem Pharmacol** , HE, S. et al. A complement-dependent balance between hepatic ischemia/reperfusion injury and liver regeneration in mice. **J Clin Invest** , v. 119, p. 2304–2316, 2009.

HEATH, J. K. Principles of Cell Proliferation: Blackwell Science, Oxford, UK, 2000.

HIRAKAWA, A. et al. Pyrroloquinoline quinone attenuates iNOS gene expression in the injured spinal cord. **Biochem Biophys Res Commun** ,v. 378, n. 2, p. 308-12, 2009.

HIRAYAMA, A. et al. EPR imaging of reducing activity in Nrf2 transcriptional factor-deficient mice. **Free Radic Biol Med** , v. 34, n. 10, p. 1236-42, 2003.

HOBARA, N. et al. Quinone derivatives lower blood and liver acetaldehyde but not ethanol concentrations following ethanol loading to rats. **Pharmacology** , v. 37, n. 4, p. 264-7, 1988.

HOTCHKISS, R. S. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. **N Engl J Med** , v. 361, n. 16, p. 1570–1583, 2009.

HUANG Y.; CHEN, N.; MIAO, D. Biological effects of pyrroloquinoline quinone on liver damage in Bmi-1 knockout mice. **Exp Ther Med**. v. 10, n. 2, p. 451-458., 2015.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to

INDO H. P. et al. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. **J Clin Biochem Nutr**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2015.

JAESCHKE, H.; WOOLBRIGHT, B. L. Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. **Transplantation Reviews**, v.26, p. 103–114, 2012.

JENSEN, F.E. et al. The putative essential nutrient pyrroloquinoline quinone is neuroprotective in a rodent model of hypoxic/ischemic brain injury. **Neuroscience** , v. 62, p. 399–406, 1994.

KARATZAS, T. et al. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. **J Surg Res**, v. 191, n. 2, p. 399-412, 2014.

KASAHARA, T.; KATO, T. Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. **Nature** , v. 422, n. 6934, p. 832, 2003.

KAWACHI, S. et al. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 3, p. 851-4, 2000.

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

KHADDAJ, M. R. et al. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. **Crit Rev Clin Lab Sci**,v. 54, n. 7-8, p. 458-470, 2017.

KIM, D. S. et al. Effects of splanchnic vasoconstrictors on liver regeneration and survival after 90% rat hepatectomy. **Ann Surg Treat Res**. v. 94, n. 3, p. 118-128, 2018.

KIM, H. Y.; KIM, S. J.; LEE, S. M. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. **FEBS J** , v. 282, n. 2, p. 259-70, 2015.

KIMURA, K. et al. Pyrroloquinoline quinone stimulates epithelial cell proliferation by activating epidermal growth factor receptor through redox cycling. **Free Radic Biol Med** , v. 53, n. 6, p. 1239-51, 2012.

KINOUCHI, H. et al. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci U S A** , v. 88, n. 24, p. 11158-62, 1991.

KRAFT, A. D. et al. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinine and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. **J Neurosci** , v. 24, n. 5, p. 1101–1112, 2004.

KRUEGER, F. R. et al. Assignment of quinone derivatives as the main compound class composing ‘interstellar’ grains based on both polarity ions detected by the ‘Cometary and Interstellar Dust Analyser’ CIDA) onboard the spacecraft STARDUST. **Rapid Commun. Mass Spectrom** , v. 18, p. 103–111, 2004.

KUMAR, V. et al. Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas Das Doenças. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KUMAZAWA , T. et al. Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry. **Biochim Biophys Acta** .v. 1156, n. 1, p. 62-6,1992.

KUMAZAWA ,T.et al. Activation of Ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts. **Int J Mol Med**.v. 19, n. 5, p. 765-70, 2007.

KUMAZAWA, T et al. Levels of Pyrroloquinoline quinone in various foods. **Biochem J** , v. 307, p. 331–333, 1995.

KUPIEC-WEGLINSKI, J.W.; BUSUTTIL, R.W. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. **Transplant Proc**, v. 37, n. 4, p.1653-6, 2005.

KWAK, M. K. et al. Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway . **Molecular and Cellular Biology** , v. 23,n. 23,p. 8786–8794, 2003.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **J Transl Med**, v. 7, p. 97, 2009.

