



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

ANTÔNIO CARLOS MELO LIMA FILHO

**RECEPTOR DE INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO TIPO 3
DESEMPENHA PAPEL PROTETOR NOS HEPATÓCITOS
DURANTE A LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO HEPÁTICA**

BELO HORIZONTE

2020

ANTÔNIO CARLOS MELO LIMA FILHO

**RECEPTOR DE INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO TIPO 3
DESEMPENHA UM PAPEL PROTETOR NOS HEPATÓCITOS
DURANTE A LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO HEPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Maria de Fátima Leite

BELO HORIZONTE

2020

043

Lima Filho, Antônio Carlos Melo.

Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3 desempenha papel protetor nos hepatócitos durante a lesão de isquemia-reperfusão hepática [manuscrito] / Antônio Carlos Melo Lima Filho. – 2020.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria de Fátima Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fígado. 2. Receptores de Inositol 1,4,5-Trifosfato. 3. Sinalização do Cálcio. 4. Fatores de Transcrição NFATC. 5. Necrose. 6. Transplante de Fígado. I. Leite, Maria de Fátima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 536 DE ANTÔNIO CARLOS MELO LIMA FILHO

"Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato Tipo 3 Desempenha Papel Protetor nos Hepatócitos Durante a Lesão de Isquemia-reperfusão Hepática"

ANTÔNIO CARLOS MELO LIMA FILHO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **05 de outubro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Lídia Maria De Andrade, ICEX/UFMG

Prof. Dr. Rui Milton Patrício Da Silva Junior, FMRP/USP

Prof. Dr. Gustavo José Da Silva Pereira, INFAR/UNIFESP

Profa. Dra. Ana Cristina Do Nascimento Pinheiro Ferreira, UNIFEMM

Profa. Dra. Maria De Fátima Leite, ICB/UFMG - ORIENTADORA



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina do Nascimento Pinheiro Ferreira, Usuário Externo**, em 11/05/2021, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria de Fatima Leite, Professora do Magistério Superior**, em 11/05/2021, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo José da Silva Pereira, Usuário Externo**, em 11/05/2021, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lidia Maria de Andrade, Usuário Externo**, em 11/05/2021, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rui Milton Patrício da Silva Júnior, Usuário Externo**, em 11/05/2021, às 18:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **0720086** e o código CRC **74F07033**.

Referência: Processo nº 23072.232535/2020-51

SEI nº 0720086

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter colocado pessoas especiais em minha vida.

Aos meus pais, Rita de Cássia Silva Lima e Antônio Carlos Melo Lima, pelo amor, respeito, ensinamentos, confiança e acima de tudo, por me fazerem entender que é através da educação que se pode crescer na vida. Meu amor eterno a vocês.

Às minhas irmãs, Marília Vanessa e Márcia Valéria, pelas conversas e apoio incondicional e por estarem presentes em todos os momentos que precisei.

À minha cunhada, Ariane Ferreira, pelos anos de amizade e por todo o apoio.

À minha namorada, Edilane Furtado, pelo suporte, companheirismo e compreensão. Serei sempre grato por tudo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Fátima Leite, pela orientação e por me aceitar em seu laboratório mesmo sem me conhecer e vindo de tão distante. Nunca esquecerei o apoio e o que aprendi com você.

Aos professores da banca, pela contribuição e considerações feitas para este trabalho. MUITÍSSIMO obrigado.

Ao Dr. Michael Nathanson e Dr. Mateus Guerra, por contribuírem tanto para a conclusão deste trabalho e aprendizados. Yale sempre será um marco na minha vida.

Ao Dr. Cristiano Xavier e Dra. Paula Teixeira Vidigal por terem me ajudado com este trabalho, pelas conversas e conselhos, e por me tratarem sempre com cordialidade. O meu mais sincero obrigado.

Aos meus amigos da Fisiologia e Farmacologia, pelo apoio e conversas inspiradoras! Em especial à Irismara Sousa, Camila Brito, Rafael Almendra, Emylle Pinto, Natália Souza e Aline Dias pelo apoio nos momentos em que mais precisei! Vocês são inesquecíveis.

Aos colegas de laboratório Andressa França, Rodrigo Machado, Fernanda Oliveira, Marcone Loiola, Dabny Missiaggia, Alexandre, Jéssica, Jennifer e Sandhra pela ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos e amizade.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela contribuição na minha vida acadêmica e por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Agradeço, enfim, a todos que me ajudaram para a conclusão desta tese.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Sinalização de Cálcio, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta tese contou com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

Introdução: A lesão hepática causada pela isquemia-reperfusão (IR) é observada em diversas condições clínicas, incluindo trombose hepática e transplante de fígado. É sabido que a sinalização intracelular de cálcio (Ca^{2+}) participa de vários processos fisiopatológicos no fígado, mas não se sabe se e como os canais intracelulares de Ca^{2+} estão envolvidos nos eventos hepatocelulares secundários à IR. **Objetivo:** Avaliar se e como o processo inflamatório gerado pela IR hepática afeta o padrão de expressão dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR) nos hepatócitos. **Metodos:** Modelo experimental de lesão de IR hepática foi induzida pela clampagem temporária do pedículo hepático do lóbulo esquerdo por 75 minutos, seguido de reperfusão em diferentes tempos, em camundongos C57BL/6 e C57 ITPR do tipo 3 *knockout* específicos do fígado (ITPR3 LSKO) (nº07602/2018). Após eutanásia, o fígado foi coletado para análises histopatológicas e extração de RNAm e o sangue venoso para dosagem das enzimas ALT e AST. Além disso, foi realizada a avaliação da sinalização intracelular do Ca^{2+} *in vivo*. Neste estudo, também foram utilizadas amostras de fígado humano após isquemia (CAAE: 06595912.2.20000.5125). **Resultados:** O modelo animal de lesão de IR hepática apresentou achados histopatológicos e bioquímicos característicos da lesão de IR hepática. Simultaneamente, foi possível demonstrar aumento transitório e progressivo na expressão de ITPR3 em hepatócitos, um canal intracelular de Ca^{2+} normalmente não expresso. Esta expressão foi induzida, ao menos em parte, por uma combinação da desmetilação da região promotora de *ITPR3* com o aumento da atividade transcricional do fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Adicionalmente, verificou-se a menor expressão de interleucinas pró-inflamatórias e da área de necrose em fígados de animais controle em comparação aos ITPR3 LSKO. Corroborando com esses achados, a expressão de ITPR3 e a ativação do NFAT foram observadas em hepatócitos de biópsias de pacientes submetidos à isquemia hepática. **Conclusão:** Em conjunto, estes resultados fornecem evidências inéditas de que o aumento transitório e progressivo da expressão de ITPR3 em hepatócitos, desempenha um papel citoprotetor durante a lesão hepática por isquemia-reperfusão.

Palavras-chave: Sinalização de cálcio, fator nuclear ativador de linfócito T, necrose, transplante de fígado.

