

**JULIANA DE JESUS DO NASCIMENTO**

**Avaliação da lesão celular, tecidual e da resposta inflamatória  
no pré e pós-cirúrgico de I/R hepática, submetido ao modelo de  
tolerância em camundongo**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos  
Inflamatórios e Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia  
Soriano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A  
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**JULIANA DE JESUS DO NASCIMENTO**

**Avaliação da lesão celular, tecidual e da resposta inflamatória  
no pré e pós-cirúrgico de I/R hepática, submetido ao modelo de  
tolerância em camundongo**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos  
Inflamatórios e Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia  
Soriano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A  
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Juliana de Jesus

Avaliação da lesão celular, tecidual e da resposta inflamatória no pré e pós-cirúrgico de I/R hepática, submetido ao modelo de tolerância em camundongo / Juliana de Jesus Nascimento. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de  
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.  
Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Fígado 2.Isquemia 3.Reperusão  
4.Tolerância 5.Camundongo 6.Citocinas 7.Inflamação  
8.Aspartato aminotransferase 9.Alanina  
aminotransferase 10.Malondialdeído

USP/FM/DBD-230/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Para minha mãe, **Helena** pelo grande exemplo de mulher, inspiração e coragem perante os desafios da vida*

*Para minha irmã, **Janaina**, pela parceria em todos os momentos. Em especial por sempre acreditar em mim e me apoiar.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu querido orientador, Prof. **Dr. Francisco Garcia Soriano**, por esta oportunidade, e por todos os ensinamentos, incentivos, cobranças e apoio.

Agradeço a **CAPES** pelo financiamento deste projeto de pesquisa, o qual me dediquei com afinco nos últimos três anos.

Ao Prof. **Dr. Marcel Cerqueira César Machado**, pela gentileza e acessibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas em relação as técnicas cirúrgicas do nosso modelo experimental, e em especial por sua contribuição em todas as discussões em nossas reuniões.

Agradeço imensamente à querida **MS.c Suely Kunimi Kubo Ariga**, pela dedicação, atenção no cuidado com os animais, coleta e armazenamento das amostras, supervisão de excelência em todas as etapas do procedimento cirúrgico, assim como no desenvolvimento do modelo de tolerância. E na sua valiosa colaboração nas análises estatísticas e nas discussões e explicações em nossas reuniões.

À **Drª. Thaís Lima** pela valiosa contribuição nos esclarecimentos dos procedimentos laboratoriais e grande generosidade na disponibilização dos programas para a análise estatística e dicas de escrita científica, assim como na sua participação importante e construtiva nas suas valiosas discussões em nossas reuniões. Sua expertise, competência, e dedicação diária, como cientista, me inspiram.

Meu agradecimento ao Prof. **Dr. Heraldo Possolo** pela gentileza, incentivo, acolhimento e conversas edificantes nas tardes de estudos, a Prof. **Drª Élia Galdini** por todo conhecimento e prática adquirida ao longo do estágio PAE.

Ao **Dr. Amaro N. Duarte-neto**, pelas tardes de aprendizados e habilidades desenvolvidas nas aulas de leitura de lâminas histológica, e por sua colaboração no desenvolvimento do nosso escore.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos **Dr<sup>a</sup>. Denise Frediani Barbeiro** e ao **Dr. Hermes Vieira Barbeiro**, pela disponibilidade e eficiência em esclarecer as dúvidas dos procedimentos laboratoriais, assim como nas explicações sobre análise estatística e valiosas observações para otimização do trabalho.

As secretárias **Angélica, Rose e Gisela**, pela eficiência nos esclarecimentos de dúvidas e orientações em relação as burocracias e entregas de documentações referentes a Pós-graduação e ao estágio PAE.

Aos amigos **Geraldo G.Sobrinho e Kelli Gouvea**, meu muito obrigada pela amizade, gentileza e eficiência de vocês ao longo desses três anos de estudo, fundamental para a realização desse projeto.

As minhas parceiras de longas horas de cirurgia **Dr<sup>a</sup> Mariana Senna e Dr<sup>a</sup> Beatriz Cermaria** o qual aprendi muito sobre comprometimento, dedicação, disciplina e resiliência.

Aos alunos e **colegas de pesquisa do LIM-51** pelas tardes de discussões e estudos enriquecedores: **MS.c Rosângela Pimentel, MS.c Marisa, Andressa Sargiani, Dr<sup>a</sup> Tatiana, Dr Ricardo Petroni, Neusa Pimentel, Karina, Dr Wemerson.**

Em especial a grande amiga **MS.c Juliana C. Silva** pela parceria na resolução dos problemas burocráticos, nos estudos estatísticos e aprendizagem no uso do software PRISMA. Obrigada Ju, pela paciência e objetividade em esclarecer minhas dúvidas e em compartilhar seu conhecimento comigo. Encontrei em ti uma grande amiga de pesquisa o qual admiro pela competência e objetividade.

Ao meu parceiro de análise de dados e bioestatística **MS.c Alexandre M. Santos** pelas tardes edificantes de aprendizados e discussões de dados no Incor. Obrigada Lê, graças as nossas tardes enriquecedoras de estudos, pude desenvolver maiores habilidades nas análises estatísticas.

Aos alunos e **colegas de estágio e preparação pedagógica** o qual aprendi muito através de nossas manhãs e tardes de discussões, aprendizados

e atividades com os alunos: **MS.c Felipe Pereira, MS.c Merlin de Souza, Victor Angelo Folgosi, Renata Libanori, Eric Mariano.**

Aos **colegas e pesquisadores do LIM-17 e da Neurologia** pela minha iniciação no meio científico, e por todos os aprendizados alcançados e incentivos, inicialmente como voluntária, depois como aluna de TT3 – FAPESP até chegar ao Mestrado no LIM-51: **Dr<sup>a</sup>. Eloisa Bonfá, Dr Samuel K. Shinjo, Dr<sup>a</sup> Marilda Guimarães, Dr<sup>a</sup> Sueli Oba Shinjo, Dr<sup>a</sup> Roseli Soares da Silva, Dr<sup>a</sup> Thais Galatro, Gisele N. Reis, Maria Aurora G. Silva, Maria de Fátima Almeida, Elenice Mantovani, Virgínia Bonoldi, Ana Paula Gandara, Dr<sup>a</sup> Walcy Teodoro, MS.c Solange Carrasco, Dr<sup>a</sup> Valéria F. Capargo, Cleonice Bueno, Margarete Vendramini, Elaine P. Leon e Elislaine Reis.**

Meus sinceros agradecimentos a **Dr<sup>a</sup> Danieli Andrade**, que no meu primeiro dia de laboratório, me deu o sábio conselho de que “Fazer pesquisa é 99% transpiração e apenas 1% inspiração”. Tomei esse conselho para a vida e cá estou na conclusão do Mestrado.

Aos amigos e incentivadores **Pérola C. Lucas da Cardiologia** e ao **Genivaldo Silva do LIM-37 Gastroenterologia transplante e cirurgia de fígado.**

Aos colegas e **funcionários do Biotério da FMUSP**, **Moacir M. Silva, Valter M. Silva, Valdeci F. Silva** e especialmente ao **Antônio dos Santos Filho**, pelas orientações e auxílio no cuidado com os animais.

Agradeço à minha **família**, por todo apoio necessário, e compreensão por me ausentar tantas vezes, devido as longas tardes, noites e madrugadas de estudo. Foi por um bom motivo, dedico este projeto a vocês. À minha mãe **Helena das Graças de Jesus** por me ensinar valores, princípios, bondade, generosidade e a valorizar o estudo, porque somente através dele poderemos evoluir como pessoas e profissionais. À minha irmã **Janaina de Jesus do Nascimento** por ser minha parceira de estudos e na vida, por me ajudar a encarar os desafios do cotidiano, e pelo seu apoio ao longo do desenvolvimento dos nossos projetos de vida, muito obrigada minha irmã.

Agradeço imensamente a **Deus** por ter me dado saúde e me guardado em meio a essa pandemia, para continuar a cada dia superando um desafio de cada vez e aprendendo com cada um deles. Na busca de ser um ser humano melhor a cada dia, neste processo de evolução que é a vida.

Já há muito tempo, atentei para o fato de que pessoas que tem grandes realizações raramente relaxam e deixam as coisas acontecerem para elas. Elas correm atrás e fazem acontecer"

Leonardo da Vinci

## RESUMO

Nascimento JJ. Avaliação da lesão celular, tecidual e da resposta inflamatória no pré e pós-cirúrgico de I/R hepática, submetido ao modelo de tolerância em camundongo. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** A isquemia se dá quando ocorre a obstrução do fluxo sanguíneo, seja por embolia, aterosclerose ou em procedimentos cirúrgicos. Essa interrupção interferirá no fornecimento de oxigênio e na produção de ATP, o déficit energético acarreta o desequilíbrio do transporte de cálcio, sódio e potássio. Havendo comprometimento da permeabilidade das membranas celulares causando edema celular e mitocondrial. Ao reperfundir pode-se induzir a ativação exacerbada de células da resposta imunológica com liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias, capaz de levar ao estado de estresse oxidativo local e sistêmico. **Objetivo:** O presente estudo analisou se a tolerância pode modular a resposta imunológica via Toll-like-receptor 4 com redução do processo inflamatório. **Métodos:** Camundongos Balb-C machos divididos em 5 grupos (n=10) por grupo. Grupo controle não foi submetido a nenhum procedimento (CT), grupo tolerante basal (TB) e tolerante com isquemia-reperfusão (TIR) foram submetidos a aplicação de baixas doses de LPS via subcutânea de 1mg/kg por 5 dias. Grupo isquemia-reperfusão e grupo tolerante, foram submetidos à isquemia normotérmica à 36°C, realizada por clampeamento parcial do volume de 70%, abrangendo: artéria hepática, veia porta e ducto biliar, 90 minutos de isquemia, perfusão com dois subgrupos de 4 ou de 24 horas. Grupo sham (SH) para avaliação do impacto cirúrgico. Foram coletados plasma, para determinação dos marcadores de lesão hepática AST/ALT e citocinas inflamatórias. Foi feita análise histológica do fígado isquêmico e não isquêmico. Averiguação da lesão local no fígado isquêmico e da lesão a distância no pulmão. **Resultados:** A indução de tolerância foi protetora das alterações teciduais e inflamatórias no fígado submetido a isquemia, houve menor ALT, escore tecidual e MDA. A isquemia produziu inflamação sistêmica, demonstrada pela elevação de IL-6 e IL-17 A. A lesão no pulmão, foi reduzida no grupo de animais tolerantes, houve menor quantidade de MDA e MPO.

**Descritores:** Fígado; Isquemia; Reperfusão; Tolerância; Camundongo; Citocinas; Inflamação; Aspartato Aminotransferase; Alanina aminotransferase; Malondialdeído

## ABSTRACT

Nascimento JJ. Evaluation of cell and tissue injury and inflammatory response in the pre and postoperative period of hepatic I/R, submitted to the mouse tolerance model [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**Introduction:** Ischemia occurs when there's a blood flow obstruction, through embolism, atherosclerosis or in surgical procedures. That obstruction interferes in the supply of oxygen and in the production of ATP. The energy deficit causes the calcium, sodium and potassium transport imbalance damaging the permeability of cell membranes causing mitochondrial and cell edema. When reperfusing it can be induced exacerbated activation of immune response cells by releasing of inflammatory cytokines capable of leading and systemic local oxidative stress state. **Objective:** The current study has analyzed if the tolerance can reduce the tissue injuries caused by hepatic I/R and if there is modulation of immune response. **Methods:** Males Balb-C mice were divided into 5 groups (n=10) per group. Control group was not submitted to any procedure (CT), basal tolerant group (TB) and tolerant with ischemia-reperfusion (TIR) were submitted to the application of low doses of LPS 1mg/kg subcutaneous use per 5 days. Ischemia-reperfusion group and tolerant group, were submitted to normothermic ischemia by 36 C performed by a 70% partial volume clamping, covering: hepatic artery, portal venous and biliary duct. 90 minutes of ischemia-reperfusion with two subgroups 4 or 24 hours. Sham (SH) group to surgical impact evaluation. Plasma was collected to determine AST/ALT liver injury markers and inflammatory cytokines. It was made a histological analysis of ischemic and non-ischemic liver and an investigation of the local lesion in the ischemic liver and distant injury in the lung. **Results:** Tolerance induction was protective of tissue and inflammatory changes in the liver submitted to ischemia, there was lower ALT, tissue score and MDA. Ischemia produced systemic inflammation, demonstrated by the elevation of IL-6 and IL-17 A. Lung injury was reduced in the group of tolerant animals. There was a lower amount of MDA and MPO in the group of tolerant animals.

**Descriptors:** Liver; Ischemic; Reperfusion; Tolerance; Mice, Cytokines, Inflammation; Aspartate aminotransferases; Alanine transaminase; Malondialdehyde

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Lesão celular e tecidual em resposta ao estresse a I/R .....	24
<b>Figura 2 -</b> Via de sinalização TLR4 por LPS: Ativação do fator de transcrição NF- kB .....	27
<b>Figura 3 -</b> Modelo de tolerância e linha do tempo de execução da I/R.....	33
<b>Figura 4 -</b> Isquemia parcial 70 % do volume da massa hepática de camundongo.....	34
<b>Figura 5 -</b> Linha do tempo: observação clínica pós-cirúrgico I/R.....	48
<b>Figura 6 -</b> Atividade enzimática AST e ALT em Balb-c após procedimento de I/R hepática em dois tempos de reperfusão 4h – 24h .....	50
<b>Figura 7 -</b> Análise do índice total das lesões hepáticas encontradas no pós-cirúrgico de I/R hepática submetido a tolerância em Balb-c.....	53
<b>Figura 8 -</b> Achados histológicos no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4 horas	55
<b>Figura 9 -</b> Tecido hepático integro .....	56
<b>Figura 10 -</b> Lesões características da lesão de isquemia-reperfusão.....	57
<b>Figura 11 -</b> Infiltrado neutrofílico .....	58
<b>Figura 12 -</b> Lesão local por estresse oxidativo no fígado isquêmico peroxidação lipídica (MDA-TBARs) .....	62
<b>Figura 13 -</b> Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h TNF alpha e IL-1 .....	64
<b>Figura 14 -</b> Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h IL-6 e IL-17 alpha .....	66
<b>Figura 15 -</b> Citocinas no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h e 24h IFN gama, IL-2 e IL-10 .....	68
<b>Figura 16 -</b> Citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma em dois tempos de reperfusão 4h e 24h TNF alpha e IL-1 .....	71
<b>Figura 17 -</b> Citocinas pró-inflamatórias plasmáticas em dois tempos de reperfusão 4h e 24h IL-6 e IL-17 alpha .....	74
<b>Figura 18 -</b> Citocinas circulantes no plasma em dois tempos de reperfusão INF g, IL-2 e IL-10.....	78
<b>Figura 19 -</b> Lesão a distância por estresse oxidativo no pulmão – Peroxidação lipídica (MDA-TBARs) .....	81
<b>Figura 20 -</b> Lesão a distância por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática.....	82
<b>Figura 21 -</b> Resposta imunológica de defesa contra antígeno e microrganismos .....	88
<b>Figura 22 -</b> Reconhecimento de antígeno pelo macrófago com liberação de citocinas e apresentação do antígeno pelas células dendríticas ao LT.....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Divisão dos grupos.....	32
<b>Tabela 2</b> - Amostras coletadas .....	37
<b>Tabela 3</b> Escore.....	45
<b>Tabela 4</b> - Grau de acometimento da lesão pontual da I/R hepática no fígado isquêmico : análise por parâmetro .....	60

## LISTA DE SÍMBOLOS

ADP- Difosfato de adenosina

ALF- do inglês “Acute liver failure” tradução insuficiência hepática aguda

ALT- Alanina amino transferase

APC – do inglês Antigen Presenting Cells

AST- Aspartato amino transferase

ATP- Trifosfato de adenosina

CD4+ – Linfócito CD4 ativado

CD8+ – Linfócito CD8 ativado

EPM- Erro padrão da média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

F.ISQ – fígado isquêmico

F.N.ISQ – fígado não isquêmico

H&E- Eosina e hematoxilina

HO- Radical hidroxila

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

IFNg – Interferon gamma

IgG- Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – interleucina

I/R – Isquemia e reperfusão

IRAK - receptor associado a kinase IL-1

IRI – do inglês “ Ischemia injury and reperfusion” tradução injúria de isquemia e reperfusão

K- Potássio

KCl – cloreto de potássio

Kg – quilograma

LBP- do inglês “ LPS binding protein” tradução proteína ligadora de lipopolissacarídeo.

LPS – lipopolissacarídeo

LT- Leucotrieno

LTc – Linfócito T citotóxico

LTh – Linfócito T helper

LTm - Linfócito T de memória

LTs – Linfócito T supressor

MAC – Complexo de ataque a membrana

MAPK – do inglês “ Mitogen activated protein kinase” tradução proteína quinase ativada por mitógeno

MDA- Malondialdeído

MD2- do inglês “Lymphocyte antigen 96” tradução antígeno de linfócito 96 lymphocyte antigen 96 [ myeloid differentiation 2 (MD-2)

mg–miligrama

MHC – Molécula de histocompatibilidade

ml-mililitro

MO – Medula óssea

MPO- Mieloperoxidase

MYD88- proteína de diferenciação mieloide 88

Na- Sódio

NaCl- cloreto de sódio

NF-KB – Fator de transcrição nuclear B

NK-do inglês células Natural Killer

nMol- nano mol

NO- Óxido nítrico

ONOO – Peroxinitrito

$O_2^-$  - Ânion superóxido

PAF- Fator ativador de plaquetas

PAMPs- do inglês “Pathogen associated molecular patterns”  
tradução padrão associado a patógeno

pg - picograma

$PGE_2$  -Prostaglandina  $E_2$

pM- pico molar

RE – Reticulo endoplasmático

ROS – do inglês Reactive Oxygen Species

s.c – subcutânea

SDS- Duodecil sulfato de sódio

SOD- superóxido dismutase

TBARs – espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TGO/ TGP - transaminases

TLR- do inglês “Tol like receptor” tradução receptor do tipo Tol like

TNF  $\alpha$ - Fator de necrose tecidual alfa

Treg – Linfócito T regulador

U – Unidade

UMP – Fosfato de Uridina

v.i. – via intraperitoneal

$\mu$ g – microgramas

$\mu$ l – microlitro

# SUMÁRIO

1 Introdução.....	20
1.1 Isquemia e reperfusão.....	20
1.2 Lesões por Isquemia-reperfusão - Espécies reativas de Oxigênio e Peroxidação Lipídica .....	23
1.3 Estratégias para redução das lesões por I/R.....	24
1.4 Tolerância /via TLR4 .....	26
2 Objetivos.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos .....	29
3 Materiais e Métodos .....	30
3.1 Local de realização dos experimentos .....	30
3.2 Comitê de Ética .....	30
3.3 Cuidados com os animais .....	30
3.4 Grupos experimentais .....	31
3.5 Modelo de Tolerância por LPS .....	32
3.6 Procedimento cirúrgico: Isquemia e reperfusão hepática em BalbC .....	33
3.7 Observações Clínicas .....	36
3.8 Coleta do material biológico .....	37
3.9 Coleta do sangue .....	38
3.10 Análise da atividade enzimática AST/ALT .....	38
3.11 Coleta do Fígado Isquêmico e Fígado não isquêmico .....	38
3.12 Extração de Proteínas Total (BRADFORD).....	39
3.13 Avaliação das Citocinas Inflamatórias no fígado isquêmico e no Plasma (Milliplex) .....	39
3.14 Peroxidação Lipídica Fígado Isquêmico (TBARs/MDA) .....	40
3.15 Coleta do Pulmão.....	41
3.16 Peroxidação Lipídica Pulmão MDA (EROs) .....	42
3.17 Avaliação de processo inflamatório no Pulmão (MPO - índice de infiltração por neutrófilos) .....	43
3.18 Avaliação das lâminas histológicas .....	44
3.19 Análise Estatística das lâminas histológicas .....	46

4 Resultados.....	47
4.1 Observações clínicas: pós-cirúrgico.....	47
4.2 Enzimas hepáticas: ALT/AST 4-24h.....	49
4.3 Avaliação total das lesões hepáticas – Fígado isquêmico e fígado não isquêmico em 4h e 24h .....	51
4.4 Achados histológicos encontrados no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4-24 horas .....	54
4.5 Análise histológica por parâmetro 4h e 24 .....	59
4.6 - Lesão local por estresse oxidativo no fígado isquêmico peroxidação lipídica (MDA-TBARs) .....	61
4.7- Resultados Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17 A, com 2 tempos de reperfusão 4 e 24h .....	63
4.8- Resultados Citocinas modulatórias e anti-inflamatórias no fígado isquêmico com 2 tempos de reperfusão 4 e 24h IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10 .....	67
4.9 -Resultados Citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17A, com 2 tempos de reperfusão 4-24h .....	70
4.10- Resultados Citocinas modulatórias e anti-inflamatórias circulantes no plasma com 2 tempos de reperfusão 4-24h, IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10 .....	76
4.11- Lesão a distância – Inflamação no pulmão .....	80
4.12- Lesão a distância inflamação por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática.....	82
5 Discussão .....	83
5.1 Resposta Imunológica .....	86
5.2 Resposta Imunológica - Sistema complemento .....	89
5.3 Observações clínicas: pós-cirúrgico.....	91
5.4 Enzimas hepáticas: ALT/ AST 4-24 horas.....	93
5.5 Análise do índice total das lesões hepáticas encontradas no pós-cirúrgico de I/R hepática submetido a tolerância em Balb-c .....	96
5.6 Achados histológicos no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4 horas .....	97
5.7 Grau de acometimento da lesão pontual da I/R hepática no fígado isquêmico análise por parâmetro .....	98
5.8 Inflamação local por estresse oxidativo no fígado isquêmico – Peroxidação lipídica (MDA-TBARs) .....	100
5.9 Citocinas.....	102

5.10 Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h (TNF alpha, IL-1, IL6 e IL-17 A).....	108
5.11 Citocinas moduladoras e anti-inflamatórias encontradas no fígado isquêmico .....	110
5.12 Citocinas inflamatórias encontradas no plasma TNF A, IL-1, IL-6 e IL-17 A .....	112
5.13 Citocinas moduladoras e anti-inflamatórias encontradas no plasma.....	116
5.14 Lesão a distância por estresse oxidativo no pulmão – Peroxidação lipídica .....	117
5.15 Lesão a distância inflamação por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática.....	119
6 Conclusão.....	122
Referências.....	123

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Isquemia e reperfusão

Isquemia do grego isch - restrição e hema - sangue, ou seja, falta de perfusão sanguínea, o retorno do fluxo sanguíneo é a fase chamada de reperfusão, usaremos a abreviação I/R para denominar isquemia e reperfusão.

(1) O fator tempo é crucial para o grau de lesões causadas pela isquemia e reperfusão, pois o tempo de isquemia definirá se essa lesão será reversível ou irreversível. (2)

As causas da isquemia podem ser por formação de placas gordurosas, embolia, ou até mesmo originada intencionalmente, em procedimentos cirúrgicos de transplante e ressecções hepáticas, para retirada de tumores por exemplo.

A isquemia hepática, tem sido reproduzida em modelos experimentais em animais, onde clampeia-se: artéria hepática- veia porta hepática- ducto biliar (triáde portal) restringindo o fluxo de 70% do volume total da massa hepática, mantendo 30% do volume em perfusão. Este modelo de isquemia está bem consolidado, com esta técnica evita-se a estase venosa e isquemia intestinal. (3).

Entretanto a interrupção do fluxo sanguíneo, por patologia ou por intervenção cirúrgica, interferirá diretamente no fornecimento de oxigênio ( $O_2$ ) às células. Devido a quantidade insuficiente de  $O_2$  que chega até a fase IV da cadeia oxidativa mitocondrial relacionado com o processo de respiração celular (redução e oxidação) na matriz mitocondrial ocorre a diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP). A molécula de ATP atua como um carreador de energia nas células. Sua formação é a partir de ADP e de fosfato inorgânico, estando ela envolvida em muitas reações celulares. (4)

Na falta da molécula de ATP, a célula passa a gerar energia por via anaeróbica com consequente produção de ácido láctico que interfere na homeostase da célula. Quando ocorre a privação de oxigênio, inicia-se uma

sequência de eventos químicos, levando a disfunção mitocondrial, edema e morte celular, seja por apoptose, necrose ou ambas.(5)

A redução de ATP intracelular também interfere nas trocas das bombas de sódio (Na) e potássio (K) na membrana das células. Este desequilíbrio de íons leva a alteração osmótica com a ocorrência de intumescimento nos lisossomos, vacuolização do retículo endoplasmático, disfunção com aumento da permeabilidade mitocondrial e consequente extravasamento de enzimas e proteínas para o meio extracelular. (6) (7)

A reperfusão restaura a oferta de oxigênio e nutrientes, contudo, formam-se radicais livres de oxigênio e nitrogênio, produzindo danos às células próximas e a microcirculação. Esta cascata de eventos inicialmente local, ao reperfundir se torna sistêmica, afetando outros órgãos, outros sistemas o que em um quadro mais grave, pode evoluir para lesão de múltiplos órgãos.(8)

Sabe-se também, que o endotélio possui uma ação antitrombogênica, impedindo a coagulação do sangue, quando as células endoteliais são danificadas, por lesões, como por exemplo, as lesões provocadas pelas espécies reativas de oxigênio, provenientes do processo da resposta inflamatória, o tecido conjuntivo subendotelial é exposto, induzindo a agregação de plaquetas sanguíneas. (9)

Esta agregação inicia uma cascata de eventos, que dá origem a formação de fibrina a partir do fibrinogênio presente no sangue, desta forma, um coágulo intravascular, ou trombo é formado, podendo obstruir completamente o fluxo vascular local. Parte desta massa sólida pode se separar e ser levada através do fluxo sanguíneo, com possibilidade de obstrução de vasos e capilares, com evolução do quadro para processo de embolia. O mecanismo antitrombogênico é um importante exemplo de complicação pós cirúrgica, por isso a importância de evitar o contato entre plaquetas e o tecido conjuntivo subendotelial. (9)

Lesões locais e sistêmicas por isquemia-reperfusão também estão associadas ao acúmulo de neutrófilos nos tecidos. Segundo Welbourn *et al.*, 2005 os mediadores dessa resposta são: o fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno (LT)B4 e radicais livres de oxigênio com um potencial enorme em

lesar tecidos, neutrófilos ativados fixam-se e migram através do endotélio, causando destruição de tecidos pela liberação de radicais livres e enzimas, o que pode resultar em necrose celular por peroxidação lipídica. (10)

Quando há perda da homeostasia na resposta imunológica há lesões, os mediadores inflamatórios como quimiocinas, citocinas, substâncias quimiotáticas do sistema complemento, assim como vasos dilatadores histamina, heparina, ericosanóides estão envolvidos neste processo de lesão endotelial, o óxido nítrico (NO) uma espécie reativa de nitrogênio também está envolvida neste mecanismo de dano tecidual, ele é encontrado em abundância no organismo atuando como uma molécula de sinalização. (11)

Em um estudo, considerando uma análise tecidual, sugeriu que, o óxido nítrico também pode ter origem independente do endotélio, com função de vasorelaxamento. No estudo do Lima *et al.*, 2005, foi apontado que a formação de NO, pode ser a partir de lipídios nitrozilados, apoiando seu papel como fonte endógena de óxido nítrico, que pode desempenhar a função de vasorelaxamento, independente do endotélio. Tendo papel importante como vasodilatador no combate ao processo inflamatório. (12)

Entretanto na isquemia-reperfusão, o NO pode ser prejudicial, por reagir com o oxigênio tendo como produto o peroxinitrito (ONOO-) sendo esta molécula, altamente reativa, com a possibilidade de interação com proteínas, lipídios e com o ácido desoxiribonucléico (DNA).(13) Podendo ser lesiva aos tecidos, as células e ao DNA.

Em contrapartida é sabido também, que, em resposta a situações patológicas, existem os mecanismos de controle do estresse oxidativo, via enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase.

Considerando as lesões da reperfusão e sua fisiologia no sangue, alguns estudos com ratos, sugerem que no combate ao NO, ele é prioritariamente conservado pela reação com a hoxiemoglobina, sendo uma parte destinada para a formação de apenas 10% de HbNO, enquanto a outra parte é oxidada em nitrito. No estudo do Dikalov e Fink, 2005 este processo pode ser detectado pela técnica de EPR, essa reação se dá, por processo de difusão através dos tecidos

para os glóbulos vermelhos, onde o NO é convertido em nitrato, ao reagir com a hoxiemoglobina, controlando assim, a biodisponibilidade de óxido nítrico no plasma. (14) (15)

## 1.2 Lesões por Isquemia-reperfusão - Espécies reativas de Oxigênio e Peroxidação Lipídica

Ocorre a depleção na produção de ATP desencadeando um efeito em cascata, lesão mitocondrial, devido ao aumento da permeabilidade da parede celular e da parede mitocondrial, levando a quebra da homeostasia do meio intra e extracelular. Lesão da membrana celular por peroxidação lipídica, devido a ação de radicais livres como, as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou do inglês Reactive Oxygen Species (ROS): ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO). (16)

Radicais livres de oxigênio são moléculas que possuem um elétron na última camada desemparelhado, sendo uma molécula altamente reativa com produtos biológicos, o fato de estar desemparelhado, ou seja, solto na molécula, faz com que ele reaja com qualquer molécula, levando a roubo de elétron, oxidação dessas estruturas, modificações químicas, degradação dessas moléculas com consequente perda da função celular.

No caso da produção de ROS nas Mitocôndrias ocorre na cadeia respiratória. Quando há desequilíbrio neste transporte, o elétron não chega ao complexo IV que possui estruturas específicas para promoção das reações químicas. O oxigênio fica entre os complexos I, III removendo elétrons e se tornando um radical superóxido, produzindo assim, as EROs na mitocôndria. A taxa de produção de ATP propicia o aumento da taxa de oxigênio e da produção das EROs.