LEFER, A. M.,; LEFER, D. J. Nitric Oxide II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation **Am J Physiol** . v. 276, p. G572–G575, 1999.

LIU, P. et al. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R. **Am J Physiol** .v. 275, n. 6, p. H2191-8,1998.

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

MA, Z. et al. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury. **Cell Mol Life Sci** ,v. 74, n. 21, p. 3989-3998, 2017.

MAKINO, H. et al. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. **J Surg Res** , v. 127, n. 2, p. 171-6, 2005.

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

MCMAHON, M. et al. Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression. **J Biol Chem** , v. 278, n. 24, p. 21592–21600, 2003.

MENDES-BRAZ, M. et al. The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. **Liver Int**, v. 34, n. 7, p. e271-89, 2014.

MISRA, H. S. Et al. Pyrroloquinoline-quinone: a reactive oxygen species scavenger in bacteria. **FEBS Lett** , v. 578, n. 1-2, p. 26-30, 2004.

MISRA, H. S.; RAJPUROHIT, Y. S.; KHAIRNAR, N. P. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. **Journal of Biosciences** , v. 37, p. 313–325, 2012.

MITCHELL, A.E., et al. Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk. **Anal Biochem** , v. 269, n. 2, p. 317-25, 1999.

MIYAJIMA, A.; TANAKA, M.; ITOH, T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. **Cell Stem Cell** ,v. 14, n. 5, p. 561-74, 2014.

MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. NRF2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol Med** , v. 10, p. 549-557,2004.

NAITO, Y. et al. Effects of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and PQQ-oxazole on DNA synthesis of cultured human fibroblasts. *Life Sci*, v. 52, n. 24 p.1909- 15,1993.

NAKANO, M. et al. Effects of oral supplementation with Pyrroloquinoline quinone on stress, fatigue, and sleep. **Functional Foods in Health and Disease** , v. 2, n. 8, p. 307-324, 2012.

NAKANO, M. et al. Effects of orally administered pyrroloquinolinequinone disodium salt on dryskin conditions in mice and healthy female subjects. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**,v. 61, p. 242–247, 2015.

NISHIGORI, H. et al. Preventive effects of pyrroloquinoline quinone on formation of cataract and decline of lenticular and hepatic glutathione of developing chick embryo after glucocorticoid treatment. **Life Sciences** , vol. 45, p. 593-598, 1989.

NISHIGORI, H.; ISHIDA, O.; OGIHARA-UMEDA, I. Preventive effect of pyrroloquinoline quinone pqq) on Biliverdin accumulation of the liver of chick embryo after glucocorticoid administration. **Life Sciences** , v. 52, p. 305-312, 1993.

NOSTRANT, T. T. et al. Acinar distribution of liver cell regeneration after selective zonal injury in the rat. **Gastroenterology** , n. 75, 181-6, 1978.

NUNOME, K. et al. Pyrroloquinolinequinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1. **Biol Pharm Bull** , v. 31, n. 7, p. 1321-6., 2008.

OGAWA, S. et al. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. **Am J Physiol** , v. 262, n. 3, p. C546-54, 1992.

OHWADA, K. et al. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Prevents Cognitive Deficit Caused by Oxidative Stress in Rats. **J Clin Biochem Nutr** , v. 42, p. 29-34, 2008.

ORRÙ, C. et al. Genetic inactivation of Nrf2 prevents clonal expansion of initiated cells in a nutritional model of rat hepatocarcinogenesis. **J Hepatol** , v. 18, p. S0168-8278, 2018.

OUCHI, A. et al. Kinetic Study of the Antioxidant Activity of Pyrroloquinolinequinol (PQQH₂), a Reduced Form of Pyrroloquinolinequinone in Micellar Solution. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 2, p. 450–6, 2009.

PALMES, D.; SPIEGEL, H. Animal models of liver regeneration. **Biomaterials** . n. 25, p. 1601–1611, 2004.

PANDEY S. et al. Probiotic Escherichia coli CFR 16 producing Pyrroloquinoline quinone PQQ ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative damage in colon and liver of rats. **Appl Biochem Biotechnol** , v. 173, n. 3, p. 775-86, 2014.

PANIS, Y.; MCMULLAN, D.M.; EMOND, J. C. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. **Surgery** , v. 121, n. 2, p. 142-9, 1997.