ABSTRACT

Background: Hepatic ischemia-reperfusion injury (IR) is seen in a variety of clinical conditions, including hepatic thrombosis and liver transplantation. It is known that intracellular calcium (Ca^{2+}) signaling mediates several pathophysiological processes in the liver, but it is not known whether and how intracellular Ca^{2+} channels are involved in the hepatocellular events secondary to IR. **Objective:** Evaluate whether and how the inflammatory process induced by IR affects the inositol trisphosphate receptor (ITPR) expression pattern in hepatocytes. **Methods:** Experimental model of hepatic RI injury was induced by temporary clamping of the left lobe hepatic pedicle for 75 minutes, followed by reperfusion at different times, in C57BL/6 wild type and ITPR3 Liver specific knockout mice (n°07602/2018). After euthanasia, the liver was collected for histopathological analysis and extraction of mRNA and venous blood for ALT and AST enzymes dosage. In addition, the evaluation of intracellular Ca^{2+} signaling *in vivo* was performed. In this study, human liver samples after ischemia were also used (CAAE:06595912.2.20000.5125). **Results:** The animal model of hepatic IR injury showed histopathological and biochemical findings characteristic of liver IR injury. Simultaneously, it was possible to demonstrate a transient and progressive increase in the ITPR3 expression in hepatocytes, an intracellular Ca^{2+} channel not normally expressed. This expression was induced, at least in part, by a combination of the demethylation of the *ITPR3* promoter region and increased transcriptional activity of the nuclear factor of activated T cells - (NFAT). Additionally, there were less expression of pro-inflammatory interleukins and the necrosis area in livers of control animals compared to ITPR3 LSKO. Corroborating these findings, ITPR3 expression and activation of NFAT were observed in hepatocytes of biopsies from patients who underwent liver ischemia. **Conclusion:** Taken together, these results provide unprecedented evidence that transient and progressive ITPR3 expression in hepatocytes plays a cytoprotective role during hepatic injury by ischemia-reperfusion.

Keywords: Calcium signaling, nuclear factor of activated T-cells, necrosis, liver transplantation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5mC: 5-metil citosina

ALT: aminotransferase de alanina

AST: aminotransferases de aspartato

ATP: trifosfato de adenosina ou adenosina trifosfato

AVP: vasopressina

Ca²⁺: íon cálcio

CHC: carcinoma hepatocelular

CsA: ciclosporina

DAB: 3, 3 –diaminobenzidina

DAG: diacil-glicerol

DHAGNA: Doença hepática gordurosa não-alcoólica

EROS: espécies reativas de oxigênio

HBV: vírus da Hepatite B

HCV: vírus da Hepatite C

HIF-1 α : fator induzível por hipóxia 1 α

H&E: hematoxilina e eosina

IL: interleucina;

InsP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

IR: isquemia-reperfusão

ITPR: receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato

ITPR3 LSKO: ITPR3-*knockout* específico do fígado

RNA_m: RNA mensageiro

NASH: esteato-hepatite não alcoólica (*non-alcoholic steatohepatitis*)

NFAT: fator nuclear de células T ativadas

NF- κ B: fator nuclear kappa B

Nrf2: fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritróide 2

NS: não significativo

NSB: ligação não específica (*non-specific binding*)

PBS: tampão salina fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PIP2: fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato

PLC: fosfolipase C

RNA: ácido ribonucleico

SOD-1: superóxido dismutase

ssDNA: DNA de fita simples (single stranded DNA)

WT: selvagem (*Wild Type*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do lóbulo hepático diferenciado de acordo com as zonas.....	16
Figura 2: Sinalização de cálcio (Ca^{2+}) em hepatócitos humanos.....	21
Figura 3: Distribuição do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR) nos hepatócitos e colangiócitos humanos.....	23
Figura 4: Figura 4 – Esquema do modelo de isquemia-reperfusão hepática animal.....	30
Figura 5: O modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática induz lesão tecidual progressiva em camundongos.	41
Figura 6: Comprovação da hipóxia tecidual após modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática em camundongos.....	43
Figura 7: O modelo de isquemia-reperfusão hepática gera estresse oxidativo em camundongos.....	44
Figura 8: A lesão de isquemia-reperfusão hepática leva à expressão de RNAm de ITPR3 nos hepatócitos.....	47
Figura 9: ITPR3 esta presente nas amostras de fígado após isquemia-reperfusão hepática (IR) em camundongos.....	49
Figura 10: A sinalização de Ca^{2+} está reduzida na isquemia-reperfusão hepática.....	51
Figura 11: – Diminuição da amplitude dos sinais de Ca^{2+} na região pericentral e periportal hepática após isquemia-reperfusão (IR) em camundongos.....	52
Figura 12: Sinalização de Ca^{2+} não está alterada devido diminuição dos estoques intracelulares de Ca^{2+} ou má perfusão sanguínea.....	54
Figura 13: A sinalização de Ca^{2+} in vivo não é perturbada quando não há expressão significativa de ITPR3.....	56
Figura 14: A hipóxia leva à desmetilação da região promotora do ITPR3 em modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática em camundongos.....	58
Figura 15: NFAT induz a expressão de ITPR3 após a isquemia-	

reperfusão (IR) hepática em camundongos.....	61
.....	
Figura 16: A inibição da ativação de NFAT impede a expressão de ITPR3 induzida por isquemia-reperfusão (IR) hepática.....	63
Figura 17: A lesão causada pela isquemia-reperfusão hepática é pior em camundongos ITPR3 LSKO.....	65
Figura 18: Isoformas de ITPR1 e ITPR2 não encontram-se com expressão alteradas em animais knockout específico para o ITPR3 do fígado (ITPR3-LSKO) após isquemia-reperfusão hepática.....	66
Figura 19: O pré-tratamento com ciclosporina (CsA) melhora a lesão de isquemia-reperfusão.....	67
Figura 20: ITPR3 está expresso após isquemia hepática em humanos.....	68
Figura 21: Possível mecanismo molecular induzido pela isquemia.....	69
Figura 22- Perspectivas de abordagens para o estudo dos efeitos da isquemia-reperfusão na sinalização de Ca^{2+} em hepatócitos.	71

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
1.1 - Injúria por isquemia-reperfusão hepática.....	16
1.2 – Sinalização intracelular de cálcio.....	20
1.3 – Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato e doenças hepáticas.....	23
2 - OBJETIVOS	26
2.1- Objetivo geral	26
2.2- Objetivos específicos	26
3 - MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1- Animais e amostras humanas	27
3.2- Isquemia parcial do fígado em camundongos.....	27
3.3- Avaliação histológica.....	29
3.4- Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR.....	29
3.5- Extração de proteínas e Western blot.....	30
3.6- Imunohistoquímica.....	31
3.7- Imunofluorescência.....	32
3.8- Análise dos sítios de ligação para NAT e transfecção.....	33
3.9- Análise de perfusão com albumina FITC.....	34
3.10- Sinalização de cálcio <i>in vivo</i>	35
3.11- Fluorescência de cálcio por raios X.....	35
3.12- Análise estatística.....	35
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5 - CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	72