Nas moléculas de cadeia longa essa produção de radicais livres se dá pelos peroxissomos que participam na degradação de ácidos graxos, através das enzimas oxidases tendo como resultado o Peróxido de hidrogênio. A catalase promove a quebra do peróxido de hidrogênio. (17)

Independente das fontes de produção de radicais livres, a perda da homeostasia dos processos biológicos, por aumento ou diminuição das reações químicas e moleculares, funciona como gatilho para lesões celulares na matriz mitocondrial, no núcleo das células, e nas membranas, ou seja, morte celular por extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular.

Na figura 1, está apresentada todas as lesões originadas na reperfusão pelas EROs, a nível celular, nas organelas e no tecido.

**Figura 1-** Lesão celular e tecidual em resposta ao estresse a I/R



Lesões por Isquemia-reperfusão

Fonte: Robbins, Pathologic basis of disease (18)

### 1.3 Estratégias para redução das lesões por I/R

Durante ressecções hepáticas para retirada de tumor, por exemplo, são utilizadas diversas técnicas de proteção hepática, essas técnicas visam à proteção das lesões por isquemia-reperfusão como; uso de drogas, hipotermia, pré-condicionamento com clampeamento intermitente do pedículo hepático, com tempos diferentes.(19)

O estudo de *Liu et al., 2022*, utilizou a técnica de hipotermia leve, neste estudo com camundongo foi possível proteger o fígado contra a ação das EROs, pela regulação aumentada da proteína de choque RBM3, induzida por hipotermia, a proteína RBM3 bloqueou as vias de sinalização p38 e JNK, reduzindo assim as lesões por isquemia-reperfusão. (20)

Como estratégia para a diminuição das lesões por isquemia-reperfusão com o uso de drogas, Canedo *et al.*, 2007, fez a utilização do cloridrato de tirofiban para a proteção hepática e pulmonar secundária a I/R, neste estudo ocorreu a melhora dos parâmetros histológicos, bioquímicos e da respiração mitocondrial. (21)

Em outro exemplo com o uso de drogas para a mitigação de lesões consequentes da isquemia-reperfusão Nogueira *et al.*, 2014, utilizaram o diazóxido (uma droga que abre o canal seletivo do mito KATP, promove efeito protetor contra isquemia e mantém a função mitocondrial), neste estudo foi apontado que, o diazóxido conseguiu manter a função mitocondrial do fígado, reduzir a resposta inflamatória e aumentar a tolerância hepática à lesão de isquemia-reperfusão.(22)

O termo pré-condicionamento isquêmico foi introduzido por Murry *et al.*, 1986, isto é, significa a indução de isquemia por um pequeno período, seguido por reperfusão. (23)

Segundo estudo de Castro e Silva Jr *et al.*, 2002, acredita-se que o pré-condicionamento isquêmico promove a proteção das mitocôndrias, evita o intumescimento osmótico mitocondrial e inibe a produção de espécies reativas de oxigênio o que diminui a lipoperoxidação.(24)

O modelo de tolerância seria outra proposta como estratégia de proteção para procedimentos cirúrgicos de isquemia-reperfusão hepática. O foco da investigação do nosso modelo seria a possibilidade de modulação da resposta imunológica com redução do processo inflamatório.

#### 1.4 Tolerância /via TLR4

O sistema imunológico inato possui mecanismos de defesa contra patógenos, para que isto ocorra utiliza-se de receptores de reconhecimento de padrões, receptores do tipo Toll like receptors (TLR). (25),(26)(27) (28)

Esses receptores de reconhecimento de padrões estimulam a expressão de genes, que produzem a resposta inflamatória, induzindo a produção de quimiocinas e citocinas, seguido de recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. (29)

O TLR4 tem sido muito estudado por se ligar ao lipopolissacarídeo (LPS) da parede de bactérias Gram negativas. O LPS é um lipopolissacarídeo parte integrante da membrana externa de bactérias Gram negativa. (30)

O complexo CD14+LBP+LPS formado na superfície celular, conecta-se a proteína MD-2, que estabiliza a ligação do LPS na via TLR4. Assim ocorre a sinalização intracelular.

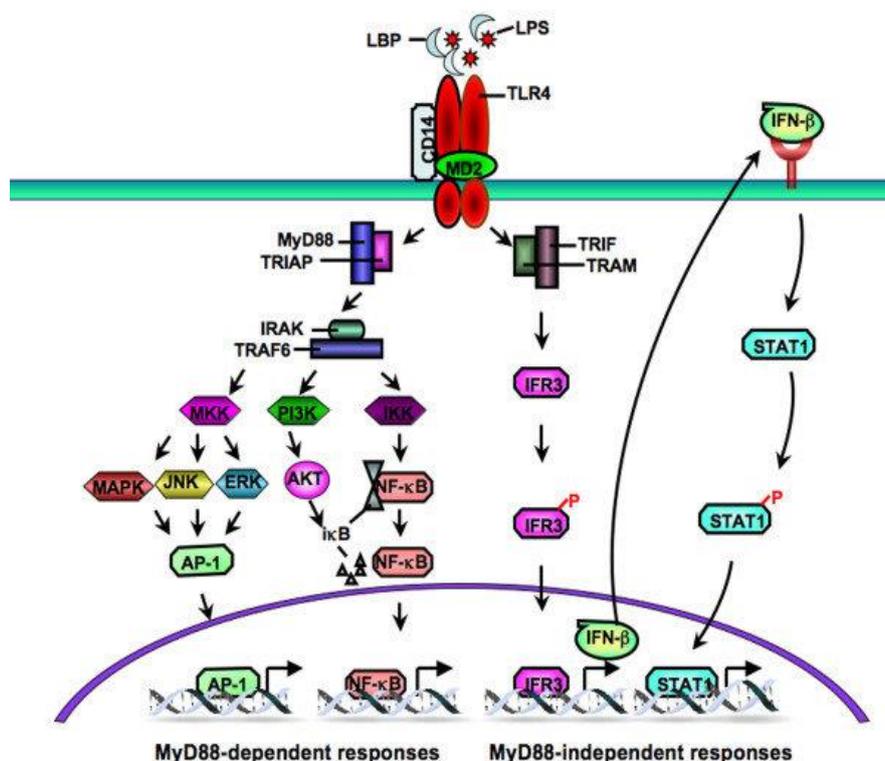
No meio intracelular a proteína adaptadora Myeloid Differentiation Protein (MyD88) reconhece esta sinalização e ativa a quinase do receptor de IL-1 (IRAK). (31) (32) (33)

Quando se dá a fosforilação da IRAK, ocorre o recrutamento do fator associado ao receptor de TNF6 (TRAF6), este que se ao oligomerizar, ativa a proteína quinase (MAP3K).

A quinase MAP3K ativa as quinases IKB1(IKK1) e IKB2(IKK2), IKB1 e IKB2 fosforilam resíduos de serina da Ikb, degradando-a, dessa forma ocorre a liberação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B. (34) (35)

Uma vez ativado, o fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B migra para o núcleo da célula, na região do DNA promotora, desencadeando a produção de proteínas envolvidas no processo inflamatório. Como por exemplo: TNF, citocinas (IL-1, IL-8 e IL-10), proteínas de adesão celular (ICAM, VCAM, INOS) dentre outras substâncias. (36) A ativação da via TLR4 e ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B está apresentada na figura 2.

**Figura 2** - Via de sinalização TLR4 por LPS: Ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B



Via de sinalização TLR4: Ativação da via toll like receptor 4 por LPS, ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B desencadeando produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório.

Fonte: Imagem Guo & Friedman, 2010 (37)

A tolerância é a adaptação da resposta imune inata pela aplicação prévia de baixas doses de LPS aos animais. Segundo Pena *et al.*, 2011, a tolerância é definida como uma capacidade de responder com menor grau de inflamação a insultos, após, um estímulo prévio deste insulto. (38) Os animais que recebem baixas doses de LPS se tornam resistentes a doses letais de LPS.

Estudos com o modelo de tolerância estão bem consolidados, no estudo experimental de Rao *et al.*, 2013, foi feito o pré-condicionamento em doses baixas do lipopolissacarídeo em ratos, após injúria de isquemia e reperfusão (IRI), este estudo investigou a via ATF4-CHOP para redução de apoptose. (39) (40)(41) (42) (43) A via ATF4-CHOP inibiu a apoptose hepatocelular, após a reperfusão, suprimindo a ativação da caspase-12 e caspase-3. Assim como foi

observada redução na expressão de citocinas inflamatórias, reprimindo as vias de sinalização pró inflamatórias (NF- $\kappa$ B e MAPK). Foi apontado que no pré-condicionamento de baixas doses de LPS, a via ATF4-CHOP inibe a expressão de TNF $\alpha$  e IL6, e induz a expressão de IL-10, durante a isquemia e reperfusão do fígado. (44) (45,46)(47)(48) (49)

Zhang *et al.*, 2014, avaliaram se o pré-tratamento com LPS melhora a insuficiência hepática aguda (ALF), induzida por baixas doses de D-GalN/LPS. O D-GalN consome monofosfato de Uridina (UMP) nas células hepáticas diretamente, resultando na redução do ácido nucléico, glicoproteína e lipídeo, destruindo a organela, danificando a estrutura e a função da célula hepática, causando apoptose hepática. (50) (51) (52) O estudo com D-Gain/LPS apontou que a inibição de IRAK-1 poderia aliviar as reações inflamatórias por meio da regulação negativa de expressão de mediadores inflamatórios. (53) (54)

O pré-condicionamento com LPS pode ter um papel importante na interação das vias de sinal que regulam o equilíbrio imunológico, podendo ter um impacto na autofosforilação de moléculas de sinal, como IRAK-1 e TLR-4, levando a integração de vias de sinalização complexas. Além disso, o silenciamento da expressão de TLR-4 tem uma correlação com a inibição de citocinas IL-6 e IL-8 em resposta ao LPS. Este estudo confirmou que o pré-tratamento com LPS foi capaz de melhorar a sobrevivência dos animais e a lesão hepática induzida por D-Gain/LPS. (55)

A compreensão e o aprofundamento no estudo dos mecanismos da tolerância no fenômeno da isquemia-reperfusão hepática, nos auxiliará na busca de respostas sobre a viabilidade da modulação da resposta imunológica, assim como na possibilidade de redução da resposta inflamatória no pós cirúrgico, sendo este, talvez, uma nova opção de tratamento com a tolerância no futuro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

A indução de tolerância ao Lipopolissacarídeo poderia influenciar benéficamente as lesões de isquemia-reperfusão hepáticas pelos seus efeitos na resposta a inflamação.

### 2.2 Específicos

- Análise dos danos isquêmicos no fígado e proteção pela tolerância:
  - A- Dosagem de biomarcadores plasmáticos AST e ALT para quantificar a intensidade da lesão hepática causadas durante a I/R
  - B-Verificação da peroxidação lipídica no fígado isquêmico para avaliação da lesão local, quanto no pulmão para averiguação da lesão à distância.
  - C- Análise histopatológica para avaliação das diferentes alterações histopatológicas decorrentes da I/R.
- Análise da inflamação sistêmica realizada pela dosagem de citocinas plasmáticas.
- Análise de inflamação de órgão à distância:
  - A- Dosagem de malondialdeído tecidual de pulmão, como indicador de estresse oxidativo,
  - B- Dosagem de mieloperoxidase do tecido pulmonar como indicador de infiltrado neutrofílico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização dos experimentos

As cirurgias e testes bioquímicos deste projeto foram executados no Laboratório de Emergências Clínicas – LIM51, respeitando as normas de segurança laboratorial com uso de EPIs, conforme as normas estipuladas pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 3.2 Comitê de Ética

O projeto de PROTOCOLO:1188/2018 foi submetido ao comitê de ética e obedeceu a todos os critérios estipulados pelo CEUA. Seguindo protocolos de ética em animais. (56)

#### 3.3 Cuidados com os animais

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com grade de aço inox, forradas com maravalha de *Pinus*, com livre acesso a água filtrada e ração para ratos e camundongos CR1- NUVILAB.

Os camundongos foram divididos em 5 grupos (5 animais por caixa para evitar o estresse por superlotação) foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Clínica Médica da FMUSP no terceiro andar, respeitando o ciclo circadiano fase clara/fase escura, sob cuidados do biólogo responsável.

### 3.4 Grupos experimentais

#### Grupo CT, TB, SH, IR e TIR

Grupo controle – (CT) não foi submetido a nenhum procedimento, apenas eutanásia e coleta dos órgãos.

Grupo tolerante sem isquemia reperfusão – tolerante controle – (TB) foi submetido ao modelo de tolerância de 5 dias e eutanásia com coleta dos órgãos, para avaliação da tolerância sozinha.

Grupo sham – (SH) foi submetido a laparotomia, manipulação dos lobos lateral esquerdo e mediano para visualização da tríade hepática, seguido de sutura, sem I/R hepática, avaliação do impacto cirúrgico.

Grupo IR foi submetido a cirurgia de Isquemia e reperfusão hepática no 8º dia, seguido de eutanásia e coleta dos órgãos.

Grupo tolerante submetido a I/R – (TIR) foi submetido ao modelo de tolerância no período de cinco dias e submetido a cirurgia de I/R hepática no 8º dia, seguido de eutanásia e coleta dos órgãos.

A isquemia normotérmica, foi mantida pelo período de 90 minutos à 36°C (aquecimento por luz infravermelho), seguida pela reperfusão com 4h ou 24h, ao final deste período os animais foram submetidos a eutanásia, e coleta do material biológico.

**Tabela 1** Divisão dos grupos

GRUPOS		OPERADOS	ISQUEMIA		REPERFUSÃO		REPERFUSÃO	
N°			NORMOTÉRMICA	N	4h	N	24h	N
1	CT	NÃO	NÃO	10	4h COLETA	10	24h COLETA	10
2	TB		NÃO					
3	SH		SIM					
4	IR	SIM	90min	50	INDIVIDUOS	50	INDIVIDUOS	Total
5	TIR							

Animais foram divididos em 5 grupos: Tolerante basal (TB); controle (CT); sham (SH) avaliação impacto da laparotomia; isquemia e reperfusão (IR) e tolerante com I/R (TIR). Foram utilizados 10 animais por grupo, divididos em 50 animais com 4h de reperfusão, mais 50 animais com 24h de reperfusão. Ao todo foram utilizados 100 animais.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022

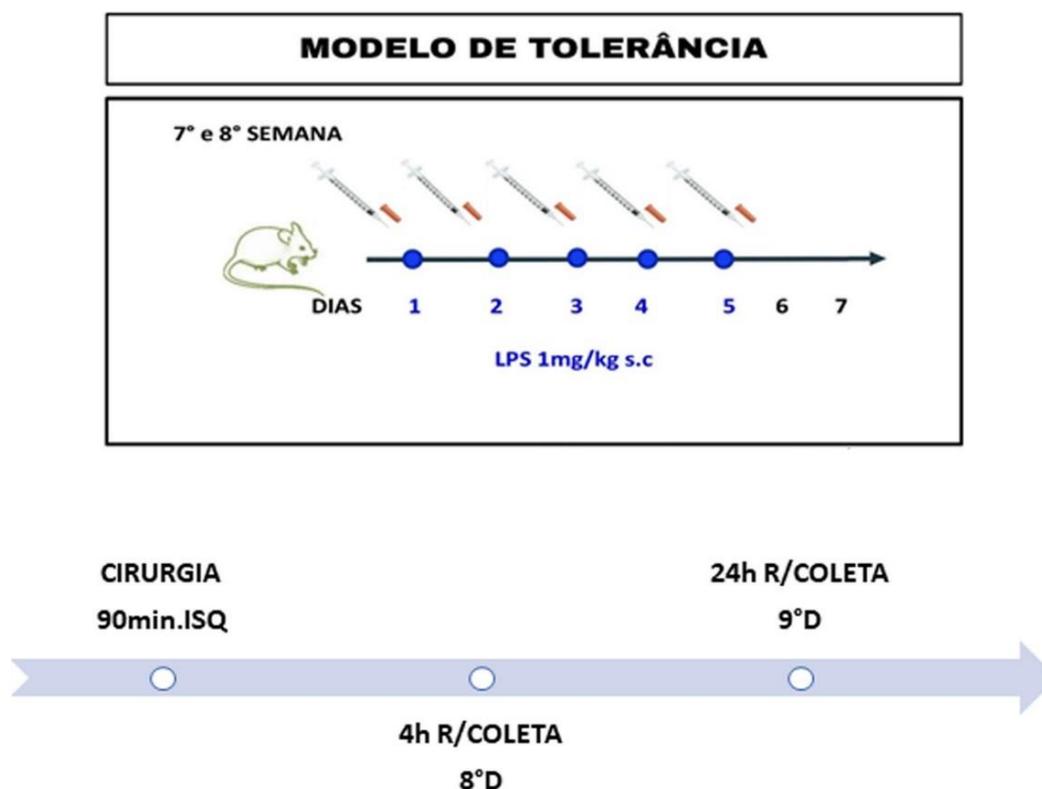
### 3.5 Modelo de Tolerância por LPS

Foi aplicado nos grupos TB e TIR baixas doses de LPS, via s.c diariamente, durante cinco dias seguidos, com pausa apenas no 6º e 7º dia.

No 8º dia foi executado procedimento cirúrgico I/R hepática nos grupos: IR animais não tolerantes e TIR animais tolerantes, decorridas 4h ou 24h de reperfusão foi feita a eutanásia.

Foram aplicadas via subcutâneas doses de 1mg/Kg de LPS (*Escherichia coli* 026:B6/Sigma: L3755) no dorso de cada animal, durante cinco dias seguidos, sempre no período da manhã (figura 3).

**Figura 3** - Modelo de tolerância e linha do tempo de execução da I/R



A tolerância ao LPS foi induzida através da aplicação via subcutânea de doses de 1mg/Kg de LPS (*Escherichia coli* 026:B6/Sigma:L3755) no dorso de cada animal, durante cinco dias seguidos, sempre no período da manhã. Na linha cronológica, está apresentado a sequência de execução dos procedimentos, no oitavo dia os animais foram submetidos a laparotomia, isquemia normotérmica de 90 minutos com reperfusão pontual de 4h com coleta do material biológico no mesmo dia da cirurgia. No nono dia reperfusão tardia de 24h seguida de coleta dos órgãos, um dia após a cirurgia isquemia-reperfusão.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

### 3.6 Procedimento cirúrgico: Isquemia e reperfusão hepática em BalbC

Os animais foram anestesiados com 100mg/kg Ketamina e 20mg/kg Xylazina, via intraperitoneal, a avaliação da profundidade anestésica, antes de se iniciar qualquer procedimento cirúrgico, foi feita por meio da presença ou ausência de determinados sinais, como: reflexo caudal, reflexo palpebral, reflexo contração muscular em resposta ao toque. (57)

Foi realizada laparotomia mediana de 2 cm, a partir do apêndice xifoide, colocados afastadores, possibilitando a localização e exteriorização cuidadosa do lobo lateral esquerdo do fígado, foi utilizado cotonetes embebidos com solução salina, os pedículos hepáticos, foram identificados e o pedículo do lobo lateral esquerdo e lobo mediano, ocluído, utilizando pinça microvascular atraumática, esta manobra, resulta na isquemia de cerca de 70% do órgão. A isquemia destes lobos, foi avaliada visualmente pela mudança de cor dos segmentos isquêmicos, em relação aos segmentos com perfusão normal (figura 4).

**Figura 4** - Isquemia parcial 70 % do volume da massa hepática de camundongo

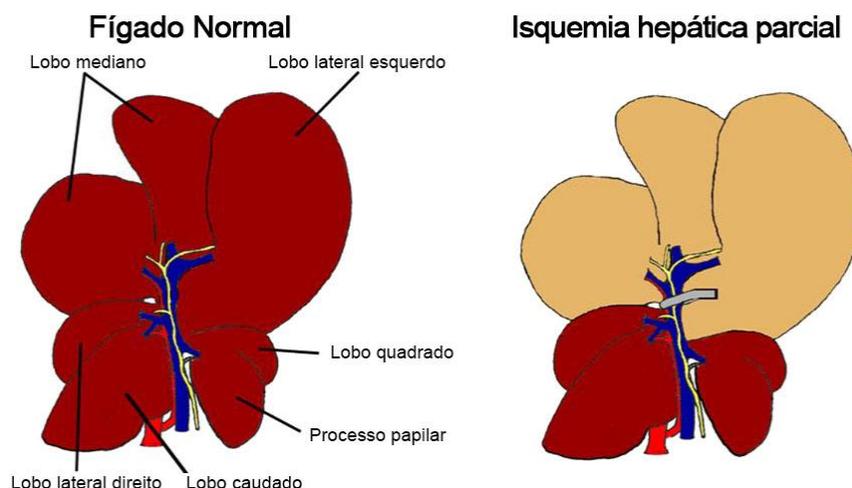


Imagem modificada da representação do modelo de isquemia parcial de 70% do volume total da massa hepática, de camundongo.

Fonte: Imagem adaptada de Abe Y *et al.* 2009 (3)

Após confirmação da presença visual da isquemia de 70% do volume total do fígado, este é recolocado em sua situação anatômica, parede abdominal foi suturada com fio de algodão 4-0, e a pele com nylon 4-0.

Os animais foram mantidos em normotermia (36°C ) durante o período de 90 minutos de isquemia.

Após o período de isquemia, o abdome foi reaberto, as pinças vasculares removidas, e os lobos isquêmicos reperfundidos. Após reperfusão, os animais foram estudados nos tempos de 4 ou 24h pós reperfusão.

### 3.7 Observações Clínicas

Camundongos foram submetidos ao modelo de tolerância, induzida por baixas doses controladas de LPS, via s.c., diariamente, por 5 dias. Estes cinco animais tolerantes, foram chamados de grupo TIR, mais catorze camundongos não submetidos a tolerância, chamados de grupo IR, ambos os grupos, passaram pelo modelo cirúrgico de I/R hepática, com isquemia de 70% do valor total da massa hepática. Foi clampeado apenas a tríade hepática: veia porta, artéria hepática e ducto biliar.

Para evitar-se vieses nos procedimentos cirúrgicos, foi elaborado um protocolo cirúrgico detalhado, com todos os procedimentos executados durante a cirurgia, produzindo um relatório cirúrgico no término de cada cirurgia e um relatório das observações clínicas, dos camundongos durante às 72h do pós-cirúrgico.

O nosso intuito inicial, era produzir uma curva de mortalidade, entretanto, ao longo dos procedimentos cirúrgicos para otimizar nosso modelo, foi observado que, para o modelo no camundongo, a isquemia-reperfusão hepática de 70% com 4h de reperfusão, não era o suficiente para levar a óbito, dentro do período de 72h observado.

As observações clínicas feitas durante este período, estão descritas nos resultados.

### 3.8 Coleta do material biológico

Após término do tempo de reperfusão (4 ou 24 h) foi feita a eutanásia, por dose anestésica de 100mg/kg Ketamina e 20mg/kg Xylazina por via intraperitoneal.

Foram coletadas amostras do plasma, dos lobos isquêmicos, não isquêmicos e dos pulmões (tabela 2).

**Tabela 2** - Amostras coletadas

<b>ANIMAL</b>	<b>PLASMA</b>	<b>FÍG.ISQ</b>	<b>FÍG.ÑISQ</b>	<b>PULMÃO</b>
1	Citocinas	½ histologia H&E	½ histologia	MPO
		Extração Proteína total MDA	H&E	Extração Proteína total MDA
	Bioclin KIT transaminase BRADFORD	½ Duo Set® ELISA Development System, MILLIPLEX e		
		CITOCINAS INFLAMATÓRIAS		PEROX.LIP
<b>ANÁLISE</b>	AST/ALT			

Sangue (Plasma), fígado isquêmico (lobo lateral esquerdo), fígado não isquêmico (lobo caudado) e pulmão.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

### 3.9 Coleta do sangue

O sangue foi coletado imediatamente, após a eutanásia, através da veia cava, com seringa de 1,0 ml, o embolo foi banhado previamente com heparina 5.000 U.I/ml -Hepamax-5 (Blow Farmacêutica S.A). Observamos que os animais dos grupos TIR e IR apresentaram dificuldade para a coleta do sangue.

O sangue foi centrifugado (Centrifuge 5424R- Eppendorf) a 2500 rpm, durante 15 minutos a 4°C, e o plasma armazenado no Freezer -80 (So-low) até a execução do ensaio para análise das enzimas AST e ALT assim como das Citocinas pró e anti-inflamatórias.

### 3.10 Análise da atividade enzimática AST/ALT

Avaliação da atividade enzimática foi feita utilizando n=5 para grupo TB e n= 8 animais para grupos CT, SH, IR e TIR, total de 148 amostras de plasma analisadas (74 amostras de 4h + 74 amostras de 24h). Foi utilizado kit Bioclin-Transaminase TGO/AST ref-K034 e Transaminase TGP/ALT ref-K035. (58) A quantificação foi feita por teste colorimétrico, para uso diagnóstico *in vitro*. Resultado foi lido no Espectrofotometro (Molecular Device- Versa Max BNR06368) comprimento de onda 505nm.

### 3.11 Coleta do Fígado Isquêmico e Fígado não isquêmico

Após a coleta do sangue, procedemos com a ressecção do lobo- caudado (não isquêmico), e lobo lateral esquerdo (isquêmico). Cada lobo foi dividido em dois fragmentos iguais, metade do lobo foi colocado em falcon de 15ml com formaldeído solução 10% para análise histológica. O tecido foi englobado em blocos de parafina e cortados em lâmina 3 µm, foi utilizado a técnica de coloração hematoxilina-eosina (H&E) para averiguação da lesão tecidual.

A outra metade do fígado foi armazenada em tubo criogênico de 2,0ml e mantido no nitrogênio líquido, até o momento de ser transportado até o Freezer -80 (So-low) para devido armazenamento das amostras.

Optamos por fazer extração de proteína total, citocina e peroxidação lipídica (MDA) apenas no fígado isquêmico, para verificação das lesões causada pela I/R a nível tecidual e celular. No fígado isquêmico verificamos o dano local e no Pulmão o dano à distância.

### 3.12 Extração de Proteínas Total (BRADFORD)

Para avaliação de proteína total foi utilizado o BRADFORD, um método de ensaio colorimétrico, para a elaboração da curva padrão, utilizamos Albumina 1mg com diluição seriada de: 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,062 e 0,031, foram utilizados 10µl de cada amostra por poço. Leitura dos resultados 595nm. A quantidade de proteína foi utilizada para normalização de cada amostra nas dosagens de citocinas, obtendo o valor final em pg/ml.

### 3.13 Avaliação das Citocinas Inflamatórias no fígado isquêmico e no Plasma (Milliplex)

Foi feita a dosagem das citocinas inflamatórias (IFN $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 $\alpha$  e TNF $\alpha$ ) utilizamos o Kit Milliplex® Map (Mouse) COD:MHSTCMAG-70K (Merck Millipore Co., Germany).

Foram avaliadas 70 amostras (sendo 35 com 4h de reperfusão e 35 com 24h de reperfusão) o tecido hepático isquêmico foi macerado, e dividido em alíquotas de 200mg por frasco de 1,5ml. Foi feita a ressuspensão dessas amostras em 1ml de NaCl 0,9%, e centrifugação a 10.000 rpm, por 20 minutos à 4°C. Foi retirado o sobrenadante e armazenado no -20 para a próxima etapa do ensaio.

O plasma dos mesmos 70 animais foram utilizadas para as dosagens de citocinas plasmáticas, utilizamos a técnica ELISA, montando o Standard e o branco para cada placa, junto com nossas amostras.

O método Milliplex®, é um método que mostra os resultados através da coloração de microesferas de polietileno (*beads*), elas são coradas internamente com dois corantes fluorescentes. Essas microesferas são revestidas com anticorpo de captura específica. No processo de incubação, essas esferas capturam o analito da amostra, neste momento, ocorre a ligação do anticorpo biotinilado. Esse processo de incubação é feito com o conjugado estreptoavidina-ficoeritrina.

A estreptoavidina emite um sinal fluorescente e um laser ativa os corantes das microesferas, enquanto outro laser ativa o corante da estreptoavidina, processadores digitais de sinais, identificam o código de cor, específico, para cada analito. A leitura foi feita no aparelho MAGPIX Technology no leitor de microplacas, com o programa Luminex™ 100/200 System (Luminex, Texas, EUA).

### 3.14 Peroxidação Lipídica Fígado Isquêmico (TBARs/MDA)

Foram utilizadas 70 amostras (sendo 35 com 4h de reperfusão e 35 com 24h de reperfusão) o tecido hepático isquêmico foi macerado e dividido em alíquotas de 100mg por amostra no frasco de 1,5ml. Cada amostra do tecido passou por processo de ressuspensão, e homogeneização em 1ml KCl 1,15%. Essa solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 40 minutos à 4C°.

Após centrifugação, foram transferidos 100µl do sobrenadante de cada amostra para outro frasco, para quantificação da peroxidação lipídica, dosando a concentração de malondialdeído (MDA) por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) como indicador. Para que esta reação ocorresse, foram utilizadas em um tubo de vidro 100µl do sobrenadante, 100µl de duodecil de sulfato de sódio (SDS) à 8,1% , 750 µl de ácido acético à 20% e 750 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) à 0,8%.

Para a curva padrão do MDA, foi utilizado os valores de 300nM, 30nM, 3nM, 0,3nM, branco 400 µl de água destilada. Esta mistura foi aquecida durante 60 minutos em banho-maria, na temperatura de 95C°. As amostras foram armazenadas em geladeira, para processo de precipitação, durante o período de overnight. No dia seguinte, foram transferidos 200 µl de cada amostra, e da curva padrão para uma placa de Elisa, e lido a 532nm no Espectofotometro Molecular Device- Versa Max BNR06368.(59)

Na avaliação de extração de proteína total do MDA, foi utilizado o BRADFORD. Considerando Albumina 1mg com diluição seriada de respectivamente: 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,062 e 0,031 para elaboração da curva. Foram utilizadas 10µl por amostra. Leitura dos resultados foram lidas a 595nm. O resultado do MDA, foi dividido pelo resultado da concentração de proteína total, obtendo o valor final em nMol/mg.