PARK, S. W. et al. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. **Hepatology** , v. 53, n. 5, p. 1662-75, 2011.

PERALTA, C.; JIMÉNEZ-CASTRO, M. B.; GRACIA-SANCHO, J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. **J Hepatol**, v. 59, n. 5, p. 1094-106, 2013.

PERRY, B. C. et al. Tumor necrosis factor- α in liver ischemia/reperfusion injury. **J Invest Surg** , v. 24, n. 4, p. 178-88, 2011.

PLUMPE, J. et al. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**.v. 278, n. 1, p. G173-83, 2000.

POWERS, K. A. et al. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. **J Exp Med** , v. 203, p. 1951–1961, 2006.

PRINGLE, J. H. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. **Ann Surg** , v. 48, n. 4, p. 541-9, 1908.

RAMALHO, L. N. et al. Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 74, p. 270-8.

regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, v. 128, p. 33–42, 2005.

RUCKER, R.; CHOWANADISAI, W.; NAKANO, M. Potential Physiological Importance of of Pyrroloquinoline Quinone. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 3, p. 2009.

SAIDI, R. F. et al. Human C1 inhibitor attenuates liver ischemia-reperfusion injury and promotes liver regeneration,” **J Surg Res**, v. 187, n. 2, p. 660–666, 2014. B

SAIDI, R. F. et al., “Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate liver ischemia-reperfusion injury and promote liver regeneration,” **Surgery**, v. 156, no. 5, pp. 1225–1231, 2014. A

SAITO, Y. et al. Changes of liver metabolites following hepatectomy with ischemia reperfusion towards liver regeneration. **Ann Gastroenterol Surg** ,v. 2, n. 3, p. 204-211, 2018.

SAKAMOTO et al. Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Hepatology** , n. 32, p. 256–67, 2000.

SALA-MERCADO, J.A. et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Circulation** , v. 122, n. 11, p. S179-84, 2010.

SANCHO, J. G., RAMÍREZ, A. C.; PERALTA C. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. **ClinSci Lond**) , v. 129, n. 4, p. 345-62, 2015.

SATO, K.; TORIYAMA, M. Effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma. **Journal of Dermatological Science** , v. 53, p. 140–145, 2009.

SEKI, T. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. **J Surg Res** , v. 178, n. 1, p. 63-70, 2012.

SELZNER, M; CAMARGO, C. A.; CLAVIEN, P. A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. **Hepatology** , v. 2, p. 469-75, 1999.

SHIFFMAN, M. L. et al Living donor liver transplantation: summary of a conference at The National Institutes of Health. **Liver Transpl** , v. 8, n. 2, p. 174-88, 2002.

SIMMONS, L. J. Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway. **J Neuroinflammation** , v. 13, n. 1, p. 237, 2016.

SINGH, A. K. et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) producing *Escherichia coli* Nissle 1917 EcN) alleviates age associated oxidative stress and hyperlipidemia, and improves mitochondrial function in ageing rats. **Exp Gerontol** , v. 66, p. 1-9, Jun, 2015.

SINGH, A. K.; PANDEY, S. K.; NARESH, K. G. Pyrroloquinoline quinone-secreting probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates ethanol-induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. **Alcohol Clin Exp Res** , v. 38, n. 7, p. 2127-37, Jul, 2014.
SKULLMAN, Z. et al. Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. **J Hepatol** , v. 21, p. 174–81, 1994.

STEINBERG, F. M.; GERSHWIN, M.E.; RUCKER, R. B. Dietary pyrroloquinoline quinone: growth and immune response in BALB/c mice. **J Nutr** , v. 124, n. 5, p. 744-53, 1994.

STITES, T. E.; MITCHELL, A. E.; RUCKER, R. B. Physiological Importance of Quinoenzymes and the O-Quinone Family of Cofactors. **The Journal Of Nutrition** , v. 130, p. 719–727, 2000.

STITES, T. et al. Pyrroloquinoline quinone modulates mitochondrial quantity and function in mice. **J Nutr** . v. 136, p. 390–396, 2006.

TAKATSU, H. et al. Effect of vitamin E on learning and memory deficit in aged rats. **J Nutr Sci Vit aminol Tokyo** , v. 55, n. 5, p. 389-93, 2009.