1 - INTRODUÇÃO

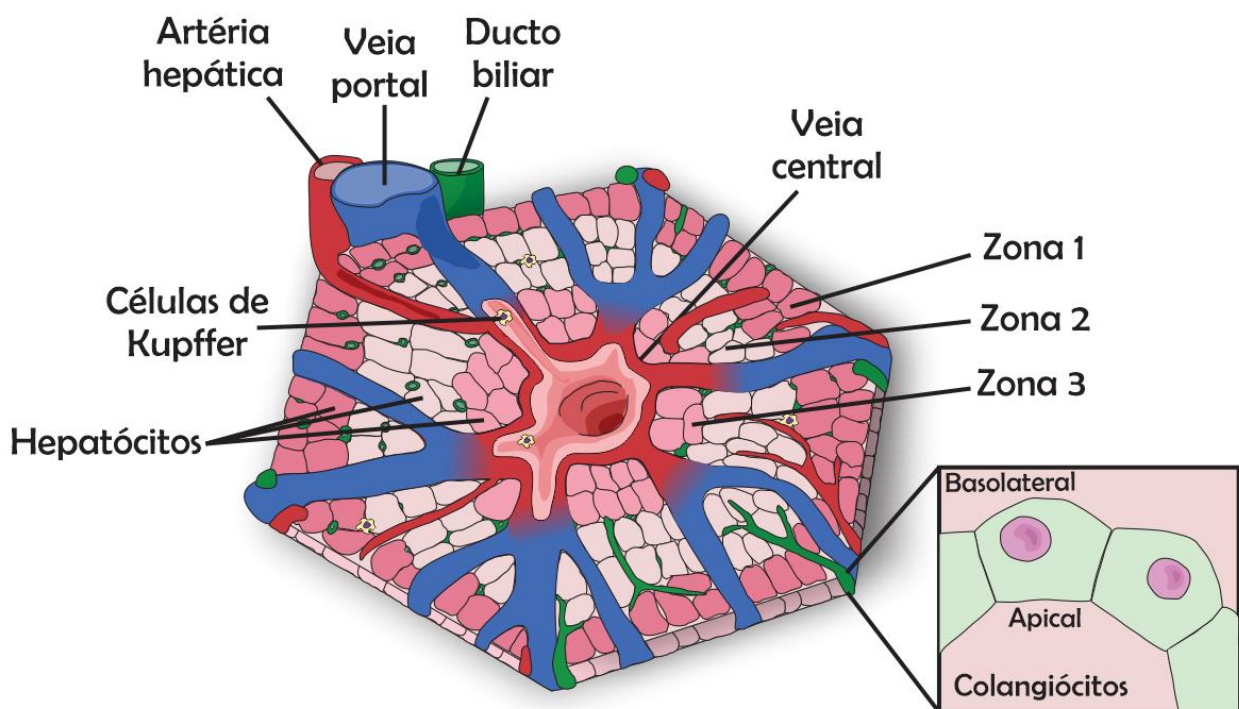
1.1 – Injúria por isquemia-reperfusão hepática

O fígado é o maior órgão sólido do corpo humano, sendo ele subdividido anatomicamente em quatro lobos ou oito unidades funcionais independentes denominadas segmentos hepáticos (BISMUTH, 1982 ; TORTORA, 2013). Fisiologicamente, o fígado é responsável pelo armazenamento de glicogênio, síntese e secreção de bile, síntese e metabolismo de proteínas, lipoproteínas e carboidratos, bem como metabolização e excreção de várias drogas. (BHATIA; UNDERHILL; ZARET; FOX, 2014; HUPPERT; IWAFUCHI-DOI, 2019; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

As principais células associadas às funções desempenhadas pelo fígado são os hepatócitos, que compõem cerca de 80% do estroma do mesmo, e os colangiócitos, que formam 3-5%, e são responsáveis por forma do epitélio do ducto biliar que drenam a bile para a vesícula biliar. Encontram-se ainda no fígado diferentes tipos celulares, tais como células de kupffer, células endoteliais sinusoidais e células estreladas. Este grupo de células protegem o parênquima hepático contra possíveis infecções, formam os capilares sanguíneos, proliferam e produzem colágeno após lesão, respectivamente (HATA; NAMAIE; NISHINA, 2007; KRISHNA, 2013; MAHER, 1993; WISSE; BRAET; DIANZHONG; DE ZANGER *et al.*, 1996).

Histologicamente, as células que formam o parênquima hepático estão esquematicamente organizadas em lóbulos. Os lóbulos são segmentos considerados estruturas funcionais básicas do fígado, organizados em forma de hexágono constituídos de uma veia central e conjuntos de ducto biliar,

artéria hepática e veia porta em cada extremidade (**Figura 1**). Desta forma, o aporte sanguíneo chega aos hepatócitos e colangiócitos pela região periportal, pela veia porta e artéria hepática, esvaindo-se pelos sinusóides hepáticos entre as trabéculas de hepatócitos em direção à veia centrolobular. De acordo com a distância da origem do suprimento sanguíneo, a estrutura do lóbulo hepático divide-se ainda em zonas assim denominadas: zona 1 ou periportal, zona 2 e zona 3 ou pericentrais (BISMUTH, 1982; KRISHNA, 2013).



Lobulo hepático

Figura 1 – Estrutura do lóbulo hepático diferenciado de acordo com as zonas. Esquemáticamente, o fígado é formado por lóbulos hepáticos, sendo cada um deles formado por um hexágono contendo uma veia cava central, seguida de seis conjuntos de artérias hepáticas, veias portais e ductos biliares em cada extremidade. Além dos hepatócitos, o fígado é formado por colangiócitos, bem como células de kupffe).

Atualmente, diversas doenças terminais têm como único tratamento o transplante de fígado (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016). Dentre elas destaca-se a cirrose hepática; consequência histopatológica final originada de várias doenças infecciosas e não infecciosas, como a doença hepática alcoólica, a doença hepática gordurosa não-alcoólica, infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) ou hepatite C (HCV) (WANG; FAN; ZHANG; GAO *et al.*, 2014), entre outras. Recentemente, o transplante de fígado também foi utilizado, com sucesso, como tratamento da falência hepática aguda causada pela infecção do vírus da febre amarela (SONG; ABDALA; DE MARTINO; MALBOUISSON *et al.*, 2019). Por fim, o transplante pode ser indicado para o tratamento de alguns tumores primários e secundários hepáticos, como o carcinoma hepatocelular (CHC), sendo ele a sexta malignidade mais comum e a quarta maior causa de morte por câncer no mundo (CHEDID; KRUEL; PINTO; GREZZANA-FILHO *et al.*, 2017).

É sabido que a interrupção parcial ou total do fluxo sanguíneo durante o transplante de fígado, cirurgias de ressecção parcial hepática, trauma hepático ou outras causas de isquemia do fígado, seguido da reperfusão e restabelecimento deste fluxo, ocasiona a lesão de isquemia-reperfusão hepática (IR). Clinicamente, o dano causado pela IR hepática é uma importante causa de disfunção precoce do enxerto pós-transplante hepático (CASILLAS-RAMIREZ; MOSBAH; RAMALHO; ROSELLO-CATAFAU *et al.*, 2006), a principal causa de indicação re-transplante nas primeiras semanas pós transplante (UEMURA; RANDALL; SANCHEZ; IKEGAMI *et al.*, 2007).

Além dos transplantes hepáticos, o dano causado pela IR também pode ser originado de hemorragia, sepse, insuficiência cardíaca congestiva, trauma,

insuficiência respiratória e outras desordens associadas do baixo suprimento sanguíneo ao fígado.(BIRRER; TAKUDA; TAKARA, 2007; LU; ZHOU; NI; WANG *et al.*, 2016). Já é bem estabelecido que o grau de dano causado no parênquima do órgão é proporcional ao tempo e área de isquemia do mesmo (UEMURA; RANDALL; SANCHEZ; IKEGAMI *et al.*, 2007). Para explicar tal fato, diversos mecanismos fisiopatológicos já foram associados à IR. Entretanto, o mecanismo central se relacionam aos eventos intracelulares subsequentes à hipóxia durante a isquemia, seguida por um segundo momento caracterizado pela intensa quimiotaxia e transmigração de células do sistema imune, formação de espécies reativas de oxigênio e morte celular após a reperfusão sanguínea (CASILLAS-RAMIREZ; MOSBAH; RAMALHO; ROSELLO-CATAFAU *et al.*, 2006).

Em resumo, os mecanismos de dano envolvidos na IR hepática derivam da privação de nutrientes e oxigênio, ocasionando depleção do trifosfato de adenosina ou adenosina trifosfato (ATP) e lesão mitocondrial, seguida pela reperfusão, que inicialmente leva à instauração do estresse oxidativo e ativação migração das células imunes em até 24 horas, com ampliação das zonas de necrose tecidual (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016; JAESCHKE, 2011).