### 3.15 Coleta do Pulmão

O tecido pulmonar foi coletado e armazenado em tubo criogênico de 2,0ml mantido no nitrogênio líquido temporariamente, e em seguida armazenado no Freezer -80 (So-low).

O tecido foi macerado, o tecido pulverizado foi dividido em alíquotas no frasco de 1,5ml e guardado no Freezer -80C. Posteriormente foi feita a ressuspensão deste tecido em 1ml KCl. Para avaliar o mecanismo de danos por peroxidação lipídica das membranas celulares, através da quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio.

As substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (Tbars), que são produtos da peroxidação lipídica, reagem com o marcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA). A dosagem de MDA, é utilizada como representativa da produção das espécies reativas de oxigênio, utilizamos este método, para identificar os produtos dessa reação. E neste caso, para avaliar o dano à distância no pós-cirúrgico de I/R hepática.

### 3.16 Peroxidação Lipídica Pulmão MDA (EROs)

Foram utilizadas 70 amostras (sendo 35 com 4h de reperfusão e 35 com 24h de reperfusão) do pulmão, foi macerado em pó e dividido em alíquotas de 100mg por amostra no eppendorf de 1,5ml. Cada amostra do tecido passou por processo de ressuspensão e homogeneização em 1ml KCl 1,15%. Essa solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 40 minutos à 4C°.

Após centrifugação foi transferido 100µl do sobrenadante de cada amostra para outro frasco, para quantificação da peroxidação lipídica, dosando a concentração de malondialdeído (MDA), por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador. Para que esta reação ocorresse, foram utilizadas em um tubo de vidro 100µl do sobrenadante, 100µl de duodecil de sulfato de sódio (SDS) à 8,1%, 750 µl de ácido acético à 20% e 750 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) à 0,8%.

Para a curva padrão do MDA foram utilizados os valores de 300nM, 30nM, 3nM, 0,3nM, branco 400 µl de água destilada. Esta mistura foi aquecida durante 60 minutos em banho-maria, na temperatura de 95C°. Decorrido o período do banho-maria, as amostras que atingiram o ponto maior da curva apresentaram coloração rosa. As amostras foram armazenadas em geladeira para processo de precipitação no período da noite. No dia seguinte foram transferidos 200 µl de cada amostra e da curva padrão para uma placa de Elisa e lido a 532nm no Espectrofotometro Molecular Device- Versa Max BNR06368.

Na avaliação de extração de proteína total do MDA foi utilizado o BRADFORD, considerando Albumina 1mg com diluição seriada de respectivamente: 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,062 e 0,031 para elaboração da curva. Foram utilizadas 10µl por amostra. Leitura dos resultados foram lidas a 595nm. O resultado do MDA foi dividido pelo resultado da concentração de proteína total do pulmão, obtendo o valor final em pM/mg.

### 3.17 Avaliação de processo inflamatório no Pulmão (MPO - índice de infiltração por neutrófilos)

No intuito de avaliar o índice de infiltração neutrofílica foi executada a quantificação da mieloperoxidase (MPO). Mieloperoxidase é uma enzima que está relacionada com células brancas, associada a processo inflamatório. A dosagem de mieloperoxidase foi utilizada como um índice de infiltração neutrofílica nos tecidos. (60)

Foram utilizadas 70 amostras (sendo 35 com 4h de reperfusão e 35 com 24h de reperfusão) do pulmão, foi macerado em pó e dividido em alíquotas de 50 mg por amostra no eppendorf de 1,5ml. Cada amostra do tecido, passou por processo de ressuspensão e homogeneização em 1ml de solução de MOPS (10mM e hexa-decil-trimetil-amonio-brometo (HTBA)125mg para cada 25ml de solução). As 70 amostras, com a solução de MOPS ficaram no período de uma hora no agitador gangorra. Após uma hora esse processo foi realizado 3 vezes, durante 3 segundos cada no sonificador (Fisher Scientific® Sonic dismembrator model 100) terminado o período de homogeneização no sonicador, as amostras foram centrifugadas a 15.000g por 20 minutos à 4°C.

O experimento constituiu em reagir amostras ou os padrões, em volume de 20 µl com 20 µl de tetrametilbenzidina 16nM em DMSO, e 140 µl de tampão fosfato (NaPP) composto por Fosfato de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e Fosfato de Sódio Dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Após 5 minutos, foi adicionado 20 µl de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 0,03%. Reação foi parada com adição de Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N). A leitura da absorbância, foi feita no comprimento de onda de 650nm em leitor de placa Versa Max TM Microplate Reader (Molecular devices, Minnesota, USA).

### 3.18 Avaliação das lâminas histológicas

As lâminas foram preparadas na técnica de coloração hematoxilina-eosina (H&E), leitura em procedimento cego, executada no microscópio (modelo: Leica Microsystems DMLB) aumento de 200x áreas de necrose – congestão sinusoidal – infiltrado inflamatório e de 400x para Kupffer hemofagocitando e esteatose.

Foi observado nas zonas I, II e III dos lobos hepáticos, a presença ou ausência de necrose, congestão sinusoidal, infiltrado neutrofílico, Kupffer hemofagocitando e esteatose hepática.

As lesões hepáticas causadas pela cirurgia de I/R nos animais com reperfusão de 4h ou 24h, montando um escore de 0-3 com base no modelo do protocolo de Quireze *et al.* 2006. (61)

No entanto não foi possível avaliar apoptose, pois não apareceram claramente na técnica de coloração H&E. Desta forma há a necessidade de dar continuidade neste estudo, para averiguar apoptose na técnica imunohistoquímica, assim como também a necessidade da verificação da função mitocondrial, para obtermos mais dados que possam responder as nossas perguntas.

**Tabela 3** Escore

Parâmetros	Aumento	Número de campos Observados
Áreas de necrose	200x	10 campos
Áreas de congestão sinusoidal	200x	Localização da necrose no lóbulo hepático
Áreas de infiltrado neutrofílico	200x	Zona I = periportal Zona II = médio-zonal
Kupffer Hemofagocitando	400x	Zona III = centrolobular
Esteatose	400x	Score de 0-3
		0= ausente (< 1)
		1= mínimo (1-25%)
		2= moderado (25-50%)
		3= intenso (>50%)

As lesões foram avaliadas no tecido hepático baseado na graduação de 0-3 por parâmetro, com leitura de 10 campos por lâmina - aumentos de 200x necrose, congestão sinusoidal, infiltrado neutrofílico, e de 400x para Kupffer hemofagocitando e esteatose.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

### 3.19 Análise Estatística das lâminas histológicas

Todos os dados foram expressos em forma de tabelas, com valores da média e erro padrão da média. Foi observado no tecido hepático isquemiado (F.ISQ) e no tecido hepático que continuou em perfusão (F.Ñ.ISQ) nos dois tempos de reperusão tanto de 4h quanto de 24h, considerando um número entre 8 e 10 animais por grupo.

Para análise dos danos de todos os parâmetros juntos, os dados foram expressos em forma de tabela e gráfico. Entre 2019-2021 foram avaliadas 196 lâminas sendo 50 F.ISQ 4h, 48 F.ISQ 24h (lobo lateral esquerdo) e 50 F.ÑISQ 4h, 48 F.ÑISQ (lobo caudado).

Na avaliação dos 5 parâmetros foi considerado o escore de 0 a 3 equivalentes:

- 0- Ausente abaixo de 1
- 1- Mínimo 1-25%
- 2- Moderado 25-50%
- 3- Intenso acima de 50%.

Em cada campo foi avaliado a presença ou ausência de: 1-Necrose; 2 - congestão sinusoidal; 3- infiltrado neutrofílico; 4- Kupffer hemofagocitando; e 5- esteatose. Total de 10 campos avaliados por lâmina. Foi executado a soma dos danos dos 10 campos e calculada a média. Os resultados foram expressos como média + EPM. Na análise de cada parâmetro foram utilizadas 108 lâminas sendo (59 F.ISQ 4h, 49 F.ISQ 24h) representado na tabela 4.

Para procedimentos estatísticos das lâminas histológicas e montagem dos gráficos de todos os experimentos deste estudo foi utilizado o programa GraphPad PRISMA, One-way ANOVA (não paramétrico) com Pós-teste de Tukey, considerando significância para  $*P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

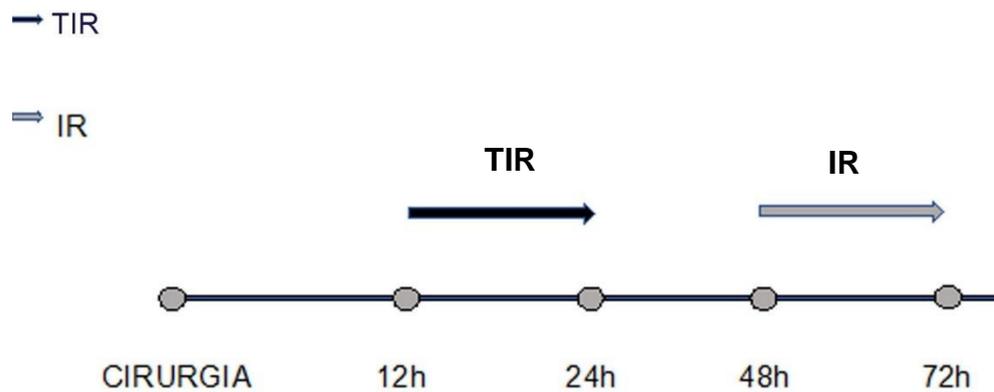
### 4.1 Observações clínicas: pós-cirúrgico

A observação clínica do pós-cirúrgico foi executada em 19 animais. Sendo: 5 animais tolerantes (TIR) e 14 animais I/R hepática (IR). Observados no período de 3 dias.

O grupo TIR ficou prostrado nas primeiras 24h do pós-cirúrgico, apresentou pelo erizado, sugerindo “quadro de febre” entre 12-24h. Após 48h do procedimento não apresentou mais “febre”, tendo uma recuperação considerável após 72h, sem óbitos.

Enquanto o grupo IR continuou ativo nas primeiras horas do pós-cirúrgico, declinando entre 12- 24h após a execução do procedimento, sugerindo quadro de “febre” entre 48h-72h. Após 72h apresentou melhora, sem óbitos. Foi observado que grupo IR e TIR apresentam diferenças no tempo de prostração e febre (figura 5).

**Figura 5** - Linha do tempo: observação clínica pós-cirúrgico I/R



Observação clínica do pós-cirúrgico de isquemia e reperfusão hepática em camundongo, com tempos diferentes para quadro sugestivo de febre, para o grupo TIR (submetido a tolerância + I/R 4h) e para o grupo IR (submetido apenas a cirurgia de isquemia e reperfusão 4h). n - 5 animais tolerantes e 14 animais isquemia e reperfusão hepática.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.2 Enzimas hepáticas: ALT/AST 4-24h

Para análise da atividade enzimática, foi utilizado o kit Bioclin-Transaminase TGO/AST ref-K034 e Transaminase TGP/ALT ref-K035. Por teste colorimétrico, para uso diagnóstico *in vitro*. As amostras foram quantificadas no Espectrofotômetro (Molecular Device- Versa Max BNR06368) no comprimento de onda 505nm.

Na figura 6 a atividade enzimática dos grupos CT e TB não foi detectável em A, B, C e D apresentando valores abaixo de 0, em adição no grupo SH a atividade enzimática não foi detectável em 24h de reperfusão em B e D.

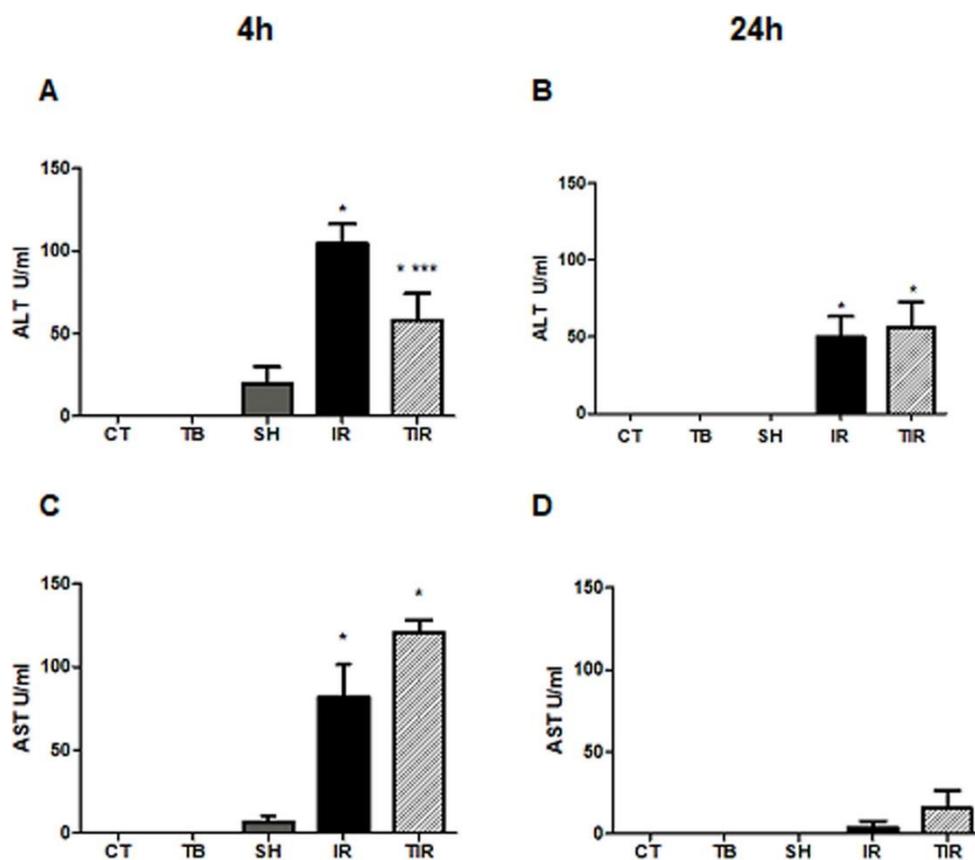
As dosagens de ALT de 4h dos grupos IR e TIR apresentaram diferenças significantes quando comparados aos grupos CT, TB e SH. Interessante realçar que o grupo TIR apresentou atividade enzimática menor com valor significativo  $p < 0,05$  para Alanina aminotransferase, quando comparado ao grupo IR (A).

ALT 24h- Grupo IR e TIR também apresentaram atividade enzimática significante quando comparados aos grupos CT, TB e SH (B).

AST 4h – grupos IR e TIR apresentaram diferenças significantes na atividade enzimática comparados aos grupos CT, TB e SH, a atividade do grupo TIR ficou acima da atividade do grupo IR. O aumento de AST é um indicativo de fase aguda (C). Em AST 24h as diferenças não foram significantes (D).

Neste estudo foi observado que o pico das transaminases ocorreu em 4h, e que ALT e AST diminuem a atividade enzimática ao longo do tempo. Mantendo-se os valores de ALT acima de AST quando comparados (figura 6).

**Figura 6** - Atividade enzimática AST e ALT em Balb-c após procedimento de I/R hepática em dois tempos de reperfusão 4h – 24h



A atividade enzimática de TB e CT não foram detectáveis em A, B, C e D apresentando valores abaixo de 0, grupo SH não detectável nos grupos com 24h de reperfusão em B e D. ALT 4h- Grupo IR e TIR apresentaram diferenças significantes (\*)  $P < 0,05$  quando comparados aos grupos CT, TB e SH, grupo TIR apresentou menor quantidade de ALT com (\*\*\*)  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo IR (A). ALT 24h – Grupo IR e TIR também apresentaram atividade significativa de (\*)  $P < 0,05$  quando comparados aos grupos CT, TB e SH (B). AST 4h – IR e TIR apresentaram diferenças significativas versos CT, TB e SH (\*)  $P < 0,05$ . Em AST 4h atividade do grupo TIR apareceu mais elevado quando comparado ao grupo IR (C). Em AST 24h diferenças não significantes (D). Para CT, SH, IR, TIR n-8, TB n-5.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

### 4.3 Avaliação total das lesões hepáticas – Fígado isquêmico e fígado não isquêmico em 4h e 24h

#### Lobo lateral esquerdo - Fígado isquêmico

Grupos SH, IR e TIR 4h que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, apresentaram maior número de lesões, quando comparados aos grupos TB e CT que não passaram por cirurgia.

Em 4h grupo CT apresentou valor dentro do score 0- ausente (abaixo de 0), mantendo-se os grupos SH e TB em torno do grau mínimo (1-25%), TIR em torno do grau 2-moderado (25-50%) de lesão para este escore, enquanto grupo IR apresentou grau 3- intenso acima de 50% de lesão com valor significativo para (#)  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CT. O grupo TIR apresentou menor quantidade de lesão celular, após procedimento de isquemia e reperfusão hepática, quando comparado ao grupo IR (A).

Fígado isquêmico após 24h de reperfusão, as lesões de todos os grupos diminuíram, mantendo -se os grupos TB, CT e SH no grau 0 e grupos IR e TIR grau 1- mínimo (B).

#### Lobo caudado - Fígado não isquêmico

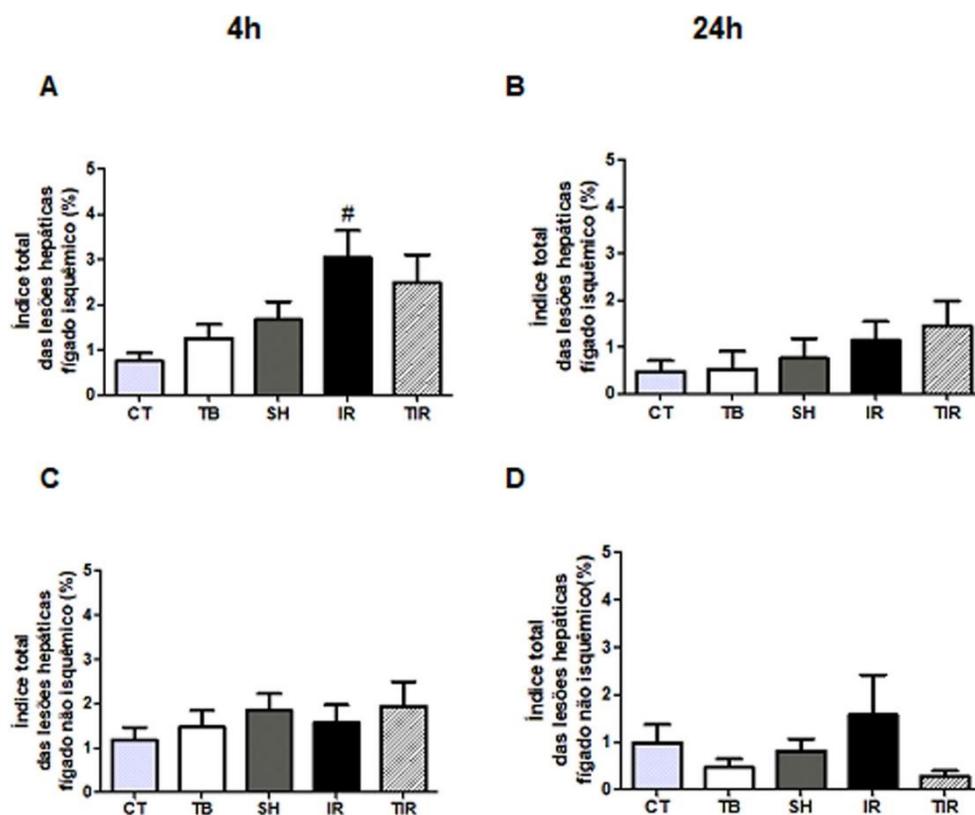
Apesar de ter continuado em perfusão o lobo não isquêmico, também apresentou lesões. De fato, em menor grau, quando comparado ao lobo que foi isquemiado.

Em 4h para o fígado não isquêmico, os grupos TB, CT, SH, IR e TIR se mantiveram entre o grau 1 e 2 de lesões, considerado moderado para este escore. Grupos SH, IR e TIR apresentaram valores equivalentes, pois foram os grupos que foram submetidos ao procedimento cirúrgico (C).

Fígado não isquêmico: Após 24h os grupos TB, SH e TIR apresentaram grau- 0 de lesões, considerado ausente para este escore, enquanto grupos CT e IR apresentaram grau 1-mínimo. Nota-se também a diminuição de lesões nos grupos TB, SH e TIR quando comparados aos grupos de 4h reperfusão.

Enquanto CT e IR se mantiveram próximos dos mesmos valores, quando comparados aos grupos de 4h (D). Foi observado também que, na comparação entre o lobo caudado, e o lobo lateral esquerdo, apresentaram aumento na quantidade de lesões no grupo IR, e redução das lesões no grupo TIR no lobo não isquemiado após 24h da reperfusão (B e D). Um dado a ser considerado, é que não se deve esquecer que com exclusão do lobo mediano e esquerdo, todo o fluxo sanguíneo intestinal foi para o lobo caudado, causando um hiper fluxo e possivelmente lesões decorrentes desse processo neste lobo. Não houve valores significantes para  $p < 0,05$  em B, C e D (Figura 7).

**Figura 7** - Análise do índice total das lesões hepáticas encontradas no pós-cirúrgico de I/R hepática submetido a tolerância em Balb-c



Analisamos os dois lobos hepático para averiguação de lesões da massa hepática, que continuou em perfusão, e da parte da massa hepática que foi submetida a I/R. Fígado isquêmico: Em 4h grupo CT apresentou valor dentro do score 0- ausente (abaixo de 0), TB e SH apresentaram lesões no grau 1-mínimo (1-25%), grupo TIR apresentou grau 2-moderado (25-50%) e grupo IR apresentou o maior grau de lesões no nível 3-intenso (>50%) com valor significativo para (#)  $p < 0,05$  v.s. CT (A). Fígado isquêmico após 24h de reperusão as lesões de todos os grupos diminuíram, mantendo-se os grupos CT, TB e SH no grau 0 e grupos IR e TIR grau 1, sem valores significantes (B). Fígado não isquêmico em 4h os cinco grupos avaliados se mantiveram entre o grau 1 e 2 de lesões, grupos SH e TIR apresentaram valores equivalentes (C). Fígado não isquêmico: Após 24h os grupos TB, SH e TIR apresentaram grau- 0 de lesões considerado ausente para este escore, enquanto grupos CT e IR apresentaram grau 1-mínimo (D). Obtivemos valores significantes  $p < 0,05$ , apenas em 4h. n-10 para todos os grupos com 4h de reperusão e n -10 para os grupos TB, CT, SH, IR apenas para grupo TIR n-8. Ao todo 196 lâminas foram analisadas.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.4 Achados histológicos encontrados no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4-24 horas

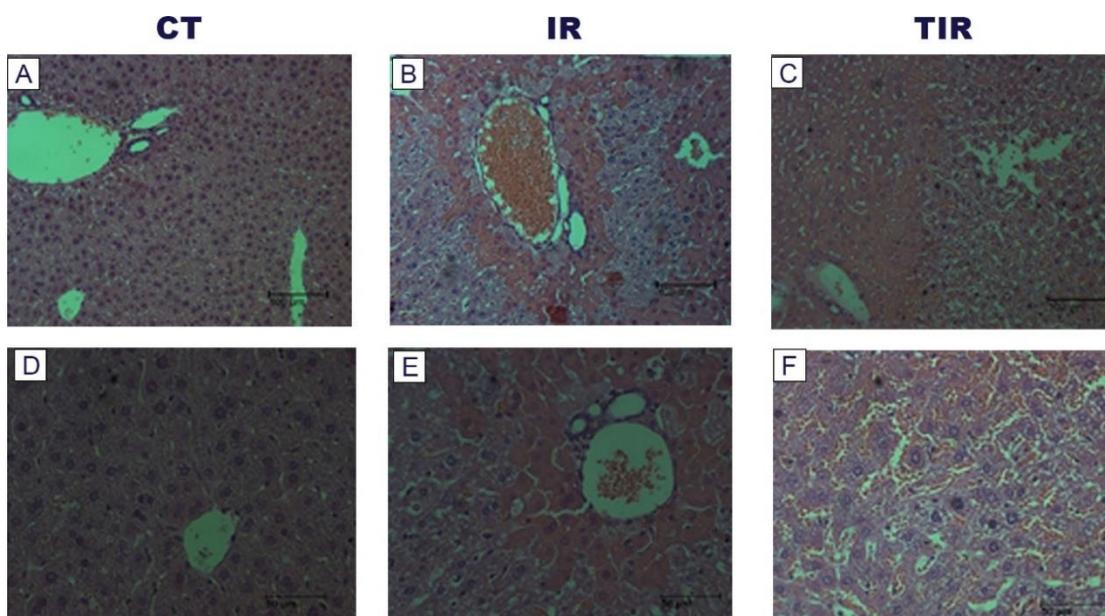
Para elucidar as lesões encontradas no pós-cirúrgico de isquemia-reperfusão hepática foram considerados nestes resultados os grupos CT, IR e TIR. Dos cinco parâmetros avaliados, os grupos IR e TIR apresentaram maior número de lâminas com congestão sinusoidal de moderada a intensa, nas zonas periportal, médio-zonal e centrolobular, a zona centrolobular foi mais recorrente para as lesões de necrose e congestão sinusoidal para ambos os grupos.

Grupos IR e TIR também apresentaram valores de esteatose microgoticular semelhantes. O grupo TIR apresentou maior quantidade de Kupffer hemofagocitando.

Não foi observado grandes quantidades de infiltrado neutrofílico nos grupos estudados. Foi encontrado pequena quantidade de infiltrado neutrofílico apenas nos grupos TIR e IR, os dois grupos submetidos ao procedimento cirúrgico.

Tentamos avaliar apoptose também, entretanto não foi possível avaliar com clareza na técnica H&E, sendo necessário talvez dar continuidade no estudo, para avaliação de apoptose pela técnica de imuno-histoquímica (uma técnica mais adequada para ver apoptose).

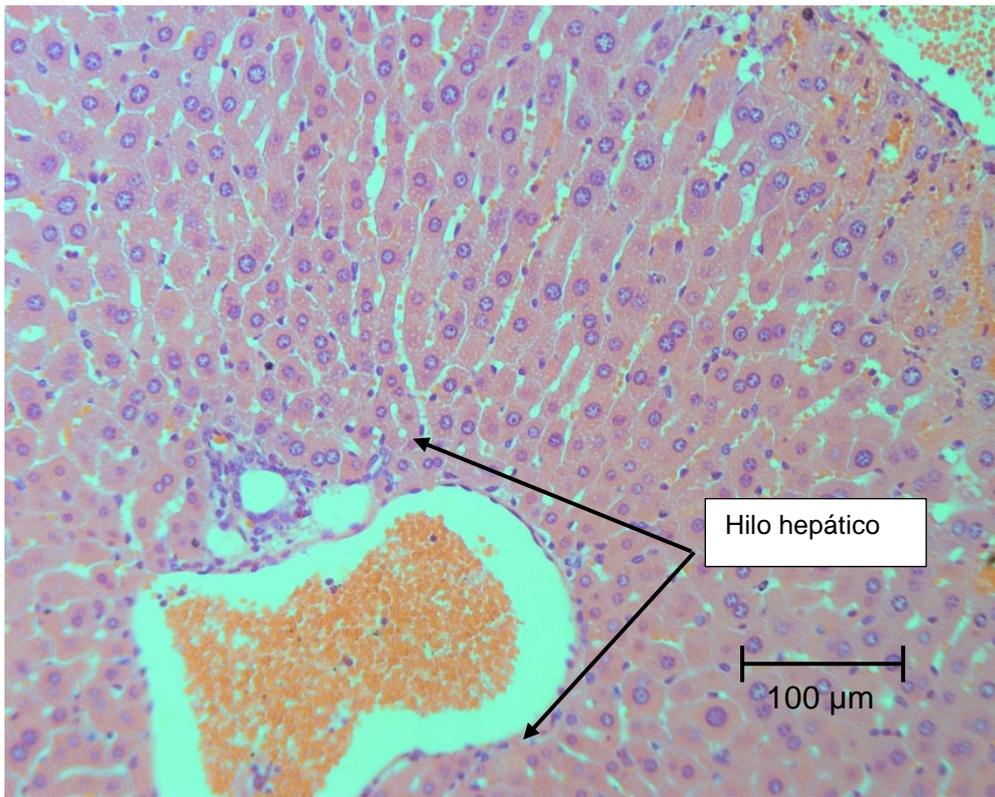
**Figura 8** - Achados histológicos no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4 horas



Lesões encontradas após 4 horas de reperfusão hepática: Tecido normal com hepatócitos preservados com tamanhos uniformes, cordões e espaçamento sinusoidal preservados (A). Necrose com perda da morfologia dos hepatócitos e esteatose microgoticular com distribuição difusa dos vacúolos lipídicos nos hepatócitos (B). Hepatócitos em processo de necrose extensa a direita da imagem, com ruptura do tecido, perda da morfologia, congestão sinusoidal e esteatose microgoticular difusa (C). Aumento de 200x (A-B-C). Mesmas lâminas com zoom para melhor visualização das lesões aumento de 400x (D-E-F). Lâmina controle com todas as estruturas preservadas (D). Esteatose na zona centrolobular e médio-zonal, com necrose na zona periportal (E). Congestão sinusoidal extensa, e células de Kupffer hemofagocitando (F). n-199 lâminas avaliadas, técnica de coloração H&E. Microscópio Leica Microsystems DMLB, Imagens obtidas no programa Nis Element (NIKON).