TAO, R. et al. Pyrroloquinoline quinone preserves mitochondrial function and prevents oxidative injury in adult rat cardiac myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** , v. 363, p. 257–262, 2007.

translation. **Nat Med** , v. 17, n. 7, p. 796-808, 2011.

TSUCHIDA et al. The protective effect of pyrroloquinoline quinone and its derivatives against carbon tetrachloride-induced liver injury of rats. **J Gastroenterol Hepatol** , v. 8, n. 4, p. 342-7, 1993.

TYGSTRUP, N. et al. Determination of the hepatic arterial blood flow and oxygen supply in man by clamping the hepatic artery during surgery. **J Clin Invest** , v. 41, p. 447-54, 1962.

- USAMI, M. et al. Effect of repeated portal-triad cross-clamping during partial hepatectomy on hepatic regeneration in normal and cirrhotic rats. **J Surg Res**, v. 57, p. 541-548, 1994.
- v. 65, n. 1, p. 67-74, 2003.
- VAN DER BILT, J. D. et al. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. **Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 165-75, 2005.
- VAN GOLEN, R. F. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28, n. 3, p. 394-400, 2013.
- VAN RIEL, W. G., et al. How much ischemia can the liver tolerate during resection? **Hepatobiliary Surg Nutr**, v. 5, n. 1, p. 58-71, 2016.
- WAWRYK-GAWDA, E. et al. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. **Protoplasma**, v. 251, n. 3, p. 525-33, 2014.
- WEBBER, E. M. et al. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. **Hepatology**, v. 28, p. 1226-34, 1998.
- WEI, Y. et al. Carbon monoxide-releasing molecule-2 CORM-2 attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **BMC Gastroenterol**, v. 10, p. 42, 2010.
- WOLFS, T. G. et al. 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**, v. 168, p. 1286-1293, 2002.
- XIE, Y. X. et al. ERK pathway activation contributes to the tumor-promoting effects of hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma. **Immunol Lett**, v. 188, p. 116-123, 2017.
- YAMASHITA, M; TANIYAMA, M.; TAMAI, M. Cellular localization of tumor necrosis factor- α mRNA and interleukin-6 mRNA in the rat liver after hemorrhagic shock. **Surg Today**, v. 32, p. 701-6, 2002.
- YANG, C. et al. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits lipopolysaccharide induced inflammation in part via downregulated NF- κ B and p38/JNK activation in microglial and attenuates microglia activation in lipopolysaccharide treatment mice. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 17-26, 2014.
- YANG, W. et al. Novel Targets for Treating Ischemia-Reperfusion Injury in the Liver. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, p. E1302, 2018.
- YELLON, D. M.; HAUSENLOY D. J. Myocardial Reperfusion Injury. **N Engl J Med**, v. 357, p. 1121-1135, 2007.

YOKOYAMA, Y.; NAGINO, M.; NIMURA, Y. Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, v. 14, n. 2, p. 159-66, 2007.

YUAN L.; KAPLOWITZ, N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 1-2, p. 29-41, 2009.

ZHANG, Y.; FEUSTEL, P. J.; KIMELBERG, H. K. Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat. **Brain Research**, v. 10944, p. 200-206, 2006.

ZHU, B. et al. Comparison of pyrroloquinoline quinone and/or metoprolol on myocardial infarct size and mitochondrial damage in a rat model of ischemia/reperfusion injury. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 11, n. 2, p. 119-128, 2006.

ZHU, B. et al. Pyrroloquinoline Quinone PQQ Decreases Myocardial Infarct Size and Improves Cardiac Function in Rat Models of Ischemia and Ischemia/Reperfusion. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 18, p. 421–431, 2004.

ZIMMERMANN, A. Liver regeneration: the emerge of new pathways. **Med Sci Monit**, n. 8, p. RA 53-63, 2002.

ANEXO- Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeito da pirroloquinolina quinona na regeneração hepática após isquemia e reperfusão normotérmica em camundongos*", registrado com o número **103/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de junho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 90 camundongos Balb/C machos pesando 20g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/06/2016 a 15/12/2018.

We certify that the Protocol *n° 103/2016*, entitled "*Effect of pyrroloquinoline quinone on liver regeneration after normothermic ischemia and reperfusion in mice*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 06/27/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 90 male Balb/C mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. This certificate is valid until 12/15/2018.

Ribeirão Preto, 27 de junho de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente da CEUA – FMRP – USP