Após a IR, o fígado sofre alterações nas concentrações de diversos íons, tais como o hidrogênio, sódio e potássio. A disfunção da sódio/potássio ATPase (Na^+/K^+ -ATPase), associada ao acúmulo de metabólitos ácidos e diminuição dos níveis de ATP, levam à disfunção mitocondrial e comprometimento do metabolismo celular (GASBARRINI; BORLE; FARGHALI; BENDER *et al.*, 1992). Da mesma forma, o estresse oxidativo gerado pela alta

produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), leva à peroxidação lipídica, degradação de ácidos nucleicos e disfunção de proteínas e enzimas celulares (JAESCHKE, 2011).

1.2 – Sinalização intracelular de cálcio

No fígado, o hepatócito é a principal célula acometida durante a IR. Associado à intensa ativação e destruição pelo ataque das células do sistema imune, após a reperfusão, os hepatócitos lesados geram grande quantidade de espécies reativas de oxigênio que exercem efeito lesivo direto ao parênquima hepático, por meio da peroxidação lipídica, degradação proteica, disfunção mitocondrial, sobrecarga de íon cálcio (Ca^{2+}), apoptose e necrose (JAESCHKE, 2011).

Estudos passados demonstraram que o aumento do Ca^{2+} intracelular desempenha um papel importante no desenvolvimento da lesão em muitas doenças hepáticas, levando, sobretudo, ao aumento de radicais de oxigênio (DHAR; TAKEMOTO; NAGASUE; UCHIDA *et al.*, 1996), ativação de enzimas dependentes de Ca^{2+} (WANG; PATHAN; ETHELL; KRAJEWSKI *et al.*, 1999) e de vários fatores de transcrição inflamatórios (MELLSTROM; SAVIGNAC; GOMEZ-VILLAFUERTE; NARANJO, 2008; OH-HORA; RAO, 2009), e também morte celular (FARBER, 1981).

Nos hepatócitos, o mecanismo de sinalização de Ca^{2+} baseia-se principalmente no receptor de 1,4,5-inositol trifosfato (ITPR), sendo este o único canal de liberação intracelular de Ca^{2+} expresso em situações fisiologicamente normais. No fígado, a sinalização de Ca^{2+} por esta via é importante para a gliconeogênese, o metabolismo, a secreção de bile,

atranscrição de genes, além do controle do ciclo celular e da morte celular (AMAYA; NATHANSON, 2013; FERIOD; OLIVEIRA; GUERRA; NGUYEN *et al.*, 2017; GUERRA; FONSECA; MELO; ANDRADE *et al.*, 2011; HARDINGHAM; CHAWLA; JOHNSON; BADING, 1997; MENDES; GOMES; THOMPSON; SOUTO *et al.*, 2005; PERRY; ZHANG; GUERRA; BRILL *et al.*, 2020; RODRIGUES; GOMES; LEITE; GRANT *et al.*, 2007).

De modo geral, após ativação de um receptor acoplado à proteína G ou tirosina-quinase por um agonista, há ativação da fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfolípido de membrana (fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato - PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃). Este último difunde-se pelo citoplasma da célula até ativar o seu receptor ITPR no retículo endoplasmático (RE) (**Figura 2**) (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003).

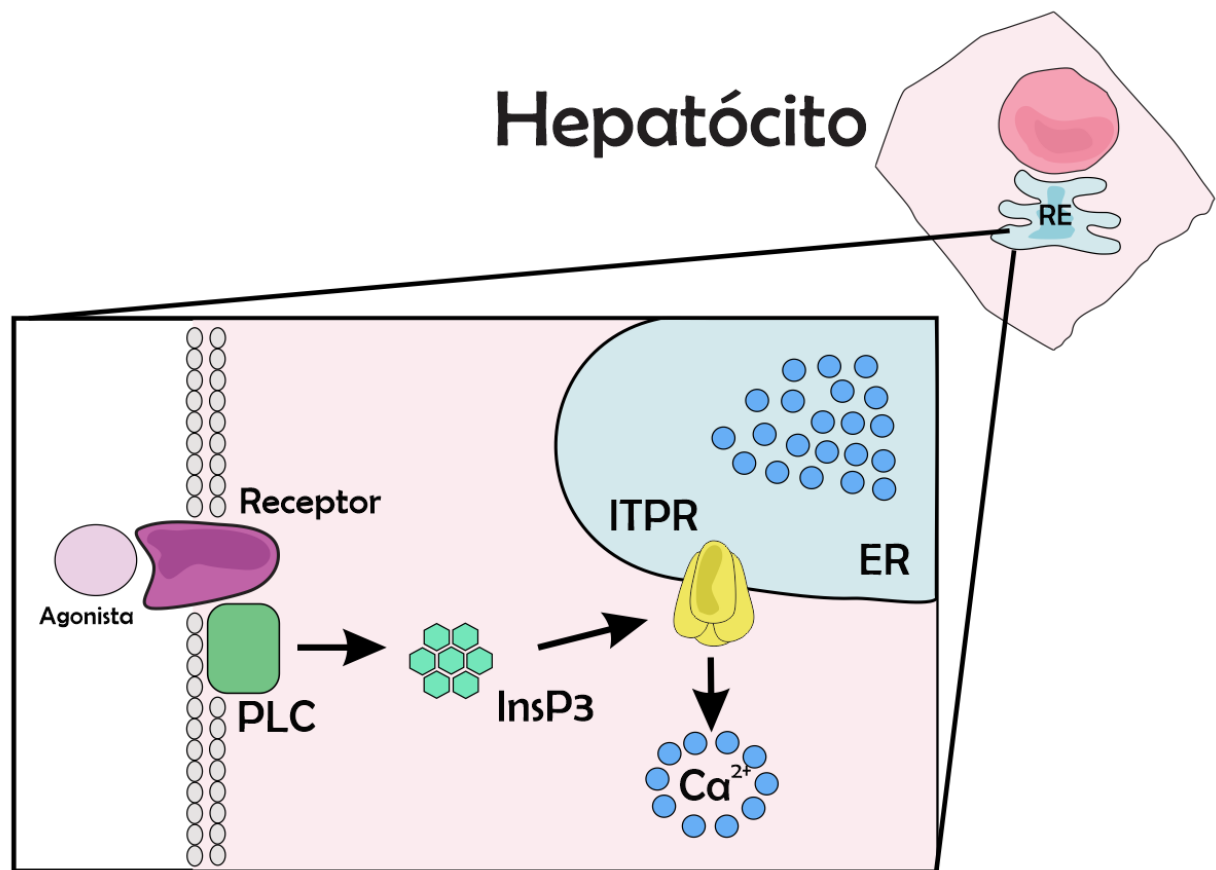


Figura 2 – Sinalização de cálcio (Ca^{2+}) em hepatócitos humanos. Após a ativação de um receptor acoplado à proteína G ou tirosina-quinase, há ativação da fosfolipase C (PLC) que forma Inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) a partir de fosfolípídeo de membrana. Em seguida, o InsP3 difunde-se pelo citoplasma ligando-se no receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR), localizado no retículo endoplasmático (RE), que por sua vez libera o conteúdo de Ca^{2+} intracelular.

Assim, entende-se que o Ca^{2+} regula uma variedade de funções nos hepatócitos de acordo com a concentração de íons e sua localização intracelular, amplitude de picos dos sinais de Ca^{2+} , perfil do sinal formado, por exemplo (AMAYA; NATHANSON, 2013; BERRIDGE, 1997).

1.3 – Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato e doenças hepáticas

O ITPR possui cerca de 300 kDa, sendo formado por cerca de 2700 aminoácidos. São conhecidas três isoformas estruturalmente diferentes dos ITPR, com 60-80% de homologia nas sequências de aminoácidos entre os canais (MIKOSHIBA, 1997; 2007). Cada isoforma apresenta diferentes afinidades ao InsP3, localização e funções celulares. Enquanto o ITPR2 apresenta alta afinidade de ligação ao InsP3, o ITPR1 apresenta afinidade moderada e o ITPR3 baixa afinidade (RAMOS-FRANCO; BARE; CAENEPEEL; NANI *et al.*, 2000).