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

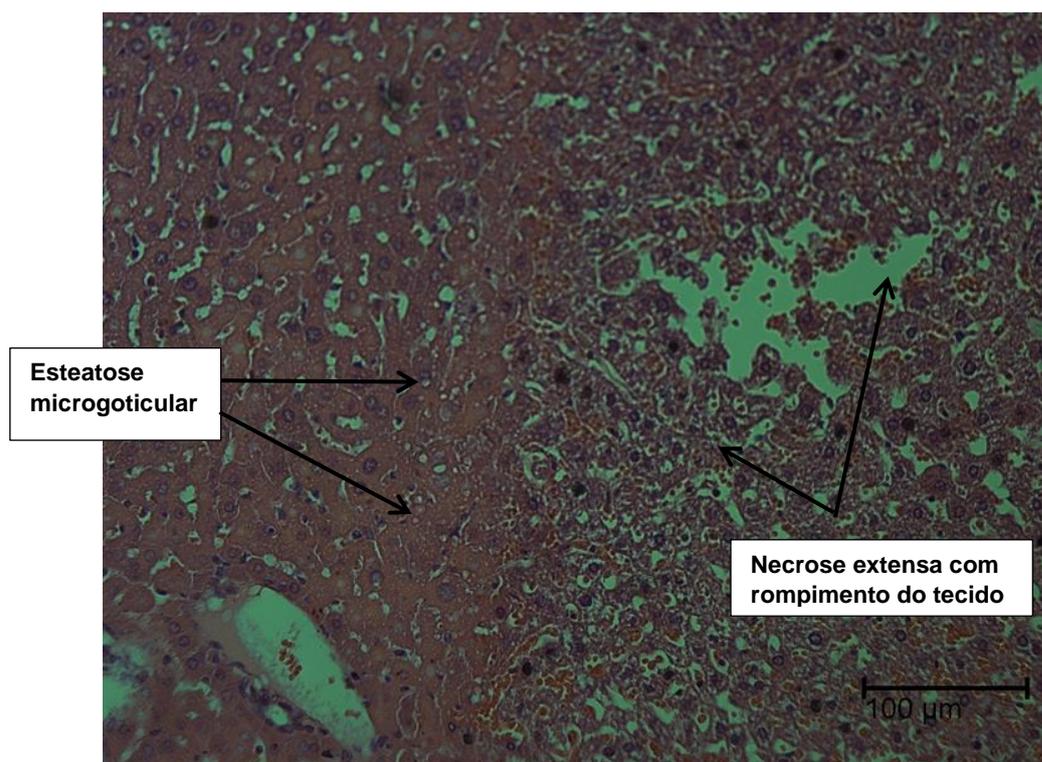
**Figura 9** - Tecido hepático integro



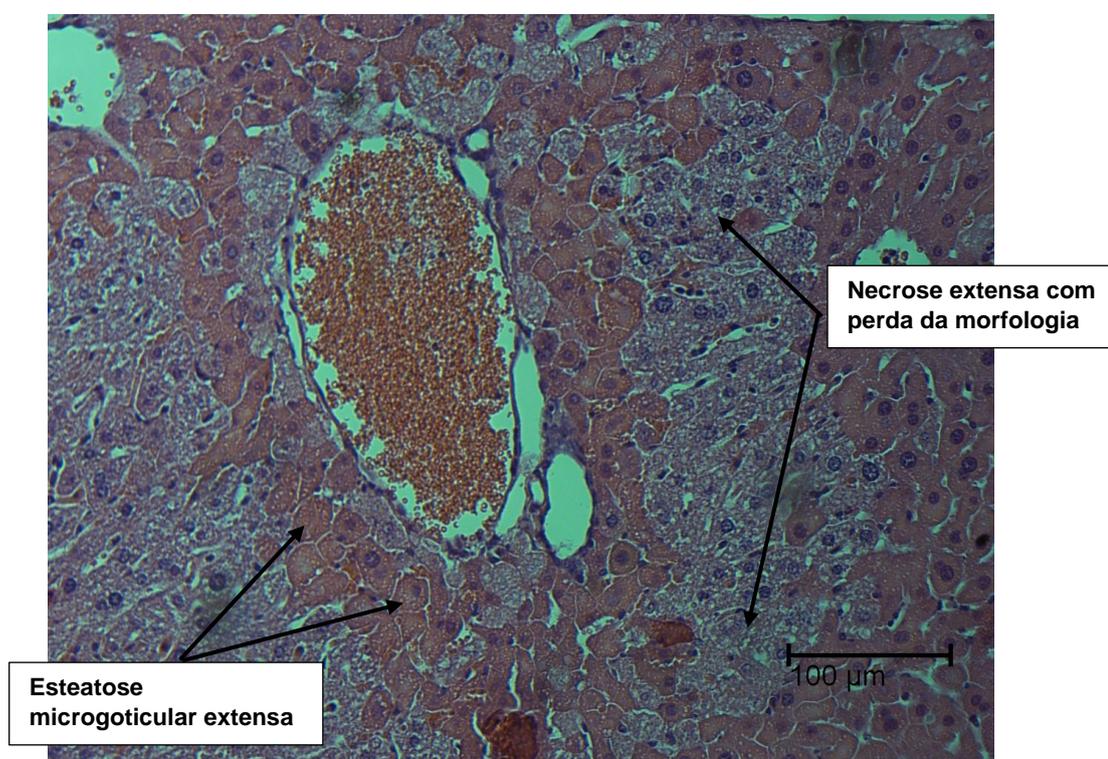
**CT- Cordões de hepatócitos preservados A-200x**

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

**Figura 10** - Lesões características da lesão de isquemia-reperfusão

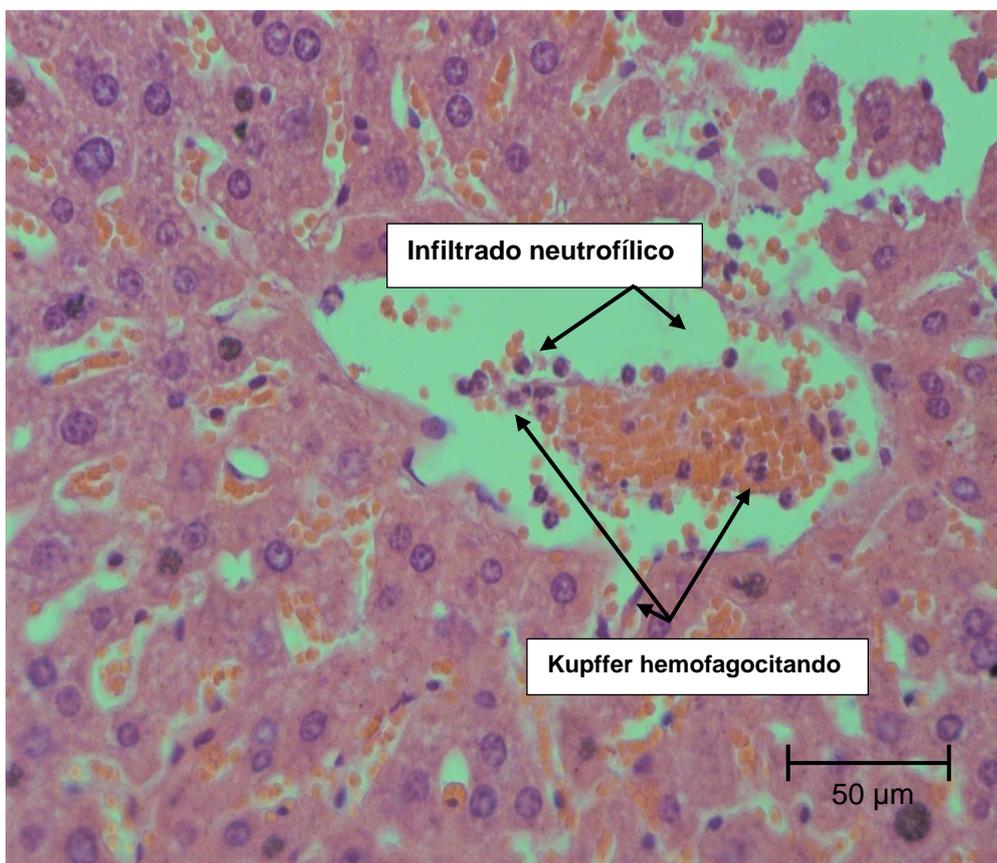
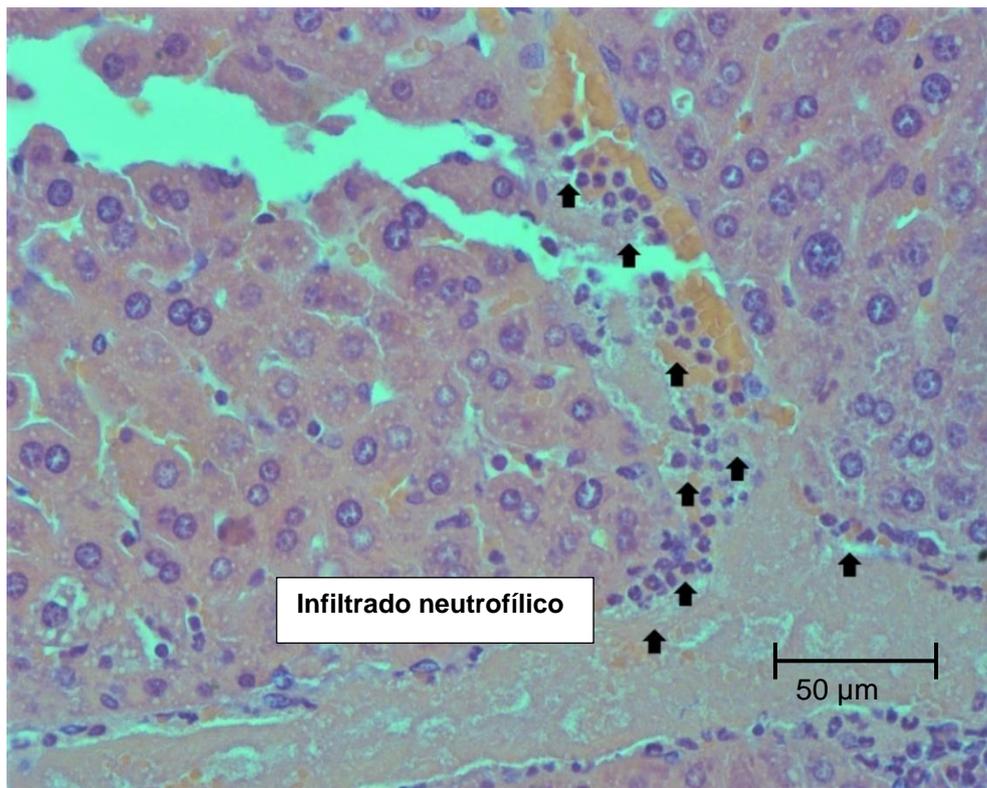


**TIR - 4 horas após reperfusão A- 200x**



**IR 4 horas após reperfusão A-200x**

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

**Figura 11 - Infiltrado neutrofílico**

**TIR- 4 horas após reperusão 50 µm A- 400x**

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.5 Análise histológica por parâmetro 4h e 24

Ao avaliar o grau de acometimento por parâmetro notou-se que após 24h de reperfusão os achados histológicos de lesões são menores do que em 4h. Enquadrando-se na maior parte na graduação 0-ausente.

Quando comparados os 5 parâmetros, o grupo IR apresentou maior quantidade de necrose e congestão sinusoidal quando comparado ao grupo TIR em 4h. Após 24h da reperfusão, foi observado, presença de infiltrado neutrofílico nos grupos IR e TIR. Sugerindo que a presença do infiltrado neutrofílico, possa estar diretamente relacionado com a ação das células de Kupffer, e o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão.

Grupos TB, SH e TIR apresentaram maiores quantidades de Kupffer hemofagocitando em 4h, seria este talvez um indício de que a tolerância na I/R pode estar atuando na ativação de Kupffer. No parâmetro esteatose em 4 horas grupos IR e TIR foram os que apresentaram maiores valores.

Obtivemos mais resultados no período de reperfusão de 4h do que no período de 24h. n-10 ou 12 por grupo. Para elaboração da tabela, foi considerado média e erro padrão da média. Valores não significantes  $p < 0,05$  na análise do GraphPad Prisma (tabela 4).

**Tabela 4** - Grau de acometimento da lesão pontual da I/R hepática no fígado isquêmico : análise por parâmetro

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NO PÓS CIRÚRGICO DE I/R HEPÁTICA COM 2 TEMPOS DE REPERFUSÃO 4-24h MÉDIA ± EPM										
GRUPO	CT		TB		SH		IR		TIR	
TEMPO	4h	24h								
PARAMETROS										
NECROSE	0,22 ± 0,06	0,10 ± 0,05	0,18 ± 0,06	0,1 ± 0,07	0,25 ± 0,05	0,1 ± 0,05	0,52 ± 0,15	0,22 ± 0,09	0,46 ± 0,17	0,32 ± 0,12
CONG. SINUS.	0,4 ± 0,13	0,03 ± 0,02	0,31 ± 0,10	0,19 ± 0,14	0,48 ± 0,16	0,04 ± 0,02	0,90 ± 0,22	0,04 ± 0,02	0,78 ± 0,22	0,08 ± 0,05
INFILT. NEUT.	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,11 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,21 ± 0,10	0,26 ± 0,12	0,17 ± 0,09	0,22 ± 0,16
KUPFF. HEMO	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,12	0,47 ± 0,18	0,08 ± 0,05	0,56 ± 0,17	0,26 ± 0,12	0,32 ± 0,10	0,43 ± 0,18	0,55 ± 0,11	0,31 ± 0,12
ESTEATOSE	0,1 ± 0,05	0,03 ± 0,02	0,17 ± 0,10	0,08 ± 0,06	0,5 ± 0,21	0,33 ± 0,29	0,65 ± 0,18	0,2 ± 0,07	0,70 ± 0,20	0,5 ± 0,27

Graduação: 0 ausente (abaixo de 1), 1- mínimo (1-25%), 2 -moderado (25-50%) e 3 intenso (> de 50%) de acometimento dos hepatócitos. Baseado neste escore, todos os grupos enquadram-se na graduação de ausente, entretanto quando comparados os parâmetros o grupo IR apresentou maior quantidade de (") necrose e (&) congestão sinusoidal v.s. o grupo TIR em 4h, e em 24h maior quantidade de (\*\*) infiltrado neutrofílico. Grupos TB, SH, e TIR apresentaram maiores quantidades de (#) Kupffer hemofagocitando em 4h. No parâmetro (\*) esteatose em 4h grupos IR e TIR foram os que apresentaram maiores valores. Obtivemos mais resultados no período de reperusão de 4h do que no período de 24h. n-10 ou 12 por grupo. Foi considerado média e erro padrão da média. Valores não significantes para p<0,05 na análise estatística- GraphPad Prisma, pós teste de Tukey.

Fonte: Desenvolvido pelo autor, 2022.

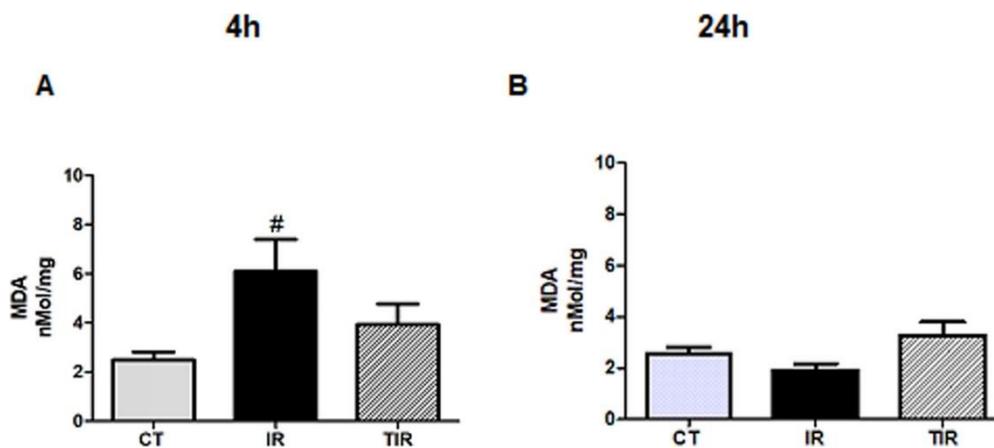
#### 4.6 - Lesão local por estresse oxidativo no fígado isquêmico peroxidação lipídica (MDA-TBARs)

Observamos que em 4h a concentração de malondialdeído (MDA) no fígado isquêmico, após o procedimento de isquemia-reperfusão foi maior no grupo IR, com valor significante quando comparado ao grupo controle. Sugerindo maior quantidade de reações por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Enquanto o grupo TIR, apresentou valor mais próximo do grupo CT (A).

Na comparação dos grupos CT, IR e TIR com 24h de reperfusão, o grupo IR apresentou o valor mais próximo do grupo controle, quando comparado ao grupo TIR. O grupo TIR em 24 horas apresentou o maior valor de malondialdeído, sem valor significante para  $p < 0,05$  (B).

Nos dois períodos 4 e 24 horas, o grupo CT apresentou estabilidade, se mantendo próximo a 2 nMol/mg. O grupo IR apresentou variações se mantendo entre 6 – 2 nMol/mg, com valor mais expressivo de MDA em 4h. Grupo TIR apresentou maior estabilidade do que o grupo IR apresentando valor próximo de 4 nMol/mg, nos dois períodos avaliados (A-B).

**Figura 12** - Lesão local por estresse oxidativo no fígado isquêmico peroxidação lipídica (MDA-TBARs)



Em 4 horas a concentração de malondialdeído no fígado isquêmico foi maior no grupo IR com (#)  $P < 0,05$  significativa quando comparado com o grupo CT, enquanto os valores do grupo TIR ficaram mais próximo do valor do grupo CT (A). Na comparação dos 3 grupos em 24 horas o grupo IR apresentou valor mais próximo do grupo CT v.s. o grupo TIR. Em 24h grupo TIR apresentou o maior valor de MDA, sem valor significativo para  $P < 0,05$  (B). n- 4-7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.7- Resultados Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17 A, com 2 tempos de reperfusão 4 e 24h

Para averiguação da lesão tecidual local, no fígado isquemiado, seguimos o mesmo protocolo de análise, que fizemos no plasma. Observamos que tanto em 4h quanto em 24h os valores de TNF alpha tecidual foram baixos.

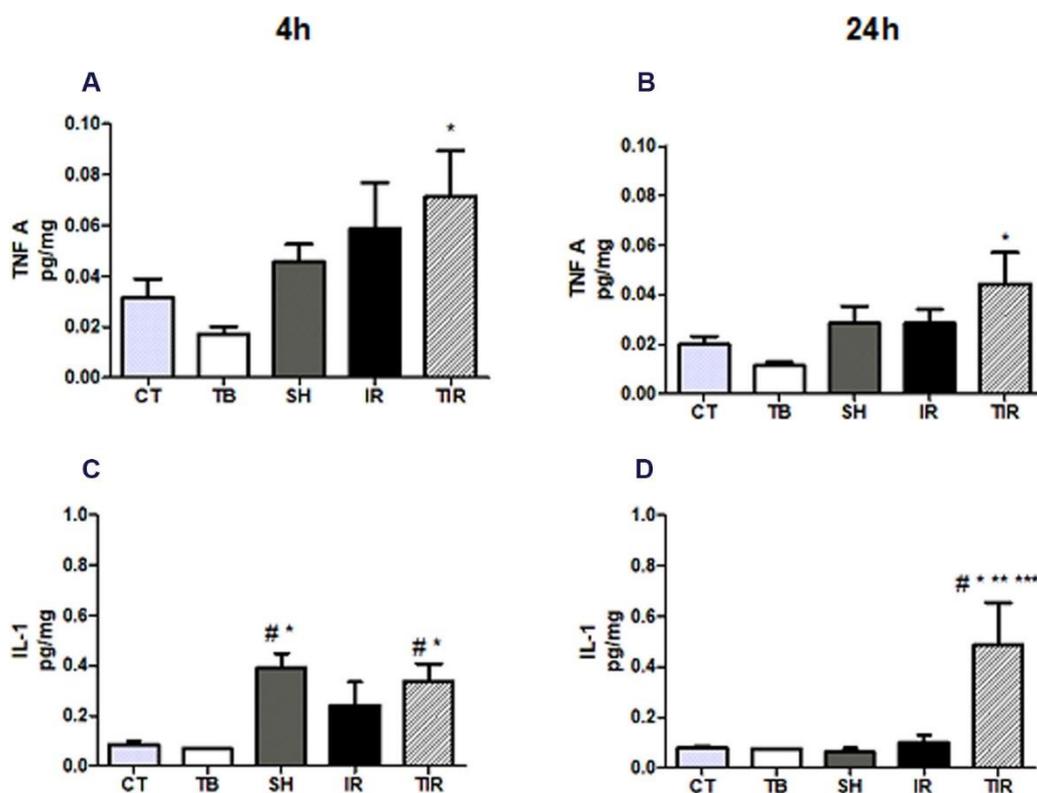
Em 4h o grupo TIR apresentou maior quantidade de TNF alpha com valor significativo para  $P < 0,05$  v.s. grupos TB. Os grupos SH, IR e TIR que foram submetidos a procedimento cirúrgico, apresentaram os valores maiores de TNF. Apresentando os menores valores os grupos CT e TB (A).

Após 24 horas da reperfusão todos os grupos apresentaram discreta diminuição de TNF, grupo TIR apresentou novamente valor significativo ( $P < 0,05$  v.s. grupos TB (B).

Os grupos SH e TIR apresentaram os maiores valores de IL-1 com  $P < 0,05$  quando comparados aos grupos CT e TB em 4h. CT e TB mantiveram valores basais. Enquanto grupo IR ficou em torno de 0,2 pg/mg (C).

Em 24h os grupos CT, TB, SH e IR reduzem a IL-1, enquanto o grupo TIR aumenta apresentando valores significativo para  $P < 0,05$  versus os demais grupos(D). Conforme apresentado na (figura 13).

**Figura 13** - Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h TNF alpha e IL-1



Tanto em 4h quanto em 24h os valores de TNF alpha tecidual foi bem baixa. Em 4h o grupo TIR apresentou maior quantidade de TNF alpha com valor significativo (\*)  $P < 0,05$  v.s. grupos TB. Os grupos SH, IR e TIR que foram submetidos a procedimento cirúrgico apresentaram os valores maiores de TNF. Apresentando os menores valores os grupos CT e TB (A). Após 24h da reperfusão todos os grupos apresentaram discreta diminuição de TNF, grupo TIR apresentou novamente valor significativo (\*)  $P < 0,05$  v.s. grupos TB (B). Os grupos SH e TIR apresentaram os maiores valores com (# \*)  $P < 0,05$  v.s. grupos CT e TB em 4h. CT e TB mantiveram valores basais. Enquanto grupo IR ficou em torno de 0,2 pg/mg (C). Em 24h os grupos CT, TB, SH e IR reduzem a IL-1 enquanto o grupo TIR aumenta apresentando valores significante (# \* \*\* \*\*\*)  $P < 0,05$  v.s. os demais grupos(D). n- 7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

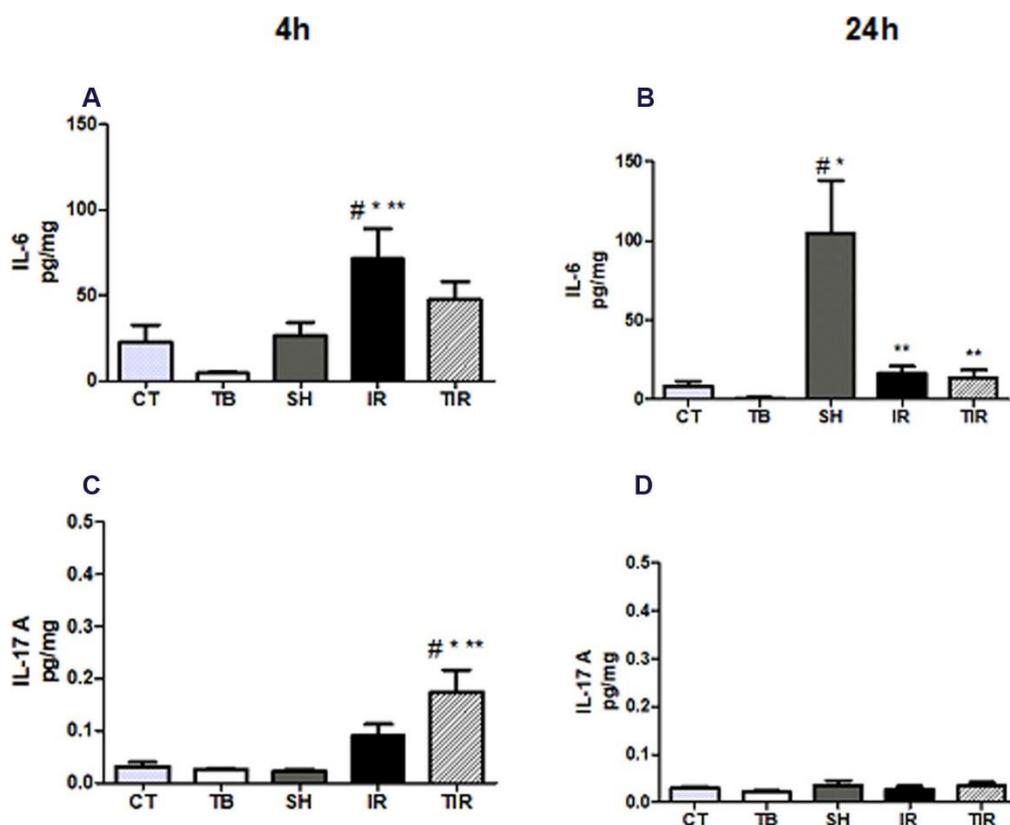
No fígado isquêmico do grupo IR a IL-6 apresentou maior valor com valores significantes para  $P < 0,05$  versus grupos CT, TB e SH. Grupo TIR apresentou valores em torno de 49 pg/mg de IL-6, valor mais baixo quando comparado ao grupo IR com aproximadamente 70 pg/mg em 4h de reperfusão (A).

Em 24h Grupos CT, TB diminuem, assim como os grupos IR e TIR quando comparados aos grupos IR e TIR 4h. IR e TIR apresentam valor significante versus grupo sham (B).

No tecido hepático a IL-17 alpha, apresentou valores abaixo de 1,0. O Grupo TIR que foi submetido a I/R e tolerância, apresentou o maior valor com valores significantes para  $P < 0,05$  v.s. grupos CT, TB e SH em 4h de reperfusão. O que é interessante, pois tanto no tecido quanto no plasma, a IL-17 A apresentou valores consideráveis(C).

Após 24h os grupos CT, TB e SH se mantiveram baixos, o grupo IR apresentou discreta diminuição de IL-17-A. O grupo TIR 24h apresentou redução da IL-17 alpha quando comparado ao grupo TIR 4h, caindo para o valor basal, se igualando aos demais grupos de 24 horas (D). Conforme apresentado na (figura 14).

**Figura 14** - Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h IL-6 e IL-17 alpha



No fígado isquêmico a IL-6 apresentou maior valor com valores significantes (# \* \*\*)  
 $P < 0,05$  v.s. grupos CT, TB e SH. Grupo TIR apresentou valores em torno de 49 pg/mg de IL-6, valor mais baixo quando comparado ao grupo IR com aproximadamente 70pg/mg em 4h de reperfusão (A). Em 24h o grupo SH aumenta consideravelmente quando comparado ao SH de 4h, apresentando valores significantes para os grupos CT e TB. Grupos CT, TB diminuíram, assim como os grupos IR e TIR quando comparados aos grupos IR e TIR 4h. IR e TIR apresentam valor significativo v.s. SH (B). No tecido hepático a IL-17 alpha, apresentou valores abaixo de 1,0 considerado baixo. O Grupo TIR que foi submetido a I/R e tolerância, apresentou o maior valor com valores significantes (# \* \*\*)  
 $P < 0,05$  v.s. grupos CT, TB e SH em 4h de reperfusão (C). Após 24h os grupos CT, TB e SH se mantiveram baixos, enquanto grupo IR apresentou discreta diminuição de IL-17-A. O grupo TIR apresentou redução da IL-17 alpha quando comparado ao grupo TIR 4h, caindo para o valor basal, se igualando aos demais grupos de 24h (D). n- 7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.8- Resultados Citocinas modulatórias e anti-inflamatórias no fígado isquêmico com 2 tempos de reperfusão 4 e 24h IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10

Em 4h o grupo IR apresentou a maior quantidade de IFN $\gamma$  no fígado isquêmico. Grupo TIR apresentou a menor quantidade, mantendo-se os grupos CT, TB e SH com valores próximos. Entretanto sem valores significantes(A).

Após 24h de reperfusão apresentaram queda nos valores de interferon, os grupos CT, TB, IR e TIR. Não foi possível detectar interferon no grupo SH após reperfusão de 24h (B).

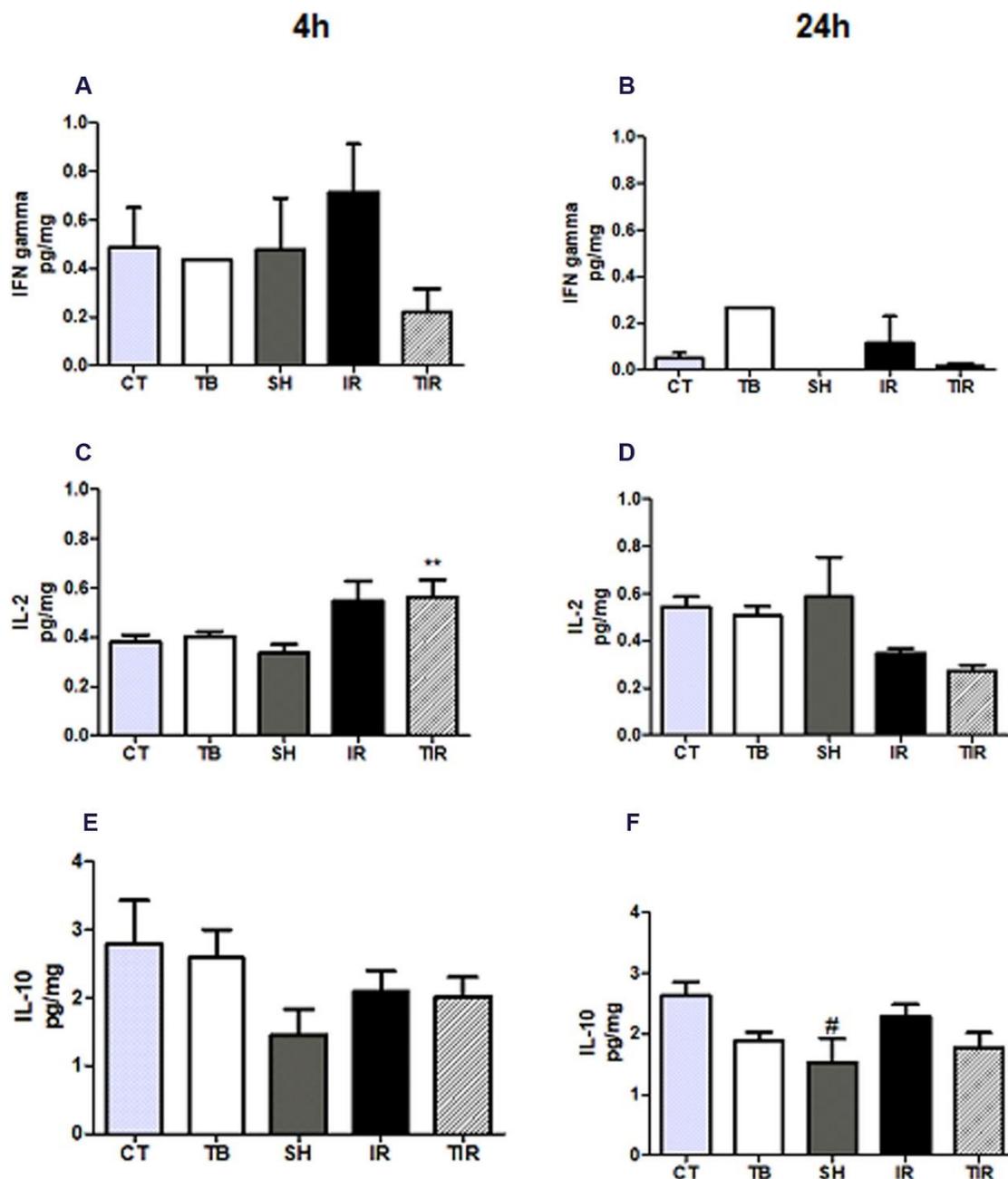
Em 4h podemos ver que os grupos IR e TIR, apresentaram valores equivalentes para IL-2 no fígado isquêmico. Sendo que o grupo TIR apresentou valor significativo para (\*\*) $P < 0,05$  v.s. grupo SH. O grupo TB que foi submetido apenas a tolerância, apresentou valor semelhante ao do grupo CT. Sendo que o grupo SH apresentou o menor valor de IL-2 tecidual (C).

Após 24 os grupos CT e TB se mantiveram equiparados, com discreto aumento, quando comparados aos de 4h. Grupo SH também aumentou a quantidade de IL-2. Em contrapartida grupos IR e TIR ao longo do tempo diminuíram a quantidade de IL-2 presente no fígado isquêmico. Sem valores significantes (D).

Em 4h a IL-10 do grupo CT apresentou o valor mais elevado, assim como o grupo TB, grupo SH expressou o menor valor de IL-10. Grupos IR e TIR apresentaram valores semelhantes de IL-10 no tecido hepático. Sem valores significantes para  $P < 0,05$  (E).

Após 24h os grupos IR e TIR variaram pouco quando comparados aos grupos de 4h. Mantendo-se os grupos IR, SH, e CT estáveis. O grupo SH apresentou valor significativo (#) $P < 0,05$  quando comparado ao grupo CT. Os grupos TB e TIR submetidos a tolerância apresentaram discreta redução de IL-10 no fígado após 24h da reperfusão (F).

**Figura 15** - Citocinas no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h e 24h IFN gama, IL-2 e IL-10



Em 4h o grupo IR apresentou a maior quantidade de IFN gamma no fígado isquêmico. Grupo TIR apresentou a menor quantidade, mantendo-se os grupos CT, TB e SH com valores próximos. Entretanto sem valores significantes (A). Após 24h de reperfusão apresentaram queda nos valores de interferon, os grupos CT, TB, IR e TIR. Não foi possível detectar interferon no grupo SH após reperfusão de 24h (B). Em 4h podemos ver que os grupos IR e TIR, apresentam valores equivalentes para IL-2 no fígado isquêmico. Sendo que o grupo TIR apresentou valor significativo para (\*\*) $P < 0,05$  v.s. o grupo SH. O grupo TB que foi submetido apenas a tolerância, apresentou valor semelhante ao do grupo CT. Grupo SH apresentou o menor valor de IL-2 tecidual (C).

Após 24 os Grupos CT e TB se mantiveram equiparados, com discreto aumento, quando comparados aos de 4h. Grupo SH também aumentou a quantidade IL-2. Em contrapartida grupos TIR e IR diminuíram a quantidade de IL-2 presentes no fígado isquêmico. Sem valores significantes (D). Em 4h a IL-10 do grupo CT apresentou o valor mais elevado, assim como o grupo TB, grupo SH expressou o menor valor de IL-10. Grupos IR e TIR apresentaram valores semelhantes de IL-10 no tecido hepático. Sem valores significantes para  $P < 0,05$  (E). Após 24h os grupos IR e TIR variaram pouco quando comparados aos grupos de 4h. Mantendo-se os grupos IR, SH, e CT estáveis. O grupo SH apresentou valor significativo (#)  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo CT. Os grupos TB e TIR submetidos a tolerância apresentaram discreta redução de IL-10 no tecido isquêmico após 24h da reperfusão (F). n- 7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.9 -Resultados Citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma: TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17A, com 2 tempos de reperfusão 4-24h

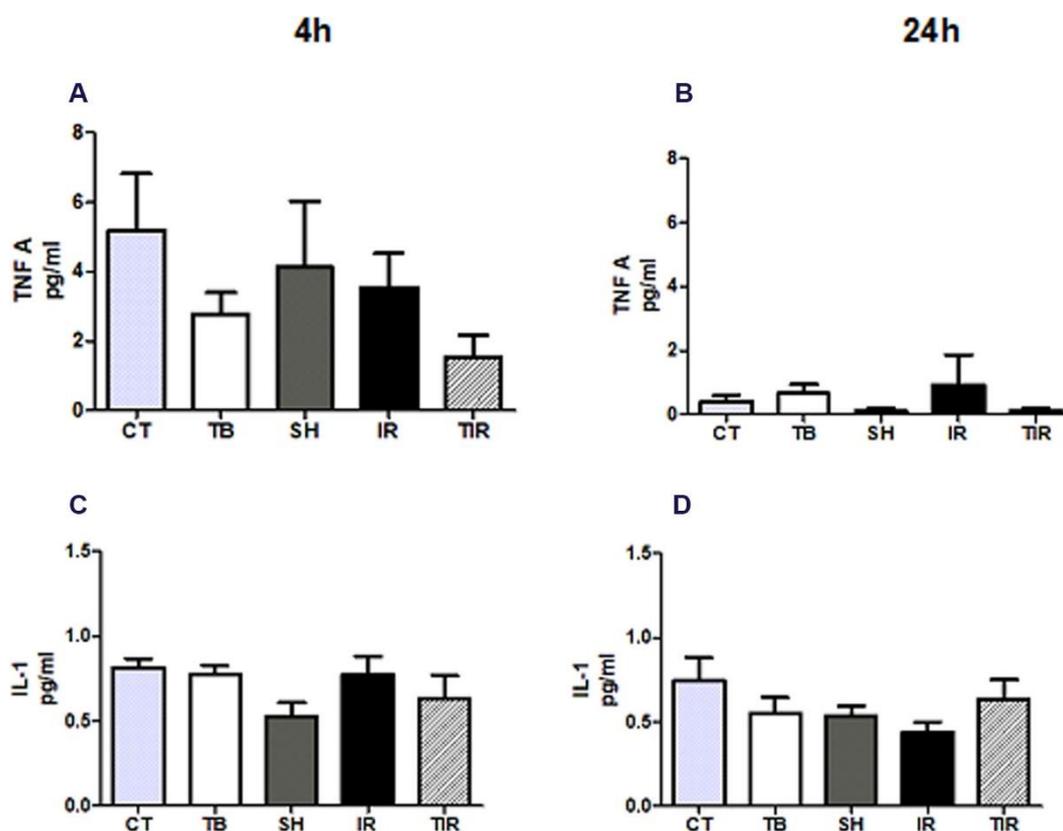
O TNF é um indicador de dano tecidual, possui ação sinérgica com a IL-1 ativando IL-6 fazendo com que os hepatócitos produzam proteínas da fase aguda da inflamação <sup>70,71</sup>. Em 4h o grupo CT apresentou a maior quantidade de TNF circulante, quando comparado aos demais grupos. Por outro lado, os grupos TB e TIR submetidos a tolerância, apresentaram as menores quantidades de TNF no plasma. Entretanto não houve valor significativo(A).

Após 24h de reperfusão, não foi possível detectar grandes variações, o valor de todos os grupos apresentou diminuição considerável, mantendo-se abaixo de 2pg/ml, também sem valores significantes(B).

Nossos achados para IL-1 mostraram que em 4h apresentaram valores parecidos entre os grupos CT,TB e IR mantendo-se próximo a 0,8 pg/ml enquanto os grupos SH e TIR apresentaram valores um pouco menor para a presença de IL-1 circulante. Sem valor significativo (C).

Após 24h da reperfusão os grupos CT e TIR apresentaram estabilidade v.s. CT e TIR 4h, não aumentaram e nem diminuíram. Grupos TB e SH diminuíram, ficando próximos a 0,5 pg/ml. Enquanto o grupo IR apresentou discreta redução de IL-1 quando comparado ao grupo IR de 4h. Sem valor significativo (D). Talvez um indicativo de que não houve uma expressão considerável para IL-1 no nosso modelo, não sendo tão lesivo (figura 16).

**Figura 16** - Citocinas pró-inflamatórias circulantes no plasma em dois tempos de reperfusão 4h e 24h TNF alpha e IL-1



Em 4h o grupo CT apresentou a maior quantidade de TNF circulante, quando comparado aos demais grupos. Mantendo-se os grupos TB e TIR submetidos a tolerância, com as menores quantidades de TNF no plasma, não houve valor significativo (A). Após 24h de reperfusão, o valor de todos os grupos apresentou diminuição considerável, mantendo-se abaixo de 2pg/ml, também sem valores significantes (B). A IL-1 em 4h apresentou valores parecidos entre os grupos CT, TB e IR mantendo-se próximo a 1,0 pg/ml enquanto os grupos SH e TIR apresentaram valores um pouco menor para a presença de IL-1 circulante. Sem valor significativo (C). Em 24 os grupos SH e TIR apresentaram estabilidade v.s. SH e TIR 4h, não aumentaram e nem diminuíram. Grupos CT, TB e IR diminuíram ficando próximos a 0,5 pg/ml. Sem valor significativo (D). n- 7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

A interleucina 6 pode ser ativada pelo LPS, é uma citocina pró-inflamatória mediadora de fase aguda na inflamação. A quantidade de IL-6 circulante em 4h foi 10x maior v.s. a quantidade de IL-6 após 24h como pode ser observado na escala, o que faz sentido, visto que é uma proteína de fase aguda.

Em 4h de reperfusão os grupos TB e CT apresentaram valores baixos para IL-6, um ótimo sinal, considerando que são grupos basais. Os grupos submetidos a procedimentos como SH e TIR apresentaram valores próximos entre 2400-2300pg/ml respectivamente. Enquanto grupo IR apresentou em torno 3000 pg/ml de IL-6 circulante. Indicando que houve mais expressão de IL-6 nesse grupo. Apresentando talvez maior potencial para inflamação sistêmica. Grupos SH, IR e TIR apresentaram valores significantes para  $P < 0,05$  v.s. grupo TB e o grupo CT (A).

Após 24 de reperfusão os valores de todos os grupos caem bastante, mantendo-se abaixo de 100 pg/ml os grupos TB, IR e TIR. Enquanto os valores dos grupos CT e SH apresentaram valores próximos a 150 pg/ml. Sem valor significante (B).

As principais fontes de IL-17A são as células TH17, produzida também por Células T CD4+, e macrófagos. Nos nossos resultados a IL-17A apresentou aumento expressivo quando comparamos 4h v.s. 24h.

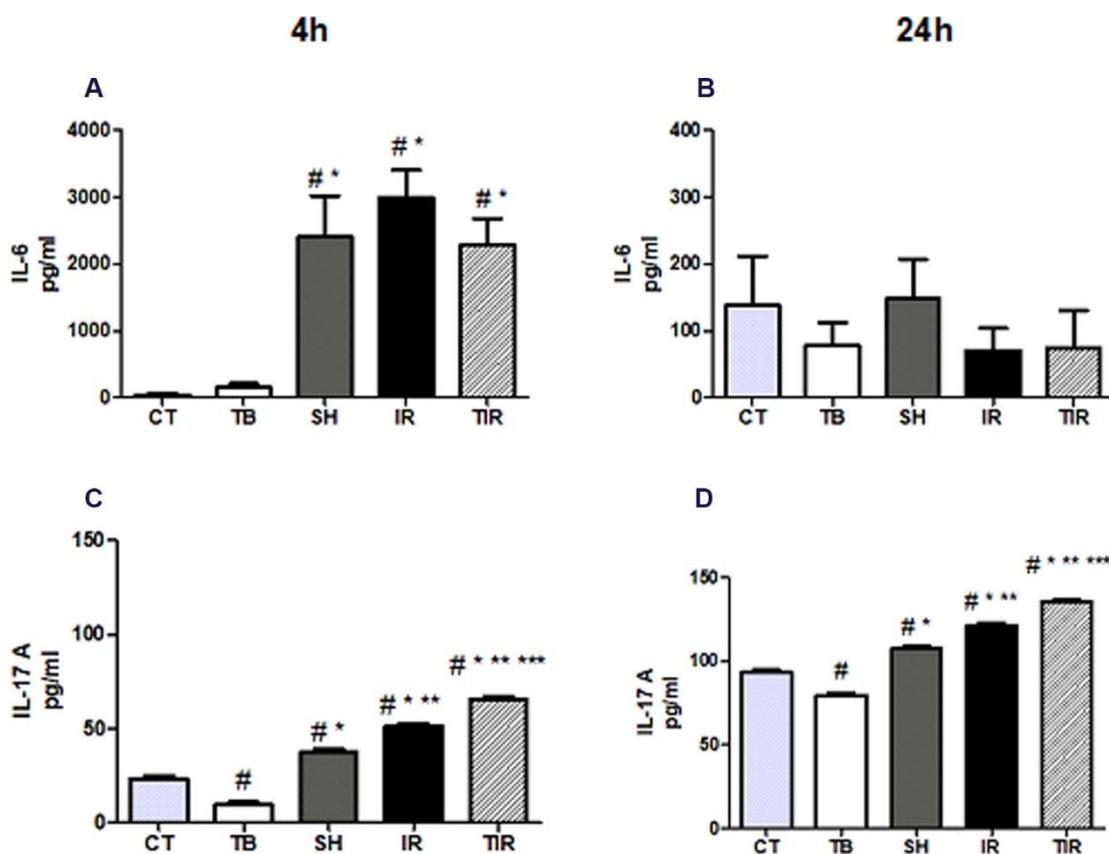
Em 4h o grupo TB apresentou o menor valor de IL-17A circulante, grupo CT apresentou valor próximo 25 pg/ml com  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo TB. Valores coerentes visto que são grupos de referência basal. Grupo SH apresentou valor próximo 40 pg/ml com  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo CT e TB. Grupo IR apresentou valor próximo à 50 pg/ml com  $P < 0,05$  v.s. grupos CT, TB e SH. O grupo TIR apresentou o maior valor de IL-17A com valores significantes para os 4 grupos com  $P < 0,05$  (C).

Talvez os resultados elevados da IL-17A dos grupos IR e TIR, possam ser um indicativo de marcador de lesão da isquemia e reperfusão hepática, corroborando com a literatura.

Após 24h de reperfusão a quantidade da IL-17 aumenta em todos os grupos, aparentemente seguindo o mesmo padrão mostrado em 4h, o TB apresentou o menor valor, quando comparado aos demais grupos, e o grupo TIR o maior valor. O que nos chama atenção para o fato de que, a tolerância sozinha não eleva a expressão de IL-17A circulante, mas quando submetido a I/R hepática ela aparece aumentada, como podemos averiguar nos resultados do grupo TIR.

Grupos TB e CT apresentaram valores entre 50-100 pg/ml com  $P < 0,05$  vs grupo CT. Enquanto grupos IR, SH e TIR apresentaram valores acima de 100 pg/ml valores significantes com  $P < 0,05$  versus grupos TB e CT,  $P < 0,05$  v.s. grupos TB, CT e SH, o grupo TIR apresentou valores significantes  $P < 0,05$  quando comparado aos grupos TB, CT, SH e IR (D). Conforme apresentado na (figura 17).

**Figura 17** - Citocinas pró-inflamatórias plasmáticas em dois tempos de reperfusão 4h e 24h IL-6 e IL-17 alpha



A quantidade de IL-6 circulante em 4h foi 10x maior vs a quantidade de IL-6 após 24h, como pode ser observado na escala. Em 4h de reperfusão os grupos CT e TB apresentaram valores baixos para IL-6, os grupos SH e TIR apresentaram valores próximos entre 2400-2300 pg/ml respectivamente. Enquanto grupo IR apresentou em torno 3000 pg/ml de IL-6 circulante. Grupos SH, IR e TIR apresentaram valores significantes para (#)  $P < 0,05$  vs grupo CT, e (\*)  $P < 0,05$  vs grupo TB (A). Após 24 de reperfusão os valores de todos os grupos caem bastante, mantendo-se abaixo de 100 pg/ml os grupos TB, IR e TIR. Enquanto os valores dos grupos CT e SH apresentaram valores próximos à 120 pg/ml. Sem valor significativo (B). A IL-17 alpha apresentou aumento expressivo quando comparamos 4h vs 24h. Em 4h o grupo TB apresentou o menor valor de IL-17 alpha circulante, grupo TB apresentou valor próximo 25 pg/ml com (#)  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo CT. Grupo SH apresentou valor próximo 40 pg/ml com (# \*)  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo CT e TB. Grupo IR apresentou valor próximo à 50 pg/ml com (# \*\*\*)  $P < 0,05$  vs grupos CT, TB e SH. O grupo TIR apresentou o maior valor de IL-17 A com valores significantes para os 4 grupos (# \*\*\*)  $P < 0,05$  (C). Após 24h de reperfusão a circulação da IL-17 aumenta em todos os grupos, aparentemente seguindo o mesmo padrão mostrado em 4h, o TB apresentou o menor valor quando comparado aos demais grupos e o grupo TIR o maior valor. Grupos CT e TB apresentaram valores entre 50-100 pg/ml com (#)  $P < 0,05$  vs Grupo CT. Enquanto grupos SH, IR e TIR apresentaram valores acima de 100 pg/ml valores significantes com (# \*)  $P < 0,05$  vs grupos CT e TB, (# \*\*\*)  $P < 0,05$  v.s. grupos CT, TB e

SH, o grupo TIR apresentou valores significantes ( # \* \*\* \*\*\*)  $P < 0,05$  v.s. CT, TB, SH e IR (D). n- 7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.10- Resultados Citocinas modulatórias e anti-inflamatórias circulantes no plasma com 2 tempos de reperfusão 4-24h, IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10

Interferon  $\gamma$  é uma citocina que atua contra patógenos intracelulares. Partindo desse princípio, foi observado em nosso estudo que, em 4h IFN $\gamma$  apresentou valores baixos, ficando todos os grupos estudados abaixo de 0,6 pg/ml. Apresentando o menor valor o grupo SH e o valor mais elevado o grupo TIR.

Após 24h de reperfusão não foi possível detectar os valores dos grupos CT, SH e IR. Mantendo-se os grupos TB e TIR, submetidos a tolerância, próximos à 0.2 pg/ml de IFN  $\gamma$ . Sugerindo talvez a estimulação imunológica do IFN  $\gamma$  pela tolerância. Não obtivemos valores significantes para  $P < 0,05$  (B).

A interleucina 2 é uma citocina de modulação da resposta inflamatória, produzida por linfócito T em resposta ao reconhecimento de antígenos. Uma de suas principais funções consiste em ser fator de crescimento para linfócitos.

A IL-2 favorece a proliferação e diferenciação de linfócito B e células natural killer (NK). Os grupos TB e TIR submetidos a tolerância, em 4h de reperfusão apresentaram maior quantidade de IL-2 circulante, quando comparados aos grupos CT, SH e IR.

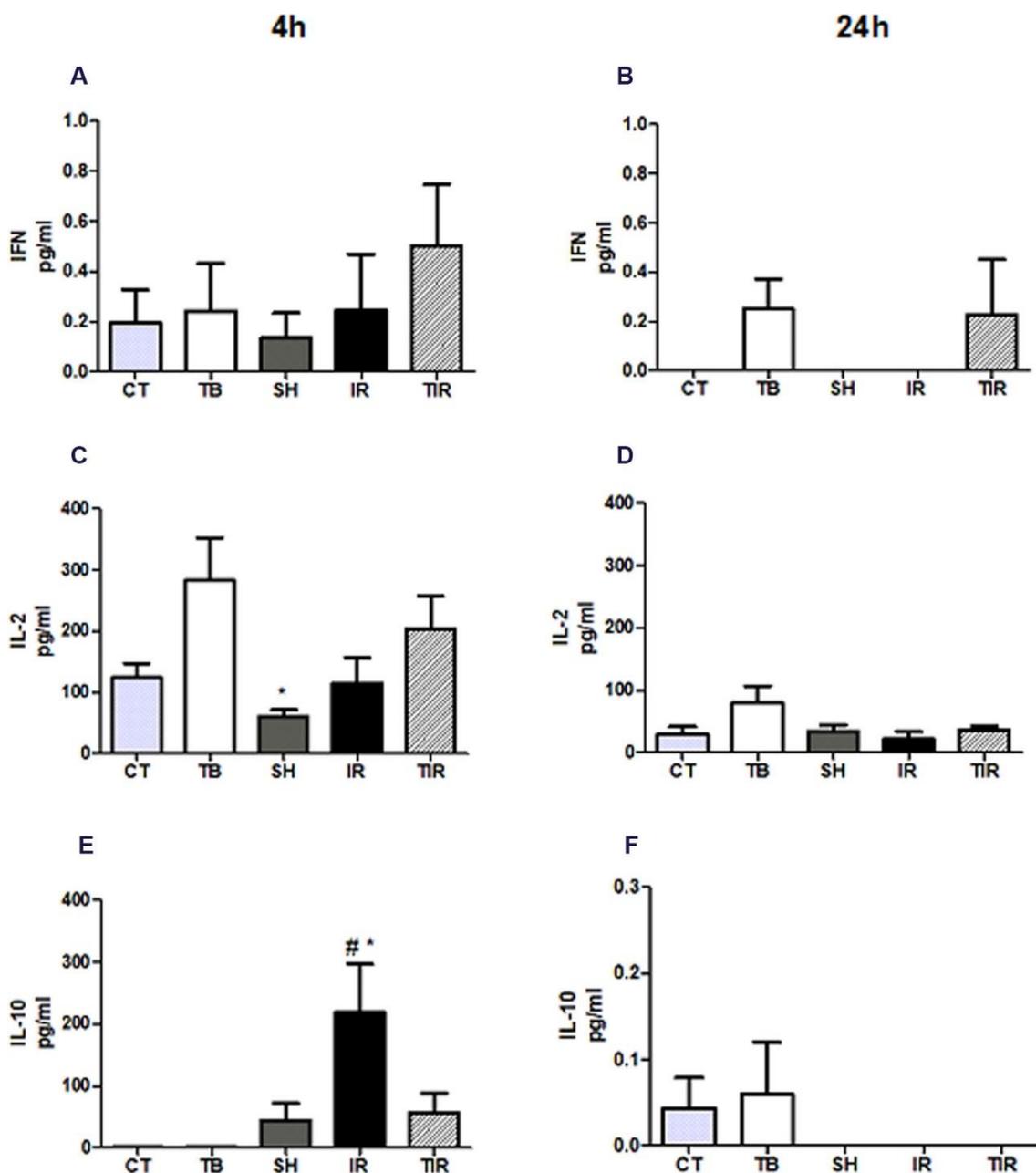
Os grupos IR e SH apresentaram valores próximos a 100 pg/ml, grupo SH com valor significativo  $P < 0,05$  v.s. grupo TB. Grupo TIR apresentou valor próximo de 200 pg/ml. Sem valor significativo (C).

Após 24h todos os valores ficam abaixo de 100pg/ml. Apresentando o menor valor de IL-2 grupo IR, e o maior valor grupo TB, um indicativo de que pode haver alguma relação com a produção de IL-2 ativando linfócitos e a tolerância, tanto em 4h quanto em 24h após a reperfusão (D).

Em nossos resultados de 4h após a reperfusão, a quantidade de IL-10 circulante encontrada, foi maior do que em 24h. O grupo IR apresentou a maior quantidade de IL-10 v.s. os grupos CT, TB, SH e TIR, com valor significativo para  $P < 0,05$  v.s. grupos CT e TB. Grupo TIR apresentou valores semelhantes ao grupo SH, próximo à 50 pg/ml. Um bom resultado do pós-cirúrgico também, visto que ficou com valores próximo ao grupo sham um grupo de referência(E).

Em 24h não foi detectado a presença de IL-10 nos grupos SH, IR e TIR, apenas dos grupos CT e TB, ou seja, nos grupos de referência. Ainda assim valores bem baixos (F). Conforme apresentado na figura 18.

**Figura 18** - Citocinas circulantes no plasma em dois tempos de reperfusão INF g, IL-2 e IL-10



Em 4h IFN gama apresentou valores baixos, ficando todos os grupos estudados abaixo de 0,6 pg/ml. Apresentando o menor valor grupo SH e o valor mais elevado o grupo TIR. Sem valores significantes (A). Após 24h de reperfusão não foi possível detectar os valores dos grupos CT, SH e IR. Mantendo-se os grupos TB e TIR, submetidos a tolerância, próximos à 0.2 pg/ml de IFN gama. Sem valores significantes para  $P < 0,05$  (B). Os grupos TB e TIR submetidos a tolerância, em 4h de reperfusão apresentaram maior quantidade de IL-2 circulante, quando comparados aos grupos CT, SH e IR. Os grupos CT e IR apresentaram valores próximos a 100 pg/ml. O grupo SH apresentou valor significativo (\*)  $P < 0,05$  vs grupo TB. Grupo TIR apresentou valor próximo de 200

pg/ml. Sem valor significativo (C). Após 24h todos os valores ficam abaixo de 100pg/ml. Apresentando o menor valor de IL-2, grupo IR e o maior valor grupo TB (D). Em 4h a quantidade de IL-10 circulante encontrada, foi maior do que em 24h. O grupo IR apresentou a maior quantidade v.s. os grupos CT, TB, SH e TIR. Com valor significativo (#\*)  $P < 0,05$  v.s. grupos CT e TB. Grupo TIR apresentou valores semelhantes ao grupo SH, próximo à 50 pg/ml. Sem valor significativo (E). Em 24h não foi detectado a presença de IL-10 nos grupos SH, IR e TIR, apenas dos grupos CT e TB. Ainda assim concentrações baixas de IL-10 circulante no plasma (F). n- 6-7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.11- Lesão a distância – Inflamação no pulmão

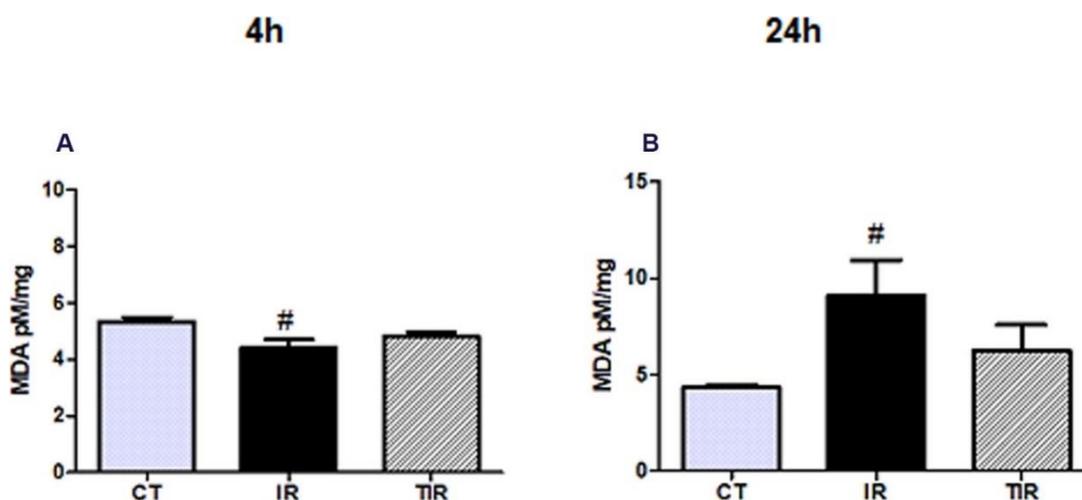
Para a avaliação da ação das espécies reativas de oxigênio, levando ao processo de peroxidação lipídica no órgão a distância e processo inflamatório, foi efetuado a dosagem da concentração de malondialdeído no pulmão.