Em condições de homeostasia, os hepatócitos expressam apenas as isoformas ITPR1 e ITPR2, sendo ambos expressos em diferentes localizações intracelulares. Enquanto a isoforma 1 está expressa no RE difuso pelo citoplasma, a isoforma 2 representa 80% do total de ITPR e está concentrada nas regiões pericanaliculares dos hepatócitos (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002). Por este motivo, o ITPR1 e o ITPR2 estão relacionados a diferentes funções intracelulares, sendo elas processos metabólicos e secreção de ácidos biliares, respectivamente (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002; MIKOSHIBA, 2007; RODRIGUES; GOMES; LEITE; GRANT *et al.*, 2007). Estes receptores também podem ser encontrados no retículo nucleoplasmático, sendo este um importante sinal para controle do ciclo celular e transcrição de genes nos hepatócitos (ECHEVARRÍA; LEITE; GUERRA; ZIPFEL *et al.*, 2003; RODRIGUES; GOMES; LEITE; GRANT *et al.*, 2007).

Por sua vez, o ITPR3 está ausente ou expresso em baixa concentração nos hepatócitos normais, estando expressos apenas em colangiócitos

humanos (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002), como apresentado na **Figura 3**.

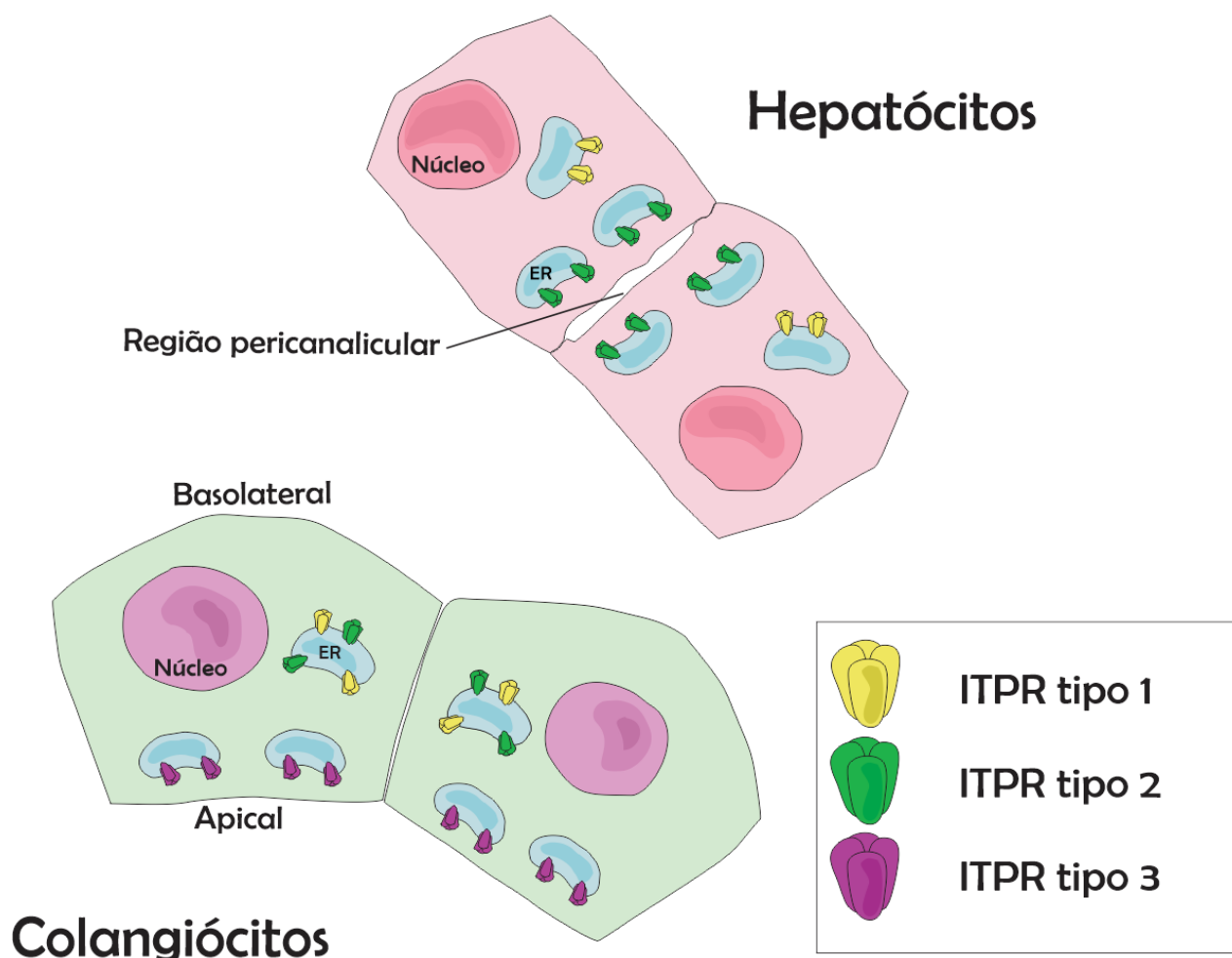


Figura 3 – Distribuição do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (ITPR) nos hepatócitos e colangiócitos humanos. De acordo com a imagem é possível observar que o ITPR1 está expresso no retículo endoplasmático (RE) difuso pelo citoplasma de hepatócitos e colangiócitos, enquanto o ITPR2 concentra-se na região pericanalicular dos hepatócitos, principalmente. Enquanto o ITPR3 não é expresso nos hepatócitos, o mesmo está expresso em maior quantidade na região apical dos colangiócitos.

Estudos recentes sugerem que alterações na expressão do ITPR em hepatócitos desempenhem um papel importante em vários tipos de doenças. Sua expressão pode ser modulada por vários fatores de transcrição inflamatórios, como o fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritróide 2 (Nrf2), proteína ativadora 1 e micro-RNAs em diferentes condições clínicas, tanto agudas quanto crônicas (FRANCA; CARLOS MELO LIMA FILHO; GUERRA; WEERACHAYAPHORN *et al.*, 2019; KHAMPHAYA; CHUKIJRUNGROAT; SAENGSIKISUWAN; MITCHELL-RICHARDS *et al.*, 2017; WEERACHAYAPHORN; AMAYA; SPIRLI; CHANSELA *et al.*, 2015). Dentre elas, destacam-se as alterações na expressão do ITPR1 e ITPR3 pelo fator nuclear kappa B (NF-κB) durante a endotoxemia associada à colestase (SHIBAO; HIRATA; ROBERT; NATHANSON, 2003), diminuição da expressão do ITPR2 pela proteína c-jun durante a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (KHAMPHAYA; CHUKIJRUNGROAT; SAENGSIKISUWAN; MITCHELL-RICHARDS *et al.*, 2017) e diminuição da expressão do ITPR1 durante a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) (FERIOD; OLIVEIRA; GUERRA; NGUYEN *et al.*, 2017).

Mais recentemente, mostrou-se que o ITPR3 expresso *de novo* desempenha papel protetor durante a falência hepática aguda após infecção pelo vírus da febra amarela (LE MOS; FRANÇA; LIMA FILHO; FLORENTINO *et al.*). De acordo com os achados, o ITPR3 passa a ser expresso tanto no citoplasma quanto no núcleo das células, e através do aumento dos sinais de Ca^{2+} nucleares, ocorre indução da proliferação celular como tentativa de diminuição do dano causado pelo vírus. Além disso, demonstrou-se a importância do ITPR3 na diminuição da formação de gotículas lipídicas intra

hepatocitárias pós-infecção, principalmente devido o controle de genes relacionados com a síntese e lise lipídica.