Após a reperfusão de 4 horas o grupo IR apresentou concentração de malondialdeído no pulmão, com valor significativo para  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. O grupo TIR não apresentou valor significativo quando comparado ao grupo CT (A).

Em 24 horas após o procedimento cirúrgico de isquemia-reperfusão, o grupo IR aumentou a quantidade de MDA, com valor significativo versus o grupo CT. Enquanto o grupo TIR apresentou quantidade menor de MDA no pulmão, quando comparado ao grupo IR (B).

Quando comparado os dois períodos do estudo 4-24 horas, o grupo TIR de 24 horas apresentou discreta elevação versus o grupo TIR de 4 horas, com indicativo de menor variação, enquanto o grupo IR de 24 horas apresentou elevação mais significativa da concentração de malondialdeído no órgão a distância quando comparado ao grupo IR de 4 horas, apresentando nos dois períodos avaliados, valor significativo versus o grupo controle (A-B).

**Figura 19** - Lesão a distância por estresse oxidativo no pulmão – Peroxidação lipídica (MDA-TBARs)



Na averiguação da lesão a distância a concentração de malondialdeído no pulmão, após reperusão de 4 horas foi maior no grupo IR com (#)  $P < 0,05$  significativa quando comparado com o grupo CT. Enquanto o grupo TIR não apresenta valor significativo v.s o grupo CT (A). Após reperusão de 24 horas, o grupo IR aumenta a quantidade de MDA no pulmão com (#)  $P < 0,05$  significativa v.s. o grupo CT. Em 24h grupo TIR apresenta quantidade menor de MDA no pulmão quando comparado ao grupo IR em 24horas (B). Grupo TIR apresenta discreta elevação, enquanto o grupo IR apresenta elevação mais significativa, quando comparado os dois períodos de reperusão (A-B). n- 5-7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

#### 4.12- Lesão a distância inflamação por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática

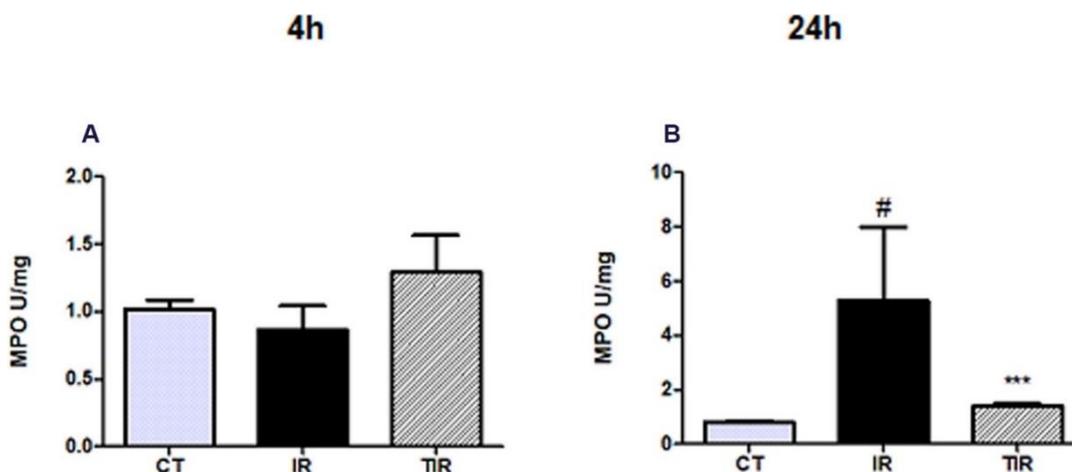
Para avaliação de possível processo inflamatório no pulmão por infiltração neutrofílica, foi executado a análise da concentração da proteína mieloperoxidase (MPO).

Em 4 horas a concentração de mieloperoxidase no pulmão foi menor no grupo IR versus o grupo controle. Os valores do grupo TIR apareceram elevados quando comparado aos grupos IR e CT, sem valor significativo para  $p < 0,05$  (A).

Após 24 horas o grupo IR apresentou o maior valor, com valor significativo para  $p < 0,05$  versus o grupo CT. O grupo TIR em 24 horas apresentou o menor valor de mieloperoxidase com valor significativo para  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo IR (B).

Após o procedimento cirúrgico de isquemia-reperfusão hepática o grupo TIR apresentou estabilidade, se mantendo entre 1 - 1,5 U/mg de mieloperoxidase quando comparamos 4 - 24 horas, em contra partida o grupo IR apresentou elevação em torno de 0,8 - 5,0U/mg (A-B).

**Figura 20** - Lesão a distância por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática



Em 4 horas a concentração de mieloperoxidase no pulmão foi menor no grupo IR quando comparado com o grupo CT, enquanto os valores do grupo TIR foram elevados v.s. IR e grupo CT, sem valor significativo para  $P < 0,05$  (A). Em 24horas o grupo IR apresentou o maior valor, com valor significativo para (#)  $P < 0,05$  v.s. o grupo CT. Em 24h grupo TIR apresentou menor valor de mieloperoxidase com valor significativo para (\*\*\*)  $P < 0,05$  v.s. o grupo IR (B). O grupo TIR apresentou estabilidade se mantendo entre 1 - 1,5 U/mg de mieloperoxidase, em 4 horas e em 24 horas, após o procedimento cirúrgico de I/R hepática (A-B). n- 4-7 por grupo.

Fonte: Desenvolvida pelo autor, 2022.

## 5 DISCUSSÃO

A biologia é o estudo da vida, e ao estudar todos os fenômenos envolvidos neste processo, do micro ao macro, nota-se padrões, organização, e principalmente equilíbrio (homeostasia) em cada processo que mantém a vida. Pode-se dizer que para a manutenção da vida, o equilíbrio do bom funcionamento das moléculas de comunicação no organismo, mantendo a função celular e fisiológica, é estratégia “chave” para a manutenção de um organismo saudável.

A saúde é compreendida quando o funcionamento do corpo mantém esta homeostasia, a nível celular, tecidual e na comunicação entre os sistemas. Quando ocorre por algum motivo, a quebra desta homeostasia dá-se a patologia. Seja por um gatilho externo ou interno (autoimune).

Na busca de respostas relacionadas à perda desta homeostasia, neste estudo analisamos as lesões da I/R no tecido hepático e no plasma de camundongos submetidos ao modelo de tolerância, no intuito de modular esta resposta inflamatória via TLR4. Compreender os mecanismos envolvidos no processo de defesa do nosso organismo à patógenos, é crucial para a busca de respostas e para restaurar o equilíbrio que foi perdido.

Assim como o entendimento em cada etapa deste processo, desde o processo de reconhecimento, recrutamento, englobamento e fagocitose de corpos estranhos, juntamente com a ativação da resposta imune, e da expressão gênica de proteínas mediadoras da inflamação.

Todos estes eventos citados acima, tem sido alvo de muitos estudos experimentais, com modelos animais, ou estudos clínicos. Com o único objetivo, de prevenir as lesões causadas pela isquemia e reperfusão. Como uso de drogas, hipotermia, pré-condicionamento isquêmico que foi introduzido por Murry *et al.*, com clampeamento intermitente do pedículo hepático, com tempos diferentes. (23)

Segundo estudo de Castro e Silva Jr *et al.*, acredita-se que o pré-condicionamento isquêmico promove a proteção das mitocôndrias, evita o intumescimento osmótico mitocondrial e inibe a produção de espécies reativas de oxigênio o que diminui a lipoperoxidação. (24)

Há também estudos de proteção da lesão pulmonar por I/R, com diferentes soluções de prevenção pulmonar, uso de hiper insuflação pulmonar. (62) (63) Uso de vasodilatadores e antioxidantes. (64) (65)

A lesão por I/R está intimamente ligada ao fator tempo, no período de isquemia é observado: a presença de anóxia ou hipóxia, tendo como uma de suas consequências a depleção de ATP, sendo esta, a causadora de edema celular, por quebra do equilíbrio osmótico entre as bombas de sódio e potássio na membrana celular, edemaciando assim a célula, com destruição da membrana e das organelas citoplasmática.

É sabido que em um procedimento cirúrgico deve-se respeitar o prazo máximo da isquemia, não devendo passar de 1:30 a 2:00h, respeitar o fator tempo, é crucial para o sucesso do procedimento e manutenção do fornecimento de oxigênio aos tecidos. Existe um fenômeno chamado não recirculação, do inglês (no-reflow phenomenon) que ocorre durante a reperfusão. Neste fenômeno a obstrução da microcirculação torna a tentativa de reperfusão ineficaz. Há teorias de que possa ser devido ao edema celular que bloqueia a passagem do fluxo sanguíneo, ou talvez pela perda na capacidade de relaxamento do músculo liso, ou até mesmo pela auto regulação inapropriada do fluxo sanguíneo, devido ao decréscimo na demanda metabólica do tecido pós-isquêmico. De fato, um fenômeno ainda pouco compreendido. (5)

No ato da reperfusão, o destaque se dá para a lesão ocasionada pelas espécies reativas de oxigênio, ativada de forma exacerbada causando lesões ao tecido, com resposta inflamatória intensa, conhecida também como lesão por reperfusão. As espécies reativas de oxigênio (EROs), lesionam o endotélio, com potencial enorme em evoluir para formação de trombos, resultando em embolia, com complicações sistêmicas, agravando ainda mais as lesões por I/R. Sendo esta, ainda mais lesiva por agir, no órgão local e nos órgãos à distância, ou seja,

a reperfusão tem potencial maior de lesão, por possuir capacidade de ação sistêmica. (66)

Sendo assim, as lesões se dão em etapas, talvez a resposta para a solução de todas essas lesões, também estejam em ações executadas em cada etapa da gênese de cada lesão. As lesões causadas por I/R são extremamente complexas, sendo assim necessário um conjunto de estratégias de prevenção quanto de mitigação das lesões já estabelecidas, buscando assim um equilíbrio, entre, a ativação da via de apoptose e da via de ativação da necrose.

A compreensão do papel das células T e sua subpopulação, células B, assim como da ativação da célula de Kupffer e ação do sistema complemento com liberação de quimiocinas e citocinas, nesse processo, também são cruciais na busca de respostas, para a mitigação das lesões por I/R hepática. Talvez a resposta possa estar entre o equilíbrio na ativação das vias de necrose e apoptose, modulando a expressão gênica de quimiocinas e citocinas, via linfócitos e fagócitos, buscando à otimização da resposta das células do sistema de defesa, no combate às lesões teciduais e sistêmicas. Assim como, na lesão tecidual, é necessário a otimização das respostas das células de Kupffer e dos macrófagos M1 e M2 no processo de fagocitose e desbridamento de células mortas, para tentar combater os mediadores inflamatórios, com redução do extravasamento do conteúdo citoplasmático de células mortas, impactando diretamente nas células vizinhas, e conseqüentemente reduzindo a morte por necrose.

## 5.1 Resposta Imunológica

A invasão de patógenos no organismo quebrando barreiras naturais de proteção desencadeia a infecção. Os macrófagos sentinelas prontamente detectam as bactérias e a secreção de quimiocinas e citocinas deflagra a resposta inflamatória local para eliminar o agente infeccioso.

Esse processo desencadeia uma série de reações da resposta celular na imunidade inata. No sangue existem células do sistema imune inato e adquirido na forma circulante. Por outro lado, as células do sistema imune encontram-se como aglomerados anatomicamente definidos nos órgãos linfoides, estes órgãos linfoides encontram-se espalhados praticamente em todos os tecidos. A organização anatômica dessas células e sua capacidade de circular e realizar trocas entre o sangue a linfa e os tecidos, é de extrema importância para geração de resposta imunológica protetora, eficaz, contra patógenos. (67)

Essa resposta de defesa, se dá inicialmente de forma mais rápida pela imunidade inata, sendo está uma resposta inespecífica e generalizada. A resposta adaptativa depende dos linfócitos B e T identificarem antígenos do agente invasor nas células apresentadoras. Na sequência há o desenvolvimento de um clone de linfócitos B, que produza anticorpos específicos e em quantidade para combater o invasor, este processo todo demora de 15 a 20 dias para ser atingido.

A resposta adaptativa ou adquirida como também é conhecida, gera uma resposta específica para cada tipo de patógeno, no caso de reinfecção pelo mesmo patógeno há uma resposta mais rápida. Isso a torna extremamente eficiente.

As principais células e tecidos do sistema imunológico que participam dessas importantes funções de reconhecimento, ingestão e destruição de patógenos, através do processo de fagocitose são: neutrófilo – eosinófilo – basófilo e monócito, células circulantes. As células residentes (não circulante) presentes no tecido são: mastócito - macrófago - célula natural killer (NK) e células dendríticas. Os monócitos estão sempre presentes no sangue e podem ser rapidamente transportados para qualquer lugar do corpo. (68)

Os macrófagos são fagócitos que estão presentes constitutivamente nos tecidos, e respondem rapidamente aos micro-organismos que entram nos tecidos. É uma célula muito eficiente, pois após processo de fagocitose, ela não morre, diferente do neutrófilo, que apesar de ter em abundância no organismo em torno de 60-70%, após o processo de fagocitose ele morre. Neutrófilo possui tempo de vida muito curta entre 6 a 8 horas. Porém, ambos possuem papel de grande importância na resposta imune inata. (69)

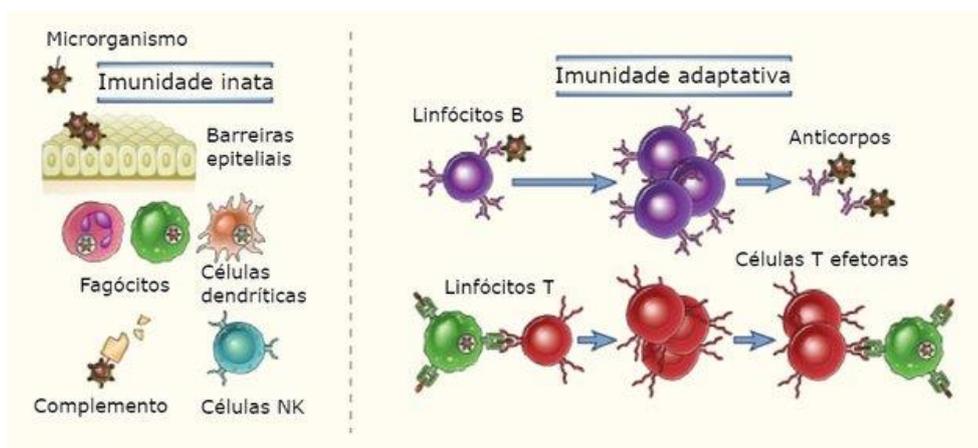
A captura de antígeno e seu transporte para os órgãos linfoides, são as primeiras etapas, da resposta imune adaptativa/ adquirida. Antígenos que são transportados para os órgãos linfoides, são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos, do inglês, antigen presenting cells (APC) para reconhecimento por linfócitos T específicos. Quase todos os tecidos têm células dendríticas que são APCs especializadas em capturar antígenos microbianos, transportá-los aos tecidos linfoides e apresentá-los para o reconhecimento por linfócitos T. Os linfócitos B, os macrófagos como a célula de Kupffer, e a célula dendrítica são APCs.

Essas células através do mecanismo de processamento de antígenos, digerem parcialmente as proteínas, transformando-as em pequenos peptídeos. Esses peptídeos, são ligados às moléculas MHC. O processamento do antígeno, é essencial, para a ativação dos linfócitos T, porque estas células, não reconhecem as moléculas antigênicas nativas. As células T só reconhecem antígenos, quando associados a moléculas MHC II, enquanto as células B reconhecem as moléculas antigênicas (proteínas, pequenos peptídeos, lipídios, polissacarídeos) diretamente sem a necessidade de apresentação. (67)

Os linfócitos T representam 65-75% dos linfócitos no sangue. Originam-se na medula óssea, penetram nos capilares por movimentação amebóide, circulam no corpo através da corrente sanguínea, sofrem processo de maturação no timo. Exceto linfócito B que sofre processo de maturação na medula óssea (MO). O linfócito possui uma subpopulação muito importante para o sistema de defesa, conhecida como: linfócito T helper (LTh), linfócito T de memória (LTm), linfócito T supressor (LTs), linfócito T citotóxico (LTc), linfócito T regulador (Tregs). (9)

O linfócito T citotóxico age diretamente sobre as células alteradas, e infectadas por vírus ou bactérias, produzindo a proteína perforina que provoca lise das células, formando orifícios na membrana celular. O linfócito T supressor inibe a resposta humoral e celular, apressando a resposta imunitária. Quando estimulados os linfócitos T helper e linfócitos supressor são células reguladoras de antígenos, células B e T proliferam, passando por diversos ciclos mitóticos, um processo chamado de expansão clonal (neste processo ocorre a formação das células de memória). O linfócito T helper também estimula a transformação dos linfócitos B em plasmócitos. (9) Pode-se observar a resposta imunológica de defesa contra antígenos e microrganismos na (figura 21).

**Figura 21** - Resposta imunológica de defesa contra antígeno e microrganismos



Resposta imunológica de defesa contra antígeno e microrganismos, primeira linha de defesa barreira (pele) e resposta inata-inespecífica mediada por fagócitos: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, sistema complemento e NK. Segunda linha de defesa imunidade adaptativa/adquirida- específica com produção de anticorpos por linfócito B (Plasmócito), e ativação de linfócitos T pelo antígeno levando a produção de clones das células efetoras combatendo a infecção, conhecido como processo de expansão clonal.

Fonte: ABBAS et al., 2011(67)

## 5.2 Resposta Imunológica - Sistema complemento

O sistema complemento é formado por um conjunto de 30 proteínas inativas circulantes na corrente sanguínea. Compõe a imunidade inata, contudo a via clássica inicia-se com a interação antígeno-anticorpo para ser ativado. O sistema complemento age no combate a patógenos, produção de quimiocinas e no processo de opsonização. (70)

Uma das ações do sistema complemento é a lise osmótica pela produção de poros nas membranas plasmáticas. Conhecido, como complexo de ataque a membrana (MAC). Este processo também pode se dar em membranas de células infectadas por patógenos, potencializando o processo inflamatório. (69)

Esse processo se dá por 3 vias: via clássica, via alternativa e via da lectina.

Na via clássica do complemento há necessidade da interação do anticorpo com o antígeno, imunoglobulina M ou G (IgM, IgG). Dá início ao processo de clivagem com o fragmento C1q, que se liga a fração constante do anticorpo IgM ou IgG. Isso gera a ativação dos fragmentos C1r e C1s, que clivam os fragmentos C2 e C4. (68)

Durante o processo de clivagem os fragmentos C3a e C5a não participam do complexo de ataque à membrana, mas possuem papel importante no recrutamento de células com a liberação de quimiocinas circulantes. Agindo no plasma, liberam anafilotoxinas e quimiocinas, que atraem mastócitos e basófilos para o local da inflamação, ocorre também, a liberação de histamina que possui ação vasodilatadora, facilitando o processo de diapedese. (68)

Na via alternativa do complemento não há necessidade de interação do anticorpo com o antígeno, o processo ocorre direto. Tendo início o processo de clivagem com o fragmento C3, diferença esta, que a distingue da via clássica, que inicia com o fragmento C1q.

Nesta via o fator B é clivado pelo fator D em Bb e Ba. Ba é descartado, enquanto o fator Bb fica associado com o C3b, formando C3bBb=C3 convertase da via alternativa. Mais um C3 se associa, formando C3bBbC3b= C5 convertase

da via alternativa. O processo se repete, formando sequencialmente os fatores C5b, C6, C7, C8 finalizando no C9, onde ocorre o término do processo de clivagem e conseqüentemente a formação de um poro na membrana plasmática. Na via das lectinas do complemento não há necessidade de interação com o anticorpo, esta via está relacionada com os receptores de reconhecimento de padrões. O processo é iniciado pela ligação da lectina ligadora de manose na própria manose, que se encontra na superfície de fungos e bactérias. O restante é semelhante à via clássica (cliva C2 e C4).(71) A manose é um açúcar, que se encontra na superfície das membranas de fungos e bactérias. A lectina ligadora de manose é uma proteína complemento, que se liga a manose, ativando a via, clivando C2 e C4.(71)

Compreender os mecanismos envolvidos no processo de defesa do nosso organismo à patógenos, é crucial para a busca de respostas e para restaurar o equilíbrio que foi perdido, assim como o entendimento e compreensão em cada etapa do processo de reconhecimento, recrutamento, englobamento e fagocitose de corpos estranhos, juntamente com a ativação da resposta imune, e da expressão gênica de proteínas mediadoras da inflamação. Na busca de resposta para diminuição das lesões causadas pela isquemia-reperusão.

### 5.3 Observações clínicas: pós-cirúrgico

Ao comparar os dois grupos, foi observado que, IR e TIR apresentaram diferenças no tempo de declínio e febre. Conforme apresentado na figura 7 dos resultados.

Existem estudos que mostram que as citocinas IL-1B, IL-6 e TNF $\alpha$ , são consideradas importantes mediadoras endógenas, na febre, induzida por polissacarídeo. Possuindo papel importante nos quadros febris. (72)

Entretanto, segundo Roth *et al.*, 2009, apontou que há vários estudos, demonstrando que as respostas febris, estão relacionadas com a ação central de prostaglandinas (PGs). Em especial a PGE2, considerada uma mediadora final da febre. (73)

A PGE2 pode ser sintetizada localmente ou ser transportada através do sangue para o hipotálamo. A PGE2 inibe os neurônios sensíveis ao calor, e, ativa os neurônios sensíveis ao frio. Resultando em respostas de retenção e gênese de calor. (74)

Há estudos que indicam, que, quando o LPS tem contato com o fígado, as células de Kupffer ligam-se a ele, induzindo assim a ativação da cascata de complemento. Neste processo de ativação, é produzido o fator complemento C5a. O fator C5a ativa as células de Kupffer, que por sua vez, libera prostaglandina E2 (PGE2), causando a febre. (75) No estudo LI *et al.*, 2006, as células de Kupffer localizadas no fígado, aparentemente possuem papel importante na febre induzida por LPS, visto que, animais que apresentam redução das células de Kupffer, não apresentam resposta febril característica.

Outro estudo que apresentou resultados interessantes, foi o estudo do Gomes, com ratos Wistar, que em 2017 avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, durante o período de febre, em resposta a influência dos seguintes fármacos: dipirona, ibuprofeno, celecoxibe e n-acetilcisteína. O estudo apontou que durante o período de febre há aumento importante da biodisponibilidade de NO, e que o pré-tratamento apenas com a dipirona, promoveu a redução dessa biodisponibilidade. (76)

Comparando este estudo ao nosso estudo, o grupo que foi submetido a tolerância apresentou pelo erizado sugerindo “quadro de febre” nas primeiras 24h do pós-cirúrgico. Enquanto, o grupo IR apenas submetido a isquemia e reperfusão, apresentou, quadro sugestivo de “febre” entre 48h-72h, após o procedimento cirúrgico, sugerindo talvez, tempos diferentes da ação das espécies reativas de nitrogênio ou de oxigênio, quando comparamos o grupo TIR versus o grupo IR.

Outra hipótese também, é da ação do fator C5a, ativando as células de Kupffer, liberando prostaglandina E2 (PGE2) ocasionando assim, o processo de febre ativado pelo LPS.

#### 5.4 Enzimas hepáticas: ALT/ AST 4-24 horas

AST e ALT são enzimas também conhecidas como transaminases (TGO/TGP) possuem a função da transferência do agrupamento Amino de um Alfa-aminoácido para um Alfa Cetoácido. A detecção de níveis elevados no plasma é um indicador de dano hepático. As enzimas AST e ALT são ferramentas importante para auxiliar na investigação dos danos hepáticos, são medidas de forma indireta. Mede-se por sua atividade catalítica e não por sua concentração molar ou massa total. Avalia-se as duas juntas, o aumento de AST é comum na fase aguda, e de ALT na fase crônica. A Alanina aminotransferase é hepato-específica devido sua grande atividade no citoplasma dos hepatócitos.

Ambas as enzimas são encontradas no citosol, sendo AST também encontrada nas mitocôndrias. A sensibilidade e especificidade de ALT e AST é variável, dependendo da patologia. O estudo de Gonzalez 2003, indicou que congestão hepática e esteatose podem causar discreto aumento de ALT, enquanto os aumentos de AST são observados em quadros de cirrose, hepatite tóxica, fígado gorduroso, hemólise e obstrução biliar. (77) (78)

Após ser liberada do fígado AST possui uma meia vida plasmática de 5 horas, com pico em torno de 24 horas após a agressão. ALT possui meia vida plasmática de 10 horas após agressão. As atividades das transaminases são mais altas no período da tarde do que no início da manhã. (79)

ALT pode ser encontrada no coração, rins, músculo esquelético, e mais abundantemente encontrada no citosol de hepatócitos, praticamente uma enzima hepato-específica. As alterações nas membranas celulares, causam aumento de permeabilidade e conseqüente extravasamento, aumentando a quantidade de ALT circulante. Sabe-se que ALT tem uma meia vida plasmática em torno de 10 horas, longa se comparado a AST que tem meia vida de 5 horas. Ao longo do dia, a atividade de ALT varia entre 10% e 30%. A variação diurna é significativa, no período da tarde, esta atividade pode ser 45% mais alta do que no período da manhã. (80) (81) (82)

Foi observado que os grupos CT e TB apresentaram valores enzimáticos equivalentes a zero, tanto em 4h quanto em 24h. Entretanto o grupo SH que

passou pelo procedimento de laparotomia e sutura apresentou uma discreta elevação da atividade enzimática quando comparado ao grupo CT e ao grupo TB nas análises de 4h. Contudo, após 24h da reperfusão as enzimas do grupo SH não foram mais detectáveis.

Notou-se também que os grupos que passaram por cirurgia como IR e TIR, apresentaram aumento dos valores enzimáticos significantes na reperfusão de 4 horas quando comparados ao grupo CT. O grupo TIR apresentou valores séricos próximos do valor basal quando comparado ao grupo IR para Alanina aminotransferase. Para Aspartato aminotransferase os valores enzimáticos do grupo TIR apareceram elevados em 4h e 24h de reperfusão quando comparado ao grupo IR.

Ambas as enzimas são encontradas no citosol, sendo AST também encontrada nas mitocôndrias. Quando há um aumento expressivo de sua atividade sérica é um forte indício de hemólise, degeneração muscular ou danos hepáticos mitocondriais, que pode ter presença ou ausência de necrose hepática. Não necessariamente todo dano causará morte celular. Uma hipótese para explicar este aumento de atividade enzimática de AST em comparação ao grupo IR seria a quantidade de congestão sinusoidal encontrada e conseqüentemente processo de hemólise, pode ter sido também por ação de lesões pela aplicação do anestésico ou por lesão mitocondrial. Sabe-se que a aplicação de injeção por via intramuscular pode causar irritação tecidual no músculo suficiente para elevar a concentração de CK, AST ou LDH no sangue. Segundo Gonzalez 2003, os aumentos de AST podem ser observados em hepatite infecciosa tóxica, cirrose, fígado gorduroso, obstrução biliar, hemólise, deficiência de selênio/vitamina E, no exercício intenso e em lesões musculares.

(77)

No nosso trabalho foi observado que tanto ALT quanto AST tendem a diminuir a atividade enzimática ao longo do tempo. Mantendo-se os valores de ALT acima de AST quando comparados. O que nos sugere danos relacionados a processo inflamatório.

Ao considerar o intervalo entre 4-24 horas nas figuras A e B , nota-se que o grupo tolerante mostrou variação menor da atividade enzimática para ALT, quando comparado ao grupo IR que apresentou maior variação. Caindo praticamente pela metade após 24 horas de reperfusão.

Enquanto as figuras C e D nos mostrou que a queda da atividade enzimática é bem mais expressiva em AST quando comparamos 4 horas versus 24 horas, tanto para tolerantes quanto para animais submetidos apenas a isquemia e reperfusão.

Os nossos resultados em 4 horas, apresentados nas figuras A e C, indicaram que a tolerância auxilia na diminuição da atividade enzimática da Alanina aminotransferase, mas para Aspartato aminotransferase a atividade enzimática aumenta.

### 5.5 Análise do índice total das lesões hepáticas encontradas no pós-cirúrgico de I/R hepática submetido a tolerância em Balb-c

Analizamos os dois lobos hepático para averiguação de lesões da massa hepática, que continuou em perfusão e da parte da massa hepática que foi submetida a I/R. As lesões nos sugerem que, para a lesão tecidual, a tolerância apresentou menos lesões no pós-cirúrgico, do que o grupo IR após 4 horas da reperfusão. O lobo que continuou em perfusão o (fígado não isquêmico) em 4h após a reperfusão os cinco grupos avaliados se mantiveram entre o grau 1-mínimo e 2-moderado para as lesões, grupos SH e TIR apresentaram valores semelhantes. No fígado isquêmico após 24h de reperfusão as lesões de todos os grupos diminuíram. Um indicativo de que a lesão maior se deu em 4 horas, com processo de recuperação parcial em 24 horas após a agressão do procedimento cirúrgico de I/R hepática.

A redução das lesões histológicas ao longo do tempo está de acordo com os resultados da atividade enzimática de ALT/AST, pois após 24h as lesões também diminuíram.

Não pudemos deixar de observar que os grupos TB, SH e TIR apresentaram poucas lesões nos achados histológicos após 24 horas, enquanto os grupos CT e IR mantiveram o padrão encontrado em 4 horas, sugerindo uma estabilidade dentro dos dois períodos analisados, sem muitas mudanças.

Em síntese, tanto o lobo isquemiado quanto o lobo não isquemiado, apresentaram lesões teciduais causadas pela isquemia e reperfusão hepática, neste modelo experimental. Em especial, os resultados após 4 horas de reperfusão, que demonstraram a redução das lesões teciduais do grau moderado para o grupo submetido a tolerância com I/R, enquanto o grupo submetido apenas a I/R, apresentou lesões no grau intenso, com valor significativo para  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle. Considerado por nós um bom indicativo, na busca de soluções para reduzir as lesões causadas pela isquemia e reperfusão.