A expressão intracelular de ITPR3 em hepatócitos também foi demonstrada em outros contextos, como na via carcinogênica comum de lesões pré malignas do CHC de diferentes etiologias (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019). Tal mecanismo envolve a redução de sinais pró-apoptóticos, com progressão da proliferação dos hepatócitos. Além disso, achados recentes, demonstram que durante no colangiocarcinoma, o segundo tipo de câncer primário do fígado mais comum, o ITPR3 desempenha papel chave na proliferação e progressão da neoplasia (UEASILAMONGKOL; KHAMPHAYA; GUERRA; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Tendo como base as informações descritas nos parágrafos anteriores podemos afirmar que a IR hepática resulta em uma importante lesão do fígado após procedimentos cirúrgico e situações clínicas de má-perfusão tecidual. Podemos ainda destacar que a sinalização intracelular de Ca^{2+} , desempenha importante e diferentes papeis em diversas situações patológicas do fígado. Desta forma, julgamos ser importante investigar se a IR hepática altera o perfil de expressão dos ITPRs nos hepatócitos e como estes receptores modulam a patogênese da lesão de IR hepática. Tal compreensão pode auxiliar na melhor compressão dos mecanismos de lesão hepatocitária da IR hepática e possível alvos terapêuticos.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Investigar se o dano induzido pela isquemia-reperfusão hepática é capaz de alterar o perfil de expressão hepatocitária das isoformas do ITPR.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar se o modelo experimental utilizado induz lesão hepática característica da isquemia-reperfusão em camundongos;
- Avaliar a expressão das diferentes isoformas de ITPR em modelo animal de isquemia-reperfusão hepática;
- Avaliar como a IR pode alterar a sinalização intracelular de Ca^{2+} *in vivo* em camundongos;
- Determinar os eventos moleculares relacionados com as possíveis alterações de expressão do ITPR em modelo animal de isquemia-reperfusão;
- Estudar a possível correlação dos achados experimentais em amostras de fígado humano após IR.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais e amostras humanas

Camundongos C57/BL6 selvagem ou *ITPR3 knockout* específico do fígado (*ITPR3* LSKO) foram mantidos sob dieta padrão e mantidos em ambiente com ciclo de claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso e Cuidado Animal (protocolo nº 07602/2018). Os animais *ITPR3*-LSKO foram gerados cruzando *FloxR3* com camundongos *Albumin Cre*, gerando o knockout do gene *ITPR3* especificamente no fígado destes animais (Jackson Laboratories, Bar Harbor, EUA) (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019).

As biópsias de fígado e dados clínicos de sete pacientes diagnosticados com isquemia hepática devido a trombose da artéria hepática até 72 horas após o transplante hepático, foram obtidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (2001 a 2016) sob a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, número CAAE: 06595912.2.20000.5125. Os tecidos histologicamente normais, utilizados como controle, foram obtidos de ressecções hepáticas de pacientes com câncer de cólon metastático, conforme determinado por uma revisão de relatórios de patologia de 2010 a 2017 no Hospital das Clínicas (UFMG).

3.2 – Isquemia parcial do fígado em camundongos

Camundongos (6 semanas de vida) foram tratados com inibidor da ativação de NFAT (ciclosporina ou VIVIT, 10 mg/kg por 2 semanas, 8 injeções

i.p.) ou salina antes da cirurgia. Em seguida, camundongos do tipo selvagem (*wild type* - WT) e ITPR3-LSKO (8 semanas) foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução anestésica de cetamina (10%) e xilazina (5%). Realizada laparotomia mediana. O pedículo vasculho biliar do lobo hepático esquerdo foi clampado com micro-clampe (Roboz surgical Instrument). Após 75 min de isquemia, o clipe foi removido e o fígado reperfundido. Realizada a laparorráfia e os animais foram observados no período de recuperação pós-cirúrgica. Grupos de animais foram mortos após 3H, 6H, 24H, 48H ou 72H após inicio da reperfusão, de acordo com protocolo já publicado (YAN; ZHOU; ZHANG; LI *et al.*, 2011). Como controle para os grupos isquemia-reperfusão, animais do grupo sham tiveram o fígado exposto pelo mesmo período de tempo, o pedículo foi levemente manipulado, entretanto, sem a clampagem do mesmo (**Figura 4**).

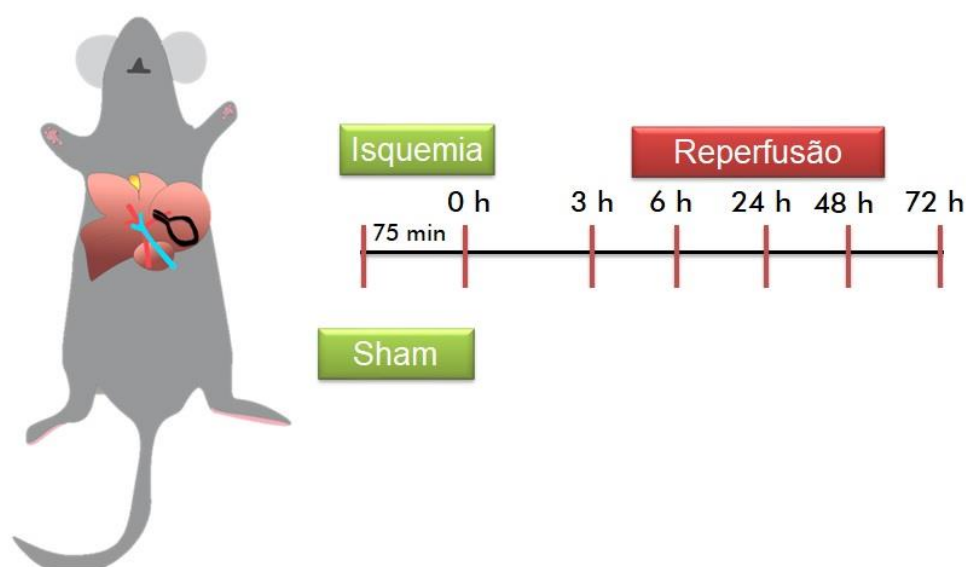


Figura 4 – Esquema do modelo de isquemia-reperfusão hepática animal. O clampe interrompeu o suprimento de sangue para o lobo esquerdo do animal por 75 minutos, caracterizando o período de isquemia, seguida pela sua retirada (reperfusão) em diferentes tempos (3, 6, 24, 48 ou 72 horas).

Amostras do fígado e sangue foram coletadas e devidamente armazenadas para posterior dosagem das enzimas ALT e AST (LabTest) e análises histológicas, como detalhados nos próximos tópicos.

3.3 - Avaliação histológica

As amostras de fígado foram fixadas em formaldeído 10%, embebidas em parafina e seccionadas em 4 µm de espessura. Estas secções de tecido foram então desparafinizadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz e fotografadas com câmera digital (Zeiss). A análise histológica e a avaliação do grau de lesão hepática foi supervisionada pela médica patologista Profa. Dra. Paula Vidigal do Departamento de Anatomia-Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, de acordo com o escore 0-4 apresentado a seguir: 0 significa ausência, 1 – significa baixa presença, 2 – significa leve presença, 3 – significa moderada presença, 4 – significa presença acentuada para a inflamação (infiltrado de células inflamatórias no tecido analisado) ou morte celular (apoptose e necrose).

3.4 - Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR

O RNA mensageiro (RNAm) total foi extraído das amostras de fígado com Trizol (Sigma) de acordo com as instruções contidas no manual do usuário. O DNA complementar foi gerado a partir de 1 µg de RNA usando o Kit de Transcrição Reversa de Alta Capacidade cDNA (Life Technologies).

Análises de qPCR foram realizadas com SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad) usando o sistema CFX96 Real Time PCR (Bio-Rad). Primes para a avaliação de RNAm de camundongo foram utilizados (tabela abaixo) e a expressão relativa destes RNA determinado pelo método comparativo Ct usando a β -actina como o gene de referência.

Alvo	Foward	Reverse
ITPR1	CGTTTTGAGTTTGAAGGCGTTT	CATCTTGCCCAATTCCCG
ITPR2	TTCAGTTCCTATCGAGAGGATGT	GCTGATTGACGCAAGGTCTG
ITPR3	GGGCGAACAACGAGAT	GAAGTTTTGCAGGTCACGTT
IL-1	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
β-actina	GGCTTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCATGT

3.5 – Extração de proteínas e Western blot

As proteínas totais foram extraídas à partir de 10 mg de tecido hepático macerado em tampão RIPA (NaCl 150 mM; Tris-Cl 50 mM pH 7,4; deoxicolato 0,5 %; SDS 0,1 %, NP-40 1%) suplementado com inibidores de protease (PMSF 10 mM, leupeptina 1 μ g/mL, ortovanadato de sódio) e fosfatase, e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos, sendo coletado apenas o sobrenadante e armazenado no -20°C. A extração das frações proteicas nucleares e citoplasmáticas foram feitas com 50 mg de tecido hepático, de acordo com o

protocolo descrito em (DIMAURO; PEARSON; CAPOROSI; JACKSON, 2012). Após as extrações, o conteúdo proteico foi mensurado utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad), tendo como referência a curva padrão de albumina (Sigma), de acordo com as especificações do fabricante. Para o western blot, 50 µg do lisado proteico foram separadas utilizando o gel de 10 % de bis-acrilamida (Bio-Rad) seguido pela transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore). Ligações não específicas foram neutralizadas utilizando uma solução 5% albumina bovina em TBST 1x, incubado por 2 horas à temperatura ambiente. As marcações de interesse foram feitas incubando as membranas overnight a 4 °C com os seguintes anticorpos: anti-ITPR3 (1:1000, BD transduction Laboratories), anti-catalase (1:500, Santa Cruz), anti-superoxide dismutase (1:1000, Santa Cruz), anti-histone-h3 (1:1000, Thermo Fisher Scientific), anti-GAPDH (1:1000, Thermo Fisher Scientific) and anti-actina (1:1000, Santa Cruz). As membranas foram incubadas com anticorpos secundários acoplados à peroxidase (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente. As revelações das imunomarcações foram feitas utilizando reagente ECL (Bio-Rad), e as quantificações das marcações foram realizadas utilizando o software Image J (FRANCA; CARLOS MELO LIMA FILHO; GUERRA; WEERACHAYAPHORN *et al.*, 2019).

3.6 – Imunohistoquímica

A imunohistoquímica do tecido hepático foi realizada com o Kit de Detecção de Poliméricos Novolink (Leica Biosystems) utilizando amostras fixadas em formalina, embebidas em parafina de camundongos e amostras de fígado humano. Inicialmente, as secções de 4 µm foram desparafinizadas,

sendo feita a reativação dos antígenos em tampão citrato 10 mM contendo 0,6% de peróxido de hidrogênio durante 30 minutos a 90 °C. Após o bloqueio da peroxidase e das proteínas, ambas por 10 minutos a temperatura ambiente, os tecidos foram incubados com anticorpos anti-ITPR3 (1:100, BD transduction Laboratories) ou anti-NFAT (1:50, Santa Cruz) e anti-ssDNA (1:100, Abcam) durante a noite à temperatura ambiente. As reações foram desenvolvidas pela aplicação de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) do próprio kit. Para comparar a coloração ITPR3 no tecido hepático, as imagens digitais foram analisadas de forma cega. A intensidade média de pixels foi quantificada em amostras usando o software Image J, por meio da seleção de áreas de mesmo tamanho entre os grupos. Para o ITPR3, o valor da intensidade dos grupos de IR foi normalizado de acordo com o controle considerado 100%. Para marcação NFAT e DNA de fita simples (single stranded DNA – ssDNA), as células com coloração nuclear foram contadas de um modo cego, de modo que os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019).

3.7 - Imunofluorescência

Como descrito acima, os tecidos hepáticos de animais com 4 µm de espessura foram desparafinados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato 10 mM contendo 0,6% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos a 90 °C. A autofluorescência foi reduzida incubando NH₄Cl 50 mM por 1 hora a temperatura ambiente, e a ligação inespecífica foi bloqueada usando Tampão salina fosfatado (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), albumina bovina a 10%, Triton X-100 a 0,05% e soro de cabra a 5% durante 1 hora à temperatura

ambiente. As fatias foram incubadas com anti-ITPR3 (1:100, BD transduction Laboratories) e NFAT (1:50, Santa Cruz) durante a noite a 4°C, seguido de 1 hora de incubação à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-camundongo e coelho conjugado com Alexa Fluor 488 e 555 (Life Technologies), respectivamente. O DAPI foi utilizado para a coloração nuclear. A especificidade da marcação do anticorpo primário foi feita omitindo sua utilização, tendo os controle de ligação não específica (non-specific binding – NSB). As imagens foram coletadas em um microscópio Confocal Nikon C2 e analisadas por meio do Image J, através da seleção de áreas de tamanho igual entre os grupos experimentais, para avaliação da intensidade de fluorescência citoplasmática e/ou nuclear (WEERACHAYAPHORN; AMAYA; SPIRLI; CHANSELA *et al.*, 2015).

3. 8 - Análise dos sítios de ligação para NAT e transfecção

Os sítios de ligação de NFAT na sequência promotora do ITPR3 humano foram analisados utilizando o software MatInspector (www.genomatix.de). Para validar a *análise in silico*, os colangiócitos humanos normais foram co-transfectados com a construção de luciferase ITPR3 (regiões 2kb 5' a montante do gene ITPR3 humano incluindo o promotor proximal) e plasmídeos codificando a família NFAT (NFAT2 e NFAT4). A atividade da luciferase foi analisada 48 horas depois utilizando o kit Dual Luciferase (Promega), de acordo com (FRANCA; CARLOS MELO LIMA FILHO; GUERRA; WEERACHAYAPHORN *et al.*, 2019).

3.9 - Análise de reperfusão com albumina FITC

Com o intuito de avaliar os danos causados aos sinusóides hepáticos durante o período de reperfusão, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cetamina (10%) e xilazina (5%) e submetidos ao protocolo de isquemia-reperfusão hepática. Em seguida, o fígado do animal foi exposto num microscópio confocal Nikon A1, sendo feita a injeção de isotiocianato de fluoresceína de albumina (0,1 mL a 5 mg/mL, i.v.), e monitoramento em tempo real por 5 minutos de acordo com (DAVID; REZENDE; ANTUNES; SANTOS *et al.*, 2016).

3.10 - Sinalização de cálcio *in vivo*

Camundongos C57/BL6 (8 semanas de vida) foram anestesiados com injeção intra peritoneal de solução de cetamina (10%) e xilazina (5%), sendo realizada a isquemia hepática como descrito anteriormente. O fígado foi carregado com 6 μ M de corante de Ca^{2+} Fluo-4/AM (Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos e colocados no microscópio confocal Nikon A1. A vasopressina (AVP, 100 ng/mL, i.v.) foi utilizada para desencadear a liberação de Ca^{2+} dependente de InsP_3 . Os hepatócitos pericentrais foram selecionados com base na localização da veia central. As células restantes foram classificadas como hepatócitos periportais. Os dados foram expressos como porcentagem de células responsivas ao estímulo por AVP e intensidade de fluorescência de acordo com a fluorescência basal $\times 100\%$ (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019). Além disso, também foram calculados o tempo necessário para que 25% da resposta atinja 75% do seu efeito (tempo de subida) e os sinais de Ca^{2+} nucleares nos hepatócitos, de

acordo com a seleção nuclear (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019).