## 5.6 Achados histológicos no pós-cirúrgico de I/R hepática em 4 horas

Foram considerados nestes resultados os grupos CT, IR e TIR, pois apresentaram maior quantidade de lesões.

Dos cinco parâmetros avaliados, os grupos IR e TIR apresentaram maior número de lâminas com congestão sinusoidal de moderada a intensa, nas zonas periportal, médio-zonal e centrolobular. Sendo a zona centrolobular mais recorrente para as lesões de necrose e congestão sinusoidal para ambos os grupos.

Os grupos SH e TIR apresentaram maior quantidade de Kupffer hemofagocitando, e esteatose microgoticular, corroborando com os resultados da avaliação pontual por parâmetro, como apresentado na tabela 4.

Não foi observado grandes quantidades de infiltrado neutrofílico nos grupos estudados. Foi encontrado pequena quantidade de infiltrado neutrofílico apenas nos grupos IR e TIR após 24 horas de reperfusão.

Foram encontrados mais achados histológicos no período de quatro horas após a reperfusão do que em 24 horas para a lesão local. Corroborando com os resultados da atividade enzimática de AST e ALT, e da avaliação das citocinas no plasma, assim como, no resultado da peroxidação lipídica no fígado isquêmico, que também se mostraram mais ativos neste período. Sugerindo que nosso horário chave para este estudo, foi o de 4 horas para estas análises. Não conseguindo visualizar muitos achados após 24 horas na avaliação da lesão local, um indicativo de possível atividade do processo de recuperação do fígado dentro deste período.

### 5.7 Grau de acometimento da lesão pontual da I/R hepática no fígado isquêmico análise por parâmetro

Após 4h de reperfusão os resultados pontuais do presente estudo revelaram danos característicos da I/R hepática.

Grupo CT apresentou no lobo lateral esquerdo: pequena quantidade de necrose nas zonas I periportal e II médio-zonal, valor não significante quando comparado aos grupos IR e TIR. Para lobo caudado o dano foi ausente.

Os danos dos 5 parâmetros foram ausentes para o grupo TB. Enquanto grupo SH apresentou pequena quantidade de necrose na zona I periportal.

Grupo IR apresentou no lobo lateral esquerdo: necrose e congestão sinusoidal entre 1-25% na zona II médio-zonal e na zona III centrolobular. O que pode levar a morte celular por infarto hemorrágico devido ao excesso de hemácias. Lobo caudado não apresentou necrose ou congestão após 4 horas de reperfusão. Foi observado no grupo IR a presença de infiltrado neutrofilico, assim como de esteatose microgoticular em maior quantidade e de esteatose macrogoticular em menor quantidade. Fenômeno este que segundo a literatura é um indicativo de fase inicial de lesões causadas pela reperfusão, o que explicaria esses achados apenas nos grupos de 4 horas.

Na comparação deste resultado com o resultado do Aspartato para o grupo tolerante, vemos uma relação entre a congestão sinusoidal por hemáceas e o aumento da concentração do AST no plasma, sugerindo uma ativação desta enzima pelo processo de hemólise, lesão mitocondrial ou da esteatose.

Grupo TIR apresentou no lobo lateral esquerdo: necrose e congestão sinusoidal nas zonas I periportal e II médio-zonal, mas em menor quantidade, quando comparado ao grupo IR. Notou-se também que o número de Kupffer hemofagocitando no espaço sinusoidal foi maior neste grupo. Assim como no grupo SH e no grupo TB. Um indicativo talvez de que, a tolerância possa estar de alguma forma relacionada com a ativação das células de Kupffer na resposta imunológica e tecidual no combate ou prevenção das lesões geradas pela

isquemia e reperfusão. Tendo este grupo talvez, uma participação maior de macrófagos ativos no espaço sinusoidal em resposta a esta agressão.

Outro ponto interessante observado, foi a presença do infiltrado neutrofílico apenas nos grupos submetidos à I/R, um indicativo de que possa ter ocorrido ativação das células de Kupffer, recrutando neutrófilos para o local da lesão. Estas observações quando comparadas ao resultado das citocinas circulantes, nos indica que também possa ter ocorrido alguma relação entre ativação das células de Kupffer e a citocina IL-17 A.

Segundo Kono *et al.*, 2011, as principais fontes de IL-17 A, são as células TH17, produzida também por Células T CD4+, e macrófagos. Esta citocina é reguladora chave no início da resposta inflamatória induzida por neutrófilos, fase subaguda após reperfusão. (83)

Nos nossos achados histológicos as lesões encontradas no lobo lateral esquerdo foram maiores do que as lesões encontradas no lobo caudado, após reperfusão de 4 horas. Na reperfusão de 24 horas as lesões não foram mais encontradas na maioria das lâminas analisadas.

Sofreu mais agressão o lobo que passou por processo de isquemia do que o lobo que continuou em perfusão, entretanto, não podemos descartar que o lobo caudado também apresentou lesões, porém, em menor quantidade quando comparado ao lobo lateral esquerdo. A lesão no lobo caudado pode ser explicada pelo hiper fluxo neste lobo, como resposta ao lobo que foi isquemiado. Para este modelo de ensaio também foi observado que as lesões resultantes do procedimento cirúrgico de I/R hepática submetida à tolerância são visíveis em 4 horas, após 24 horas essas lesões teciduais foram pouco encontradas. Tabela 4.

## 5.8 Inflamação local por estresse oxidativo no fígado isquêmico – Peroxidação lipídica (MDA-TBARs)

As lesões por reperfusão estão relacionadas com a formação das espécies reativas de oxigênio, levando a aumento da permeabilidade vascular, ativação de citocinas e do sistema complemento, assim como de neutrófilos lesionando o endotélio. (84)

Sobre a observação da lesão local, notamos que em 4h a concentração de malondialdeído (MDA) no fígado isquêmico foi maior no grupo IR. Sugerindo talvez, maior quantidade de estresse oxidativo por peroxidação lipídica.

Observamos que em 4 horas a concentração de malondialdeído (MDA) no fígado isquêmico, após o procedimento de isquemia-reperfusão foi maior no grupo IR, com valor significativo quando comparado ao grupo controle. Sugerindo maior quantidade de estresse oxidativo neste grupo.

Na comparação dos grupos CT, IR e TIR com 24 horas de reperfusão, o grupo IR reduz, apresentando o valor mais próximo do grupo controle, quando comparado ao grupo TIR em 24 horas.

Nos dois períodos 4 e 24 horas, o grupo CT apresentou estabilidade, se mantendo próximo a 2 nMol/mg. O grupo IR apresentou variações se mantendo entre 6 – 2 nMol/mg, com valor mais expressivo de MDA em 4 horas. Grupo TIR apresentou maior estabilidade do que o grupo IR apresentando valor próximo de 4 nMol/mg, nos dois períodos avaliados, sem valor significativo.

Os resultados apontam que o estresse oxidativo se deu em maior quantidade após a isquemia-reperfusão de 4 horas no grupo submetido apenas a I/R hepática, com evolução para um quadro de recuperação em 24 horas após o procedimento cirúrgico. Aparentemente o tratamento prévio com LPS feito no grupo TIR antes do procedimento de I/R hepática, auxiliou na melhora da resposta por estresse oxidativo, com possível redução da evolução do quadro para processo inflamatório no fígado, apresentando estabilidade na concentração de malondialdeído nos dois períodos avaliados. Sugerindo diminuição da resposta do estresse oxidativo e conseqüentemente da evolução do quadro, para um processo inflamatório no fígado.

Em síntese, para a lesão local nossos achados indicaram que o grupo que passou pelo pré-tratamento com LPS apresentou redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório.

## 5.9 Citocinas

Citocinas e quimiocinas, são proteínas mediadoras da resposta imune que enviam sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios, para diferentes células do sistema imunológico. Quimiocinas atraem células para o local da inflamação, através de estímulo químico denominado quimiotaxia. Esses sinais, servem como um potente canal de comunicação, entre as células do sistema imune.

Possuem ação:

- Autócrina: quando age na própria célula produtora
- Parácrina: quando age em células próximas
- Endócrina: quando age a distância

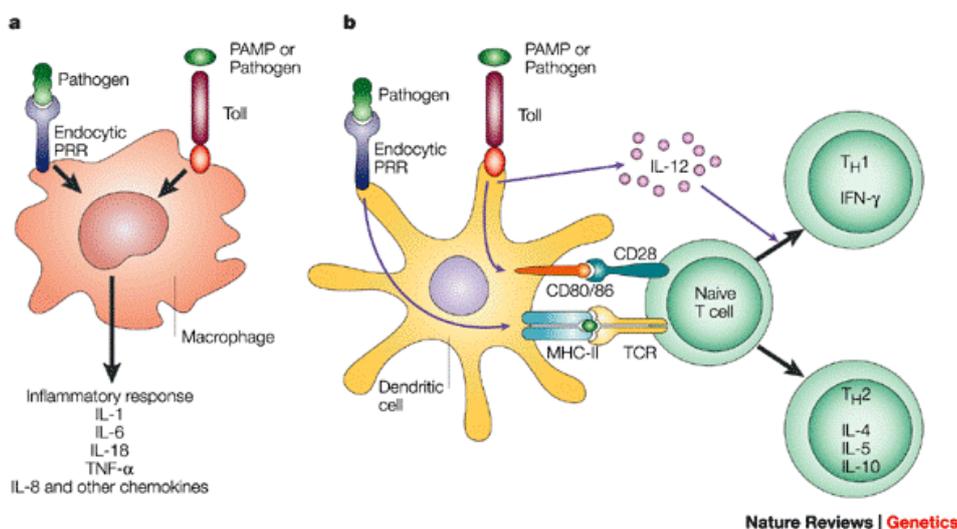
São ativadas após estimulação antigênica e atuam em concentrações baixas. A homeostasia imunológica é mantida devido a uma baixa concentração das citocinas no plasma e pelas ações de contrabalanço entre suas ações.

Existem as citocinas pró-inflamatórias que ativam os mecanismos inflamatórios como por exemplo: IL-1, TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-17 $\alpha$ , IL-14. Assim como, existem citocinas que atuam como imunomoduladoras IL-2, TGF- $\beta$ , e uma ação imunossupressora pelas citocinas IL-13, IL-10 e IL-19, enquanto a IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, com função principal de inibir a síntese de outras citocinas. (85)As citocinas são liberadas pelas células do sistema imune inato e adaptativo, como por exemplo: neutrófilos, fagócitos, macrófagos, linfócito T CD4+, entre outras.

As células Th1, são caracterizadas por expressar o fator de transcrição T-bet, produzindo: TNF  $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Ambas com papel importante na estimulação de fagocitose. Enquanto as células Th2 são caracterizadas por expressarem o fator de transcrição Gata-3, produzindo: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, com papel importante na defesa contra parasitas. (86) O equilíbrio entre Th1 e Th2, é crucial, para uma boa resposta ao processo inflamatório, e para o sucesso no combate eficiente, de corpos estranhos no organismo. Sendo a IL-10 uma citocina anti-inflamatória, importante, por sua ação imunobiológica de regulação do balanço entre Th1 e Th2.

São muitos os processos que ocorrem no combate a invasão de corpos estranhos no organismo, mas, uma informação importante a ser citada, é que assim que o patógeno entra no organismo, ele é reconhecido pela via Toll like, presente na membrana das células, a via TLRs possui padrões de reconhecimento molecular associados a patógenos (PAMPs). Esse reconhecimento, ativa a via TLR4, específica para LPS, desencadeando uma cascata de eventos fisiopatológicos, que em um dos seus processos finais, ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, desencadeando a expressão de citocinas e quimiocinas. Como podemos observar na figura 22.

**Figura 22** - Reconhecimento de antígeno pelo macrófago com liberação de citocinas e apresentação do antígeno pelas células dendríticas ao LT



Em resposta ao processo inflamatório: Macrófagos e neutrófilos executando processo de fagocitose e destruição de microrganismos, com liberação de citocinas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa (a). Células dendríticas (DC) apresentando o antígeno aos linfócitos Th0 (naive), Th1 e Th2 com o auxílio do MHC II (b).

Fonte: Buer,2003 (87)

### Fator de necrose tecidual alpha

Citocina: TNF $\alpha$

Linhagem: LinfócitoTh1 Ativação clássica

Resposta Imune Inata

Produzida: Macrófagos, Monócitos, Células T ativadas CD4+, Células NK

TNF é uma citocina pró-inflamatória que regula múltiplos processos biológicos como: proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação. Produzido por macrófagos e fagócitos ativados por endotoxina. Mas se estimulado por LPS, também pode ser sintetizado por monócitos, neutrófilos, células T e NK.(88) TNF possui ação sinérgica com a IL-1 induzindo a produção de IL-6 fazendo com que os hepatócitos produzam proteínas da fase aguda na inflamação. (89) (90)

É uma citocina pleiotrópica (apresenta efeitos diferentes em locais diferentes do corpo). Inicialmente chamada de caquexina por induzir a perda de peso, resultando em uma aparência de magreza extrema.

Utilizadas como biomarcadores para piora no quadro de Choque séptico quando há diminuição da IL-10 e aumento na expressão de IL-1B, IL-6, TNF Alpha e IFN- $\gamma$ . (91)

### **Interleucina 1**

Citocina: IL-1

Linhagem: Linfócito

Resposta Imune Inata

Produzida: Monócitos, Macrófagos, Linfócitos B e T

IL-1 estimula células CD4+ a secretarem IL-2, estimula a proliferação e ativação de linfócito B, neutrófilos, monócitos e macrófagos aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias.

Estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células endoteliais, aumenta a atividade de coagulação, tendo participação na gênese da coagulação intravascular disseminada. (92) (93)

É ativada pelo LPS e IL-1 também estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda no processo inflamatório.(94)

Em baixa concentração a IL-1 é mediadora da inflamação local, em altas concentrações na circulação, ela apresenta uma ação mais sistêmica, podendo ser lesiva.

## **Interleucina 6**

Citocina: IL-6

Linhagem: Linfócito Th2 Ativação alternativa

Resposta Imune Inata

Produzida por: Monócitos, Células B, Células T

A IL-6 pode ser ativada pelo LPS, é uma citocina pró-inflamatória mediadora de fase aguda na inflamação.

Associada a diabetes mellitus, artrite reumatoide, piora de quadro séptico quando aumentada. Uma citocina chave em sepse grave associada a alto risco de morte. Considerada também fator crítico nos controles dos sistemas imune e hematopoiético. No hepatócito promove a produção de proteínas de fase aguda e o aumento da concentração de zinco. (95) (96) (97) (98)

## **Interferon gama**

Citocina: IFN- $\gamma$

Linhagem: LinfócitoTh1 Ativação clássica

Resposta Imune Adquirida

Produzida por: Linfócitos B, NK, TCD4, TCD8

Interferon gama é uma citocina que atua contra patógenos intracelulares. Na imunidade inata tem maior importância, ativando macrófagos e potencializando sua ação. Na imunidade adquirida estimula a produção de IgG e IgM via linfócito B.

Uma de suas funções é aumentar a via de apresentação do antígeno classe I, dessa forma facilita o reconhecimento de células infectadas pela célula T citotóxica.(99) Relacionado com resposta a infecção e estimulação imunológica. IFN- $\gamma$  é indutor da IL-2 agindo no perfil da resposta imunológica Th2 para Th1. (100)

## **Interleucina 17 Alpha**

Citocina: IL-17 A

Linhagem: Linfócito Th17

Resposta imune adquirida

Produzida por: Células T CD4+ ativadas, Macrófagos, Células endoteliais

A interleucina 17 alfa é uma citocina pró-inflamatória que possui função importante na resposta imune contra bactérias e fungos. Induz a produção de TNF $\alpha$  que recruta monócitos e neutrófilos para o sítio de infecção. As principais fontes de IL-17 A são as células TH17. (101).(102)

Segundo Kono *et al.*, 2011 esta citocina é reguladora chave no início da resposta inflamatória induzindo o recrutamento de neutrófilos. (83)

## **Interleucina 2**

Citocina: IL-2

Linhagem: LinfócitoTh2 Ativação alternativa

Resposta imune adquirida

Produzida: Linfócito T

A interleucina 2 é uma citocina de modulação da resposta inflamatória, produzida por linfócito T em resposta ao reconhecimento de antígenos.

Uma de suas principais funções consiste em ser fator de crescimento para linfócitos. As células apresentadoras de antígeno (APC) ativa o linfócito e executa o processo de expansão clonal das células após o reconhecimento antigênico. Através dos linfócitos TCD4 efetores que combatem a infecção diretamente, e através dos linfócitos TCD4 de memória que tem ação importante para uma resposta mais rápida no caso de reinfecção pelo mesmo patógeno.

A IL-2 favorece a proliferação e diferenciação de linfócito B e células natural killer (NK). Na inflamação crônica atua como regulador humoral. (102)

## **Interleucina 10**

Citocina: IL-10

Linhagem: Linfócito Th2 Ativação alternativa

Resposta Imune Adquirida

Produzida: Linfócitos Th<sub>2</sub>, CD8+ ativadas, Macrófagos, Mastócitos

Interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória. Importante por sua ação imunobiológica de regulação do balanço entre Th1 e Th2. Atua inibindo a formação de outras citocinas. É também promotora da resposta Th2 para inibição da produção de IFN- $\gamma$ .(103)

### 5.10 Citocinas pró-inflamatórias no fígado isquêmico em dois tempos de reperfusão 4h – 24h (TNF alpha, IL-1, IL6 e IL-17 A)

Na busca de compreender melhor, e avaliar as lesões locais (lesões teciduais) ocasionadas por células residentes no fígado, como Kupffer por exemplo, foi executado a avaliação das citocinas pró-inflamatórias : TNF A, IL-1, IL-6 e IL-17 A e citocinas modulatórias e anti-inflamatória: IFN gamma, IL-2 e IL-10, para averiguação da lesão tecidual local, no fígado isquemiado, seguimos o mesmo protocolo de análise, que foi executado no plasma.

Foi observado que tanto em 4 horas quanto em 24h os valores de TNF alpha tecidual foram baixos, indicativo de menor lesão tecidual para este grupo. Em 4 horas o grupo TIR apresentou maior quantidade de TNF alpha com valor significativo quando comparado ao grupo tol basal. Os grupos SH, IR e TIR que foram submetidos a procedimento cirúrgico, apresentaram os valores maiores de fator de necrose tecidual, esperado, visto que todo procedimento cirúrgico leva a algum grau de injúria. Apresentando os menores valores os grupos basais CT e TB. Após 24 horas da reperfusão todos os grupos apresentaram discreta diminuição de TNF, grupo TIR apresentou novamente valor significativo versus o grupo tol basal, que foi submetido apenas ao modelo de tolerância.

Os grupos SH e TIR apresentaram os maiores valores de IL-1 quando comparados aos grupos CT e TB em 4 horas, CT e TB mantiveram valores basais, enquanto grupo IR ficou em torno de 0,2 pg/mg . Em baixa concentração a IL-1 é mediadora da inflamação local, este é um indicativo de que o LPS ativou moderadamente esta interleucina. Assim como a estimulação de hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda no processo inflamatório. (90)

Em 24 horas os grupos CT, TB, SH e IR reduzem a IL-1, o grupo TIR aumenta a concentração de interleucina 1 apresentando valor significativo versus os demais grupos.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, mediadora de fase aguda na inflamação, que pode ser ativada pelo LPS. Quando aumentada é associada a um mal prognóstico na piora de quadro séptico, considerada uma citocina chave em sepse grave associada a alto risco de morte. Considerada também fator crítico nos controles dos sistemas imune e hematopoiético. No hepatócito promove a produção de proteínas de fase aguda e o aumento da concentração de zinco. (95) (96) (97) (98)

No fígado isquêmico do grupo IR a IL-6 apresentou maior valor com valores significantes versus grupos CT, TB e SH. Grupo TIR apresentou valores em torno de 49 pg/mg de IL-6, valor mais baixo quando comparado ao grupo IR com aproximadamente 70 pg/mg em 4 horas de reperfusão. Um bom indicativo de que o grupo tolerante apresentou menor concentração de interleucina 6, com menor potencial de inflamação por lesão de isquemia-reperfusão. Após 24h grupos CT, TB diminuem, assim como os grupos IR e TIR quando comparados aos grupos IR e TIR 4 horas. IR e TIR apresentam valor significativo versus o grupo sham que foi submetido apenas ao procedimento para avaliação do impacto cirúrgico.

No tecido hepático a IL-17 alpha, apresentou valores abaixo de 1,0. O Grupo TIR que foi submetido a tolerância e a isquemia-reperfusão, apresentou o maior valor com valores significantes quando comparado aos grupos CT, TB e SH em 4 horas de reperfusão. Após 24 horas os grupos CT, TB e SH se mantiveram baixos, o grupo IR apresentou discreta diminuição de IL-17-A. O grupo TIR 24h apresentou redução da IL-17 alpha quando comparado ao grupo

TIR 4 horas, caindo para o valor basal, se igualando aos demais grupos de 24 horas.

O que é interessante, pois no tecido a IL-17 A apresentou diminuição ao longo do tempo, mas no plasma, ela apresentou aumento ao longo do tempo. Um indicativo também de que esta citocina possa estar envolvida na lesão local de forma mais modesta, e mais intensa na lesão sistêmica no pós-cirúrgico de I/R hepática.

#### 5.11 Citocinas moduladoras e anti-inflamatórias encontradas no fígado isquêmico

Em 4 horas o grupo IR apresentou a maior quantidade de IFN $\gamma$  no fígado isquêmico. Grupo TIR apresentou a menor quantidade, mantendo-se os grupos CT, TB e SH com valores próximos. Entretanto sem valores significantes. Após 24 horas de reperfusão apresentaram queda nos valores de interferon os grupos CT, TB, IR e TIR. Não foi possível detectar interferon no grupo SH após reperfusão de 24 horas.

A interleucina 2 é uma citocina de modulação da resposta inflamatória, produzida por linfócito T em resposta ao reconhecimento de antígenos. Em 4h podemos observar que os grupos IR e TIR, apresentaram valores equivalentes para IL-2 no fígado isquêmico. Sendo que o grupo TIR apresentou valor significativo quando comparado ao grupo sham. O grupo tolerante basal que foi submetido apenas a tolerância, apresentou valor semelhante ao do grupo CT, enquanto o grupo SH apresentou o menor valor de IL-2 tecidual. Os dois grupos que foram submetidos a isquemia-reperfusão foram os grupos que apresentaram maior concentração de IL-2 no fígado isquêmico.

Após 24 os grupos CT e TB se mantiveram equiparados, com discreto aumento, quando comparados aos grupos de 4 horas. Grupo SH também aumentou a quantidade de IL-2. Em contrapartida grupos IR e TIR diminuíram a quantidade de IL-2 presente no fígado isquêmico, sem valores significantes. Sugerindo que para os grupos IR e TIR a elevação da interleucina-2 se deu no período de 4 horas após a reperfusão, ao longo do tempo ela apresenta redução.

Talvez porque neste período o fígado já se encontre em processo de recuperação.

Na concentração da IL-10 em 4 horas o valor mais elevado foi o do grupo CT, assim como o grupo TB, grupo SH expressou o menor valor de IL-10. A Interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória. Importante por sua ação imunobiológica de regulação do balanço entre Th1 e Th2.

Grupos IR e TIR apresentaram valores semelhantes de IL-10 no tecido hepático, indicativo de que ambos os grupos responderam bem ao procedimento cirúrgico e às injúrias sofridas, sem indicativos de complicações e processo inflamatório expressivo no pós-cirúrgico. Sem valores significantes.

Após 24h os grupos IR e TIR variaram pouco quando comparados aos grupos de 4h mantendo-se os grupos CT, SH e IR estáveis. O grupo SH apresentou valor significativo quando comparado ao grupo CT, o que nos revela que o simples fato de abrir ou fechar, pode causar um impacto na resposta do organismo, como pudemos observar na comparação entre os grupos CT e SH. Os grupos TB e TIR submetidos a tolerância apresentaram discreta redução de IL-10 no combate a lesão local após 24h da reperfusão, a baixa de IL-10 no fígado nos sugere ausência de processo inflamatório expressivo, sem necessidade de expressão significativa da interleucina 10.

## 5.12 Citocinas inflamatórias encontradas no plasma TNF A, IL-1, IL-6 e IL-17 A

A inflamação ocorre como resposta a um estímulo, este estímulo pode ser uma infecção (bactérias/vírus), trauma mecânico, doença autoimune, radiação ou por isquemia, causando lesões, por falta do suprimento sanguíneo adequado aos tecidos, induzindo as células a processo de necrose ou apoptose. É importante citar que enquanto todos esses processos ocorrem de forma equilibrada, é benéfico. Entretanto, quando ocorre desbalanço na fisiologia desses processos, leva a injúrias, e consequência danosa ao organismo.

No nosso desenho de estudo, foi utilizado o modelo de tolerância para induzir uma resposta inflamatória menos intensa no insulto isquêmico. O qual se baseia na ativação da resposta imunológica induzida, por aplicação de baixas doses de LPS, em Balb-C. A tolerância se dá após um período exposto a endotoxina, de maneira que o organismo apresente uma hipo-reatividade do sistema imune. Resposta esta, que foi ativada pelas baixas doses de LPS, que foram aplicadas durante o período de 5 dias. (104)

Alguns estudos apontam que a tolerância é caracterizada pela redução das citocinas pró-inflamatórias e aumento da quantidade ou atividade das citocinas reguladoras, por células T. O estudo da relação entre a tolerância e as células T e sua subpopulação, tem sido muito importante para a melhor compreensão do mecanismo de modulação da resposta imune contra agressões, visto que, essa subpopulação está intimamente ligada a manutenção da homeostase imune e da auto-tolerância. Segundo o estudo de Hesse *et al.*, 2004 a célula T reguladora (Treg) é a principal célula de interesse para prevenir patologias durante quadros de infecções. Durante infecções, as Tregs podem prevenir patologias associadas com excesso da resposta imunológica e aumentar a sobrevivência.(105)

O linfócito T helper 17 (Th17), também é uma célula de grande interesse, para compreensão dessa resposta imunológica. Andrade em 2016 demonstrou em seu estudo que, a redução da mortalidade após a tolerância foi previamente observada, isto pode estar associado com o aumento da população de células T regulatórias e citocinas reguladoras, que podem ser responsáveis pela

imunorregulação da hiper inflamação. Enquanto os linfócitos Th17 podem ser uma das células responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos que tem sido associado com o sucesso da tolerância ao LPS. (106)

Nosso interesse, foi tentar modular a resposta inflamatória nas lesões causadas pela I/R hepática. Para averiguação desta modulação, foi considerado também o fato de que, durante o processo inflamatório, ocorre uma resposta vascular. Como por exemplo: vasoconstrição reflexa, vasodilatação por (histamina/heparina) que propiciam a passagem dos neutrófilos para o tecido, processo conhecido como diapedese. Este que, em desequilíbrio pode levar ao aumento de neutrófilos no tecido hepático, ou seja, infiltrado neutrofílico.

Para compreender melhor, as lesões circulatórias, com potencial de se tornar lesões sistêmicas, como por exemplo no caso das lesões endoteliais, ocasionadas pelas espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, assim como das quimiocinas e citocinas liberadas por neutrófilos e monócitos.

Foi executado a análise das seguintes citocinas inflamatórias TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17A e das citocinas modulatórias e anti-inflamatória: IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-10 circulantes no plasma, com potencial imenso de levar a processo inflamatório sistêmico. Nosso estudo foi analisado a expressão de citocinas circulantes em dois períodos, em 4 horas a lesão pontual, e em 24 horas a lesão tardia, após a reperfusão. Obtendo os seguintes resultados:

Na análise da expressão do fator de necrose tecidual em 4 horas os grupos TB e TIR submetidos a tolerância, apresentaram as menores quantidades de TNF no plasma, o que nos sugere lesão sistêmica menor, quando comparado aos demais grupos.

Nossos achados mostraram que em 4 horas a IL-1 apresentou valores parecidos entre os grupos CT, TB e IR mantendo-se próximo a 1,0 pg/ml enquanto os grupos SH e TIR apresentaram valores um pouco menores para a presença de IL-1 circulante. Sugerindo que o LPS e o procedimento cirúrgico ativaram de forma discreta a expressão de IL-1. Após 24 horas os valores de IL-1 circulante se mantiveram entre 0,5 e 1,0pg/ml para os grupos basais e para o grupo TIR, com discreta redução de IL-1 para o grupo IR. Sem valor significativo

para ambos os horários avaliados. Considerando assim baixo potencial inflamatório induzido por IL-1 .

Na avaliação da interleucina-6 em 4 horas de reperfusão os grupos apresentaram diferenças interessantes nos dois períodos avaliados, em 4 horas a concentração de IL-6 circulante foi dez vezes maior do que a concentração de IL-6 após 24 horas do procedimento de isquemia-reperfusão hepática. Em quatro horas os grupos basais CT e TB apresentaram concentrações baixas de IL-6, os grupos SH submetido apenas a laparotomia, e grupo TIR submetido a baixas doses de LPS e isquemia-reperfusão apresentaram valores um pouco mais elevados entre 2300-2200 pg/ml respectivamente. O grupo IR submetido apenas a isquemia-reperfusão apresentou o maior valor quando comparado aos demais grupos, com concentração em torno de 3000 pg/ml da IL-6 no plasma, sugerindo maior possibilidade de processo inflamatório neste grupo induzido por IL-6. Foi observado que os três grupos que passaram por procedimento cirúrgico SH, IR e TIR, apresentaram valores significantes quando comparados aos grupos basais CT e TB. O fato do resultado do grupo TIR ter apresentado valores mais próximos do grupo SH considerado um grupo basal, do que do grupo IR, nos sugere que o potencial de inflamação sistêmica no grupo submetido a tolerância com isquemia-reperfusão foi menor do que no grupo submetido apenas ao procedimento cirúrgico de I/R hepática. Assim como este resultado também indica a presença do processo inflamatório sistêmico.

Em 24 horas as concentrações de IL-6 no plasma caem mantendo-se abaixo de 100 pg/ml para os grupos TB, IR e TIR. Sendo que para os grupos CT e SH a concentração de IL-6 se manteve em torno de 120 pg/ml, sem valor significativo.

No estudo de Kono *et al.*, 2011, foi comparado as diferenças dos níveis séricos do TNF alpha com a IL-17 A, mostrando que o pico inicial da IL-17 A sérica foi de 6 horas após a isquemia-reperfusão, sendo anterior ao segundo pico de TNF alpha. Em contraste, os níveis séricos de IL-17 A aumentaram continuamente 36 horas após a isquemia-reperfusão, no entanto os níveis séricos de TNF alpha diminuíram na fase subaguda após a I/R.(83)

O estudo de Kono corrobora nossos resultados, pois no nosso estudo a IL-17A também apresentou elevação no período de 4 horas para 24 horas. Em contrapartida o TNF alpha diminuiu quando comparamos 4 e 24 horas. Nossos resultados apontam aumento expressivo da IL-17 A no plasma, ao longo do tempo. Sendo talvez os resultados elevados da IL-17 A circulante considerando o aumento mais expressivo nos grupos IR e TIR, um indicativo de marcador de lesão da isquemia e reperfusão hepática, corroborando com a literatura. Esta citocina é ativadora de neutrófilos, e podemos estabelecer uma correlação com os dados histológicos obtidos neste trabalho, onde há infiltrado neutrofílico nestes dois grupos IR-TIR após 24 horas da reperfusão, apresentado na tabela 4 lesão pontual, análise por parâmetro.

Outra observação importante a ser citada, é o fato de que na avaliação da lesão local (fígado) a ação por estresse oxidativo e do processo inflamatório se deu em 4 horas, com recuperação da lesão do fígado após 24 horas do procedimento cirúrgico. Mas para a lesão a distância (pulmão) a ação do estresse oxidativo e do processo inflamatório por infiltração neutrofílica, se deu após 24 horas do procedimento de I/R hepática. Talvez seja este, um indicativo de que as lesões apareçam em tempos diferentes quando consideramos a lesão local e a lesão à distância.

Após 24h de reperfusão a circulação da IL-17 aumenta em todos os grupos, aparentemente seguindo o mesmo padrão mostrado em 4 horas, o TB apresentou o menor valor, quando comparado aos demais grupos, e o grupo TIR o maior valor. O que nos chama atenção para o fato de que, a tolerância sozinha não eleva a expressão de IL-17 A circulante, mas quando submetido a I/R hepática ela aparece aumentada, como podemos averiguar nos resultados do grupo TIR. Sugerindo talvez uma conexão com a lesão por I/R .

### 5.13 Citocinas moduladoras e anti-inflamatórias encontradas no plasma IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10

O IFN- $\gamma$  na imunidade adquirida estimula a produção de IgG e IgM via linfócito B. Também relacionado com resposta a infecção e estimulação imunológica. IFN- $\gamma$  é indutor da IL-2 agindo no perfil da resposta imunológica Th2 para Th1. (100)

Nossos resultados indicaram pequena quantidade da concentração de interferon. Sugerindo pouca concentração de interferon gama no plasma nos dois períodos avaliados.

A concentração de IL-2 em 4 horas foi maior nos 2 grupos que foram submetidos a tolerância grupo tol basal e no grupo TIR. Entretanto sem valores significantes. Em 24 horas a expressão de IL-2 também apareceu em baixas concentrações.

A IL-10, assim como o interferon e a interleucina-2, apresentou maior concentração no período de 4 horas após a reperfusão. O grupo IR apresentou um valor elevado de interleucina 10 quando comparado aos grupos SH, TIR, CT e TB. Sugerindo que para a avaliação do quadro sistêmico, a expressão da interleucina10 não foi tão intensa para o grupo tolerante, talvez este grupo não tenha inflamado tanto, a ponto de ativar a expressão desta citocina de ação anti-inflamatória. Diferentemente do grupo isquemia-reperfusão onde a expressão da IL-10 foi maior, um indicativo de que este grupo estava combatendo processo inflamatório após 4 horas de reperfusão. Indicativo de que, este talvez, tenha sido o melhor período para esta análise, pois após 24 horas do procedimento cirúrgico, as concentrações de IL-10 circulantes no plasma, foram baixas, não detectadas no teste para os grupos SH, IR e TIR, detectadas apenas nos grupos CT e TB.

Para nós este resultado foi importante, pois é um indicativo de que houve menor ativação do processo inflamatório para o grupo TIR, não havendo necessidade de expressão e recrutamento da citocina anti-inflamatória IL-10 neste grupo, sugerindo proteção sistêmica.

#### 5.14 Lesão a distância por estresse oxidativo no pulmão – Peroxidação lipídica

Na avaliação da ação das espécies reativas de oxigênio, levando ao processo de peroxidação lipídica e inflamação no órgão a distância, foi efetuado a dosagem da concentração de malondialdeído no pulmão.

Após a reperfusão de 4 horas o grupo IR apresentou o maior valor significativo quando comparado ao grupo controle. O grupo TIR não apresentou valor significativo quando comparado ao grupo CT. Tanto o grupo IR quanto o grupo TIR apresentaram valores próximo ao valor de referência do grupo controle.

Após 24 horas do procedimento cirúrgico de isquemia-reperfusão, o grupo IR aumentou a quantidade de MDA, com valor significativo versus o grupo CT. Enquanto o grupo TIR apresentou quantidade menor de MDA no pulmão, quando comparado ao grupo IR.

Ao observar os dois períodos do estudo, o grupo TIR apresentou discreta elevação, se mantendo constante nos dois períodos, enquanto o grupo IR apresentou elevação mais significativa. Diferente do que foi encontrado na lesão local do fígado em 4 horas, a lesão a distância no pulmão mais significativa se deu após 24 horas da reperfusão. O que sugere uma diferença no tempo de ação da lesão por estresse oxidativo e tempo de recuperação, no fígado e no pulmão.

O grupo tolerante também apresentou estabilidade na comparação dos dois períodos analisados, enquanto o grupo IR continuou aumentando. Este achado para nós é um possível indicativo da ação da tolerância segurando o processo de estresse oxidativo e inflamação no pulmão, com diminuição da lesão a distância, conforme apresentado na (figura 19).

Em um estudo com ratos, que avaliou o pré tratamento com LPS e sua ação protetora na lesão de isquemia-reperfusão hepática, mostrou que o pré tratamento com baixas doses de LPS aumenta os níveis de TNF e AST em resposta a I/R hepática, mas também pode apresentar ação protetora na lesão pulmonar. Um indicativo de que o pré tratamento com LPS possa ser eficiente na proteção das lesões a distância. (46)

Na lesão local nossos achados indicaram que o grupo que passou pelo pré-tratamento com LPS apresentou melhor resposta, ao estresse oxidativo e na resposta inflamatória em 4 horas.

Na lesão a distância o grupo tolerante apresenta diminuição na concentração de MDA no pulmão em 4 e 24 horas. Um possível indicativo da ação da tolerância segurando o processo inflamatório no pulmão, com diminuição da lesão a distância.

### 5.15 Lesão a distância inflamação por infiltração neutrofílica (MPO- Pulmão) 4horas e 24horas após I/R hepática

As lesões por reperfusão estão relacionadas com a formação das espécies reativas de oxigênio, levando a aumento da permeabilidade vascular, ativação de citocinas e do sistema complemento, assim como de neutrófilos lesionando o endotélio. (84)

Para avaliação de possível processo inflamatório no pulmão por infiltração neutrofílica, foi executado a análise da concentração da enzima mieloperoxidase (MPO).

Segundo Deeb *et al.*, 1990, nas primeiras 4 horas da lesão de reperfusão, depende da presença de neutrófilos e macrófagos, sendo que após este período, os neutrófilos são predominantes.(107)

No trabalho do Ferrari *et al.*, 2015, foi apontado que em casos de transplante de pulmão, os neutrófilos têm a característica de infiltrar progressivamente durante as primeiras 24 horas após a reperfusão. Sabe-se que neutrófilos tem papel importante na fase tardia da lesão por reperfusão.(108)

Nossos resultados apontaram que em 4 horas a concentração da mieloperoxidase no pulmão foi menor no grupo IR quando comparado ao grupo controle. Os valores do grupo TIR apareceram elevados quando comparado aos grupos IR e CT. Mas após 24 horas da reperfusão, o grupo IR apresentou o maior valor, com valor significativo versus o grupo controle, um indicativo de que este grupo inflamou mais do que os demais grupos analisados. Sendo que o grupo tolerante em 24 horas apresentou o menor valor de mieloperoxidase com valor significativo quando comparado ao grupo IR.

O grupo submetido a tolerância e isquemia-reperfusão apresentou estabilidade, se mantendo com valores próximo a 1,3U/mg de mieloperoxidase em 4 horas e 1,5U/mg em 24 horas, sugerindo que este grupo apresentou menor potencial de inflamação no órgão a distância por infiltração neutrofílica, no pós-cirúrgico de isquemia-reperfusão hepática, conseguindo acompanhar o valor de referência do grupo controle.

Pode-se dizer que o grupo controle e o grupo TIR apresentaram quadros mais estáveis entre 4-24 horas no pós cirúrgico. Enquanto o grupo submetido apenas ao processo de isquemia-reperfusão hepática, apresentou valores próximos a 0,8U/mg em 4 horas e 5,8U/mg em 24 horas, sugerindo processo inflamatório por infiltração neutrofílica após 24 horas da reperfusão. Ou seja, enquanto o grupo TIR estava apresentando recuperação da agressão por I/R em 24 horas, o grupo IR estava apresentando aumento do processo inflamatório.

Este resultado corrobora com a literatura e com os resultados da concentração de MDA encontrada no pulmão do grupo IR, que também se elevou no período de 24 horas após a reperfusão. Conforme apresentado nas figuras 19 e 20. Foi observado que para a lesão a distância no pulmão, o período de 24 horas do pós-cirúrgico de isquemia-reperfusão foi o período chave para este estudo. Entretanto, para a avaliação da lesão local no fígado isquêmico, o período chave foi o de 4 horas, pois após 24 horas os resultados do fígado indicavam processo de recuperação das lesões originadas por isquemia-reperfusão.

Outra observação importante que notamos no nosso estudo, foi que o valor de IL-17 A circulante aumentou, ao longo do tempo, mas o infiltrado neutrofílico não aumentou no fígado e no pulmão para o grupo tolerante. No estudo de Ariga *et al.*, 2014, sobre migração de neutrófilos, foi apontado que a tolerância reduziu moléculas de adesão nos endotélios. O estudo de Ariga corrobora o nosso estudo, pois a tolerância reduziu moléculas de adesão no endotélio, isso pode explicar menor infiltração neutrofílica no fígado e pulmão do nosso estudo, ou seja, os neutrófilos não conseguiram migrar porque suas moléculas de adesão não foram ativadas, a tolerância evitou esse processo. (109)

O presente estudo analisou se a tolerância reduz as lesões hepáticas causadas pela I/R e se ocorre a modulação da resposta imunológica. Nossos resultados apontaram que há diferenças na resposta do grupo com baixas doses de LPS e isquemia-reperfusão (TIR) versus o grupo isquemia-reperfusão (IR). Em relação a avaliação da lesão local e na atividade enzimática AST/ALT, assim como nos achados histológicos, o grupo tolerante apresentou menor grau de dano do que o grupo IR em 4 horas de reperfusão, com quadro de boa

recuperação após 24 horas do procedimento cirúrgico. Na avaliação da lesão a distância, a tolerância protegeu o pulmão com redução de MDA e MPO no período de 24 horas após o procedimento cirúrgico, apresentando assim diferenças no tempo de resposta da proteção do fígado e do pulmão.

## 6 CONCLUSÃO

A indução de tolerância ao LPS reduziu as lesões locais e à distância decorrentes do processo de isquemia e reperfusão hepática. Houve menor ALT, escore tecidual, MDA no fígado isquêmico. A lesão no pulmão, foi reduzida no grupo de animais tolerantes, também houve menor quantidade de MDA e MPO.

## REFERÊNCIAS

1. Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado: revisão. *Acta Cirúrgica Masculinológica Brasileira*. 2004;19:1–12.
2. Farber JL, Chien KR, Mitnacht SJ. Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol*. 1981 Feb;102(2):271–81.
3. ABE Y, HINES I, ZIBARI G, PAVLICK K, GRAY L, KITAGAWA Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Jan 1;46(1):1–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584908005704>
4. Johnson A, Lewis R, Roberts, Walter. *A célula*. 5th ed. Unknown location; 61 p.
5. Menger MD. Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant Proc*. 1995 Oct;27(5):2863–5.
6. Epstein FH, McCord JM. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *New England Journal of Medicine*. 1985 Jan 17;312(3):159–63.
7. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1995 Jul;1241(2):139–76.
8. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology*. 2001 Jun 1;94(6):1133–8.
9. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 208 p.
10. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery*. 2005 Dec 8;78(6):651–5.
11. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Jan;39(1):44–84.
12. Lima ES, Bonini MG, Augusto O, Barbeiro H V, Souza HP, Abdalla DSP. Nitrate lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic Biol Med*. 2005 Aug 15;39(4):532–9.

13. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315–424.
14. Dikalov S, Fink B. ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide In Vivo and in Tissues. In 2005. p. 597–610.
15. Fago A, Crumbliss AL, Hendrich MP, Pearce LL, Peterson J, Henkens R, et al. Oxygen binding to partially nitrosylated hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2013 Sep;1834(9):1894–900.
16. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: eLS. Wiley; 2005.
17. 'KUMAR V, 'ABBAS AK, 'FAUSTO N, Robbins, Cotran. *Patologia-Bases Patológicas das doenças*. 7th ed. 'KUMAR V, 'ABBAS AK, 'FAUSTO N, Robbins, Cotran, editors. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
18. Robbins. No Title. In: *Pathologic basis of disease*. 9th ed.
19. FONSECA GM, JEISMANN VB, KRUGER JAP, COELHO FF, MONTAGNINI AL, HERMAN P. LIVER RESECTION IN BRAZIL: A NATIONAL SURVEY. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)* [Internet]. 2018 Jun 21;31(1). Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-67202018000100316&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202018000100316&lng=en&tlng=en)
20. Xiao Q, Liu Y, Zhang XJ, Liu ZZ, Xiao JS, Ye QF, et al. Mild hypothermia ameliorates hepatic ischemia reperfusion injury by inducing RBM3 expression. *Apoptosis*. 2022;
21. Canedo LF, Machado MAC, Coelho AMM, Sampietre SN, Bacchella T, Machado MCC. Protective effects of an inhibitor of glycoprotein IIb/IIIa in the hepatic and pulmonary disturbances secondary to ischemia and reperfusion injury of rat's liver. *Arq Gastroenterol*. 2007;44(3):276–81.
22. Nogueira MA, Coelho AMM, Sampietre SN, Patzina RA, da Silva FP, D'Albuquerque LAC, et al. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 7;20(41):15319–26.
23. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* [Internet]. 1986 Nov;74(5):1124–36. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
24. Castro e Silva Jr. O de, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2002;17(suppl 3):96–100. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502002000900020&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000900020&lng=pt&tlng=pt)

25. Medzhitov R, Janeway CA. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):12–5.
26. Zhai Y, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver Ischemia and Reperfusion Injury: New Insights into Mechanisms of Innate-Adaptive Immune-Mediated Tissue Inflammation. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2011 Aug;11(8):1563–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-6143.2011.03579.x>
27. King TD, Song L, Jope RS. AMP-activated protein kinase (AMPK) activating agents cause dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2006 May;71(11):1637–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295206001584>
28. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010 May 1;48(9):1121–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584910000110>
29. Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* [Internet]. 2004 Apr 1;10(2):71–84. Available from: <http://www.ingentaselect.com/rpsv/cgi-bin/cgi?ini=xref&body=linker&reqdoi=10.1179/096805104225003997>
30. Ryan AJ, Flanagan SW, Moseley PL, Gisolfi C v. Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. *J Appl Physiol* [Internet]. 1992 Oct 1;73(4):1517–22. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1992.73.4.1517>
31. Yamamoto M, Akira S. Lipid A Receptor TLR4-Mediated Signaling Pathways. In 2009. p. 59–68. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1603-7\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1603-7_6)
32. Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4. *Eur J Biochem* [Internet]. 2001 Aug 15;268(16):4580–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2001.02385.x>
33. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* [Internet]. 2002 Jul;4(9):903–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457902016131>
34. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* [Internet]. 2000 Aug 17;406(6797):782–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/35021228>
35. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 Jul;4(7):499–511. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1391>

36. Flohé S, Dominguez Fernández E, Ackermann M, Hirsch T, Börgermann J, Schade FU. ENDOTOXIN TOLERANCE IN RATS: EXPRESSION OF TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP70 IN LUNG AND LIVER DURING ENDOTOXIN SHOCK. *Cytokine* [Internet]. 1999 Oct;11(10):796–804. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466698904902>
37. Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* [Internet]. 2010 Dec 21;3(1):21. Available from: <https://fibrogenesis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-1536-3-21>
38. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock REW. Endotoxin Tolerance Represents a Distinctive State of Alternative Polarization (M2) in Human Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2011 Jun 15;186(12):7243–54. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1001952>
39. Rao J, Qin J, Qian X, Lu L, Wang P, Wu Z, et al. Lipopolysaccharide Preconditioning Protects Hepatocytes from Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through Inhibiting ATF4-CHOP Pathway in Mice. Stover CM, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jun 4;8(6):e65568. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0065568>
40. Liu J, Ren F, Cheng Q, Bai L, Shen X, Gao F, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Modulates Liver Inflammatory Immune Response in the Pathogenesis of Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *Transplantation* [Internet]. 2012 Aug 15;94(3):211–7. Available from: <https://journals.lww.com/00007890-201208150-00002>
41. Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, et al. Translation Attenuation through eIF2 $\alpha$  Phosphorylation Prevents Oxidative Stress and Maintains the Differentiated State in  $\beta$  Cells. *Cell Metab* [Internet]. 2009 Jul;10(1):13–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413109001600>
42. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *Journal of Cell Biology* [Internet]. 2001 May 28;153(5):1011–22. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/153/5/1011/46008/Feedback-Inhibition-of-the-Unfolded-Protein>
43. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Jul 15;121(14):2308–18. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/121/14/2308/30122/Initiation-and-execution-of-lipotoxic-ER-stress-in>
44. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic

- ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* [Internet]. 2000 Aug;32(2):169–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2000.9323>
45. Wu C, Wang P, Rao J, Wang Z, Zhang C, Lu L, et al. Triptolide Alleviates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury by Attenuating Oxidative Stress and Inhibiting NF- $\kappa$ B Activity in Mice. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2011 Apr;166(2):e205–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480410008486>
  46. Colletti LM, Remick DG, Campbell DA. LPS Pretreatment Protects from Hepatic Ischemia/Reperfusion. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 1994 Sep;57(3):337–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480484711528>
  47. Sano T, Izuishi K, Hossain MA, Inoue T, Kakinoki K, Hagiike M, et al. Hepatic Preconditioning Using Lipopolysaccharide: Association With Specific Negative Regulators of the Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway. *Transplantation* [Internet]. 2011 May 27;91(10):1082–9. Available from: <https://journals.lww.com/00007890-201105270-00004>
  48. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* [Internet]. 2003 Oct;125(4):1246–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508503012095>
  49. Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver Ischemia: Apoptosis as a Central Mechanism of Injury. *Journal of Investigative Surgery* [Internet]. 2003 Jan 9;16(3):149–59. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08941930390205764>
  50. Zhang S, Yang N, Ni S, Li W, Xu L, Dong P, et al. Pretreatment of lipopolysaccharide (LPS) ameliorates D-GalN/LPS induced acute liver failure through TLR4 signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(10):6626–34.
  51. Chen JC, Ng CJ, Chiu TF, Chen HM. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. *J Pineal Res* [Internet]. 2003 Mar 26;34(4):260–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-079X.2003.t01-1-00031.x>
  52. TSUTSUI S, HIRASAWA K, TAKEDA M, ITAGAKI S ichi, KAWAMURA S, MAEDA K, et al. Apoptosis of Murine Hepatocytes Induced by High Doses of Galactosamine. *Journal of Veterinary Medical Science* [Internet]. 1997;59(9):785–90. Available from: [http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/59/9/59\\_9\\_785/\\_article](http://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/59/9/59_9_785/_article)
  53. Joh EH, Jeong JJ, Kim DH. Kalopanaxsaponin B inhibits LPS-induced inflammation by inhibiting IRAK1 Kinase. *Cell Immunol* [Internet]. 2012 Sep;279(1):103–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874912001761>

54. Joh EH, Kim DH. Kalopanaxsaponin A ameliorates experimental colitis in mice by inhibiting IRAK-1 activation in the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2011 Apr;162(8):1731–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2010.01195.x>
55. WANG AC, MA YB, WU FX, MA ZF, LIU NF, GAO R, et al. TLR4 induces tumor growth and inhibits paclitaxel activity in MyD88-positive human ovarian carcinoma in vitro. *Oncol Lett* [Internet]. 2014 Mar;7(3):871–7. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2013.1759>
56. John Hopkins University. Animal care and use [Internet]. John Hopkins University. 2022 [cited 2022 Oct 19]. Available from: <https://web.jhu.edu/animalcare/>
57. HALL LW, CLARKE KW. *Veterinary anaesthesia*. 9ed ed. London: Balliere Tindall; 1991. 410.
58. Cabaud P, Leeper R, Wroblewski F. Colorimetric measurement of serum glutamic oxaloacetic transaminase. *Am J Clin Pathol*. 1956;26(9\_ts):1101–5.
59. Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. In 1978. p. 302–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687978520326>
60. Soriano B, Bean P, Gaydos J, Tabakoff B. Streamlining microarray technology in a prototype core laboratory. *Am Clin Lab*. 2002 Oct;21(8):22–5.
61. Quireze C, de Souza Montero EF, Leitão RMC, Juliano Y, Fagundes DJ, Poli-de-Figueiredo LF. Ischemic Preconditioning Prevents Apoptotic Cell Death and Necrosis in Early and Intermediate Phases of Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Investigative Surgery* [Internet]. 2006 Jan 9;19(4):229–36. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08941930600778206>
62. Hayama M, Date H, Oto T, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Improved lung function by means of retrograde flush in canine lung transplantation with non-heart-beating donors. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2003 Apr;125(4):901–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022522302735940>
63. D’Armini AM, Roberts CS, Griffith PK, Lemasters JJ, Egan TM. When does the lung die? I. Histochemical evidence of pulmonary viability after “death”. *J Heart Lung Transplant*. 1994;13(5):741–7.
64. Bonser RS, Fragomeni LS, Jamieson SW, Fischel RJ, Harris KM, Edwards BJ, et al. Effects of prostaglandin E1 in twelve-hour lung preservation. *J Heart Lung Transplant*. 1991;10(2):310–5; discussion 316.

65. Egan TM, Ulicny KSJ, Lambert CJJ, Wilcox BR. Effect of a free radical scavenger on cadaver lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1993 Jun;55(6):1453–9.
66. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2013 Jan 2;123(1):92–100. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/62874>
67. ABBAS AK;, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia Celular*. ABBAS AK;, LICHTMAN AH, PILLAI S, editors. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
68. Peakman M. *Imunologia básica e clínica*. 2. ed. Vergani D, Pyne DJ, Woodward M, Nopper E, editors. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro Elsevier; 2011.
69. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017.
70. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Imunologia de Kuby*. 6ª. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, editors. Porto Alegre: Artmed; 2008.
71. Bogliolo L. *Bogliolo Patologia*. 7. ed.. Brasileiro Filho G, editor. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro Guanabara; 2007.
72. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* [Internet]. 2005 May;76(1–4):1–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109888230500002X>
73. Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R, Hübschle T. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. *Immunol Allergy Clin North Am* [Internet]. 2009 May;29(2):229–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088985610900006X>
74. Ivanov, Andrei I. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Frontiers in Bioscience* [Internet]. 2004;9(1–3):1977. Available from: <https://imrpess.com/journal/FBL/9/3/10.2741/1383>
75. Li Z, Perlik V, Feleder C, Tang Y, Blatteis CM. Kupffer cell-generated PGE 2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [Internet]. 2006 May;290(5):R1262–70. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00724.2005>
76. Gomes BRB. *Análise de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos* [Internet] [dissertação]. Universidade de Brasília, Faculdade de Medic; 2017. Available from: [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23916/1/2017\\_BrunaRafaelaBezerraGomes.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23916/1/2017_BrunaRafaelaBezerraGomes.pdf)

77. Gonzalez FHD, Silva SC. Introdução à bioquímica clínica animal. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003;
78. Williams ALB, Hoofnagle JH. Ratio of Serum Aspartate to Alanine Aminotransferase in Chronic Hepatitis Relationship to Cirrhosis. *Gastroenterology* [Internet]. 1988 Sep;95(3):734–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508588800222>
79. Price C, Alberti K. Biochemical assessment of liver function. In: Wright R, editor. *Liver and biliary diseases-pathophysiology, diagnosis, management*. London: W.B. Saunders; 1979. p. 381–416.
80. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT Ratio Predicts Cirrhosis in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *American Journal of Gastroenterology* [Internet]. 1998 Jan;93(1):44–8. Available from: <https://journals.lww.com/00000434-199801000-00012>
81. Fraser CG. Biological variation in clinical chemistry. An update: collated data, 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med*. 1992 Sep;116(9):916–23.
82. Córdoba J, O’Riordan K, Dupuis J, Borensztajn J, Blei AT. Diurnal variation of serum alanine transaminase activity in chronic liver disease. *Hepatology* [Internet]. 1998 Dec;28(6):1724–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.510280640>
83. Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hosomura N, Amemiya H, Tsuchiya M, et al. Role of IL-17A in Neutrophil Recruitment and Hepatic Injury after Warm Ischemia–Reperfusion Mice. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2011 Nov 1;187(9):4818–25. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1100490>
84. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of Reperfusion Injury. *Am J Med Sci* [Internet]. 1994 Apr;307(4):284–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915353222>
85. PP V. Citocinas: revisão. *BJAI* [Internet]. 2001;24(4):146–54. Available from: [http://aaai-asbai.org.br/bjai/detalhe\\_artigo.asp?id=501](http://aaai-asbai.org.br/bjai/detalhe_artigo.asp?id=501)
86. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1989 Apr;7(1):145–73. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
87. Buer J, Balling R. Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2003;4(3):195–205. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg1019>
88. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med*. 1993;21(10 Suppl):S415-22.
89. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells

- is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 1993 May 1;177(5):1277–86. Available from: <https://rupress.org/jem/article/177/5/1277/24669/Tumor-necrosis-factor-alpha-TNFalpha-induced-cell>
90. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GHW, Goeddel D v. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* [Internet]. 1993 Sep;74(5):845–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867493904642>
  91. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, Bondor C, Slavcovici A, Zanc V, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS*. 2011 Feb;119(2):155–63.
  92. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996 Mar;87(6):2095–147.
  93. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 1991 Nov 1;88(5):1445–51. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/115453>
  94. Monroy RL, Skelly RR, Davis TA, MacVittie TJ. Therapeutic evaluation of interleukin-1 for stimulation of hematopoiesis in primates after autologous bone marrow transplantation. *Biotherapy*. 1992;4(2):97–108.
  95. Gouel-Chéron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G. Early Interleukin-6 and Slope of Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR: A Powerful Association to Predict the Development of Sepsis after Major Trauma. Filion LG, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Mar 14;7(3):e33095. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0033095>
  96. Wu HP, Chen CK, Chung K, Tseng JC, Hua CC, Liu YC, et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflammation Research* [Internet]. 2009 Jul 5;58(7):385–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-009-0003-0>
  97. Kellum JA. Understanding the Inflammatory Cytokine Response in Pneumonia and Sepsis. *Arch Intern Med* [Internet]. 2007 Aug 13;167(15):1655. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.167.15.1655>
  98. Kumar AT, Sudhir U, Punith K, Kumar VNR, Rao MY. Cytokine profile in elderly patients with sepsis. *Indian Journal of Critical Care Medicine* [Internet]. 2009 Jun;13(2):74–8. Available from: <https://www.ijccm.org/doi/10.4103/0972-5229.56052>
  99. de Araújo-Souza PS, Hanschke SCH, Viola JPB. Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8 T Cells. *J Immunol Res* [Internet].

- 2015;2015:1–7. Available from:  
<http://www.hindawi.com/journals/jjr/2015/849573/>
100. Reiner SL. Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell* [Internet]. 2007 Apr;129(1):33–6. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407003820>
  101. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun.* 2015;60:1–11.
  102. Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* [Internet]. 1997;2(4):A171. Available from:  
<https://imrpress.com/journal/FBL/2/4/10.2741/A171>
  103. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol* [Internet]. 2014 May 27;5. Available from:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00253/abstract>
  104. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* [Internet]. 2007 Jun 21;447(7147):972–8. Available from:  
<http://www.nature.com/articles/nature05836>
  105. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2004 Mar 1;172(5):3157–66. Available from:  
<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.172.5.3157>
  106. Andrade MMC de. O efeito da tolerância à endotoxina nos linfócitos T regulatórios e Th 17 [Internet]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2016. Available from:  
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5164/tde-20092016-155050/>
  107. Deeb GM, Grum CM, Lynch MJ, Guynn TP, Gallagher KP, Ljungman AG, et al. Neutrophils are not necessary for induction of ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol* [Internet]. 1990 Jan 1;68(1):374–81. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappl.1990.68.1.374>
  108. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015;2015:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/590987/>
  109. ARIGA SK, ABATEPAULO FB, MELO ESA, VELASCO IT, SILVA FP, LIMA TM, et al. ENDOTOXIN TOLERANCE DRIVES NEUTROPHIL TO INFECTIOUS SITE. *SHOCK.* 2014;42:168–73.