3.11 - Fluorescência de cálcio por raios X

Os fígados foram fixados com paraformaldeído em PBS 4% por 24h e então seccionados (100 μm de espessura) em um Vibratome (Leica). Os valores das intensidades de fluorescência de Ca^{2+} dos raios X foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron na linha de luz XRF. A contagem de tempo de vida de cada pixel foi de 100 s/ passo e o tamanho do passo foi de 30 μm . Usando estes tempos de contagem, os erros de cada dado por metodologias SR- μXRF são <0,1% (REZENDE; BONECKER; PEREZ; MANTESSO, 2016).

3.12 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média de 5-6 animais por grupo, e a análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 6.01 e Microsoft Excel. As diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas quanto à significância usando ANOVA one-way seguida por pos testes de Bonferroni ou teste t de Student. Significância estatística foi para $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lesão por isquemia-reperfusão é uma importante causa de morbimortalidade após o transplante de fígado (UEMURA; RANDALL; SANCHEZ; IKEGAMI *et al.*, 2007) e outros distúrbios associados à diminuição do fluxo sanguíneo para o fígado, como ressecção, choque e trauma. A disfunção primária do enxerto devido a lesão de isquemia-reperfusão é responsável por aproximadamente 80% dos pacientes que necessitam de re-transplante (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016; CASILLAS-RAMIREZ; MOSBAH; RAMALHO; ROSELLO-CATAFAU *et al.*, 2006; LU; ZHOU; NI; WANG *et al.*, 2016). Para compreender os mecanismo da lesão induzida pela isquemia-reperfusão na homeostase do fígado, bem como na sinalização de Ca^{2+} dos hepatócitos, utilizou-se o modelo de isquemia-reperfusão hepática em camundongos.

Inicialmente, avaliou-se o histologicamente o fígado dos animais por meio da coloração de H&E para verificação da extensão do dano hepático. Como demonstrado na **Figura 5A**, a isquemia seguida de reperfusão ocasionou lesão hepática, demonstrada pelo aumento do infiltrado leucocitário ($p<0,01$), da morte celular ($p<0,001$), principalmente nas amostras de 24 horas e 48 após reperfusão. Com o mesmo objetivo, foi realizada a dosagem das transaminases AST e ALT séricas (**Figura 5B**). Já é bem descrito na literatura que tais transaminases são enzimas intracelulares associadas ao metabolismo hepático, e sua elevação sérica está associada à diminuição da integridade tecidual (TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017). Assim, os resultados apontam que houve elevação da concentração sanguínea de AST e ALT nas horas iniciais ($p<0,001$), seguida pela sua diminuição subsequente, sugerindo

recuperação tecidual. Em conjunto, estes resultados demonstram que houve lesão tecidual progressiva e transitória nos animais submetidos ao modelo de isquemia-reperfusão hepática.

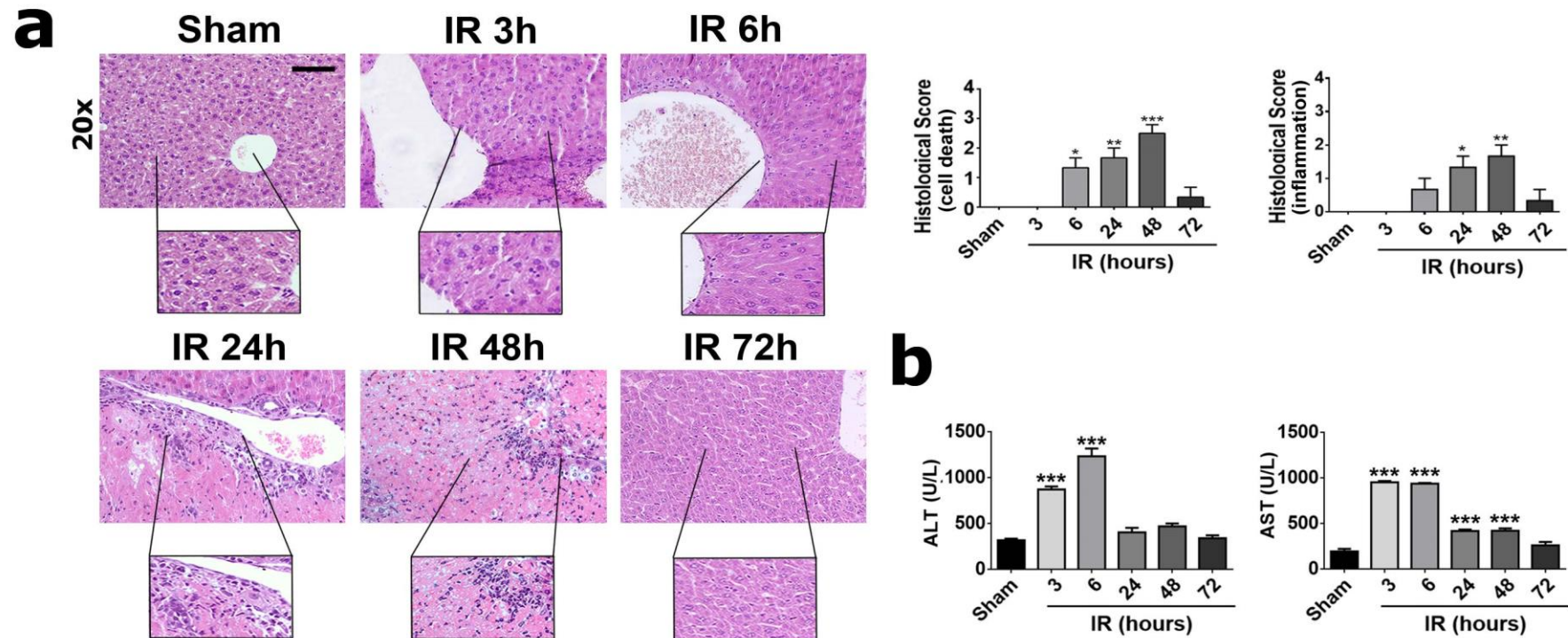


Figura 5 – O modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática induz lesão tecidual progressiva em camundongos. (a) A análise histológica foi realizada de acordo com um escore para avaliação da morte celular e inflamação hepática em animais controle (sham) e após isquemia de 75 minutos e perfusão de 3, 6, 24, 48 ou 72 horas. (b) Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Barras de escala, 50 μ m. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais por grupo, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

De modo semelhante, avaliou-se a presença de sinais de hipóxia tecidual por meio observação da translocação nuclear do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α) nas amostras de fígado após isquemia-reperfusão (**Figura 6**). O HIF-1 α é encontrado expresso no citoplasma celular, translocando para o núcleo em casos de hipóxia tecidual, principalmente nas horas iniciais do evento isquêmico, levando ao aumento da própria expressão (DEPPING; STEINHOFF; SCHINDLER; FRIEDRICH *et al.*, 2008; LEE; KO; JU; ELTZSCHIG, 2019). Semelhante ao dano histológico, observou-se que houve translocação nuclear de HIF-1 α nas horas iniciais de reperfusão, seguida de menor detecção nas amostras após 24 horas pós-reperfusão em comparação ao grupo sham. Tal resultado, em concordância com a literatura (DEPPING; STEINHOFF; SCHINDLER; FRIEDRICH *et al.*, 2008), sugere que a lesão tecidual observada anteriormente ocorreu devido à indução da hipóxia hepática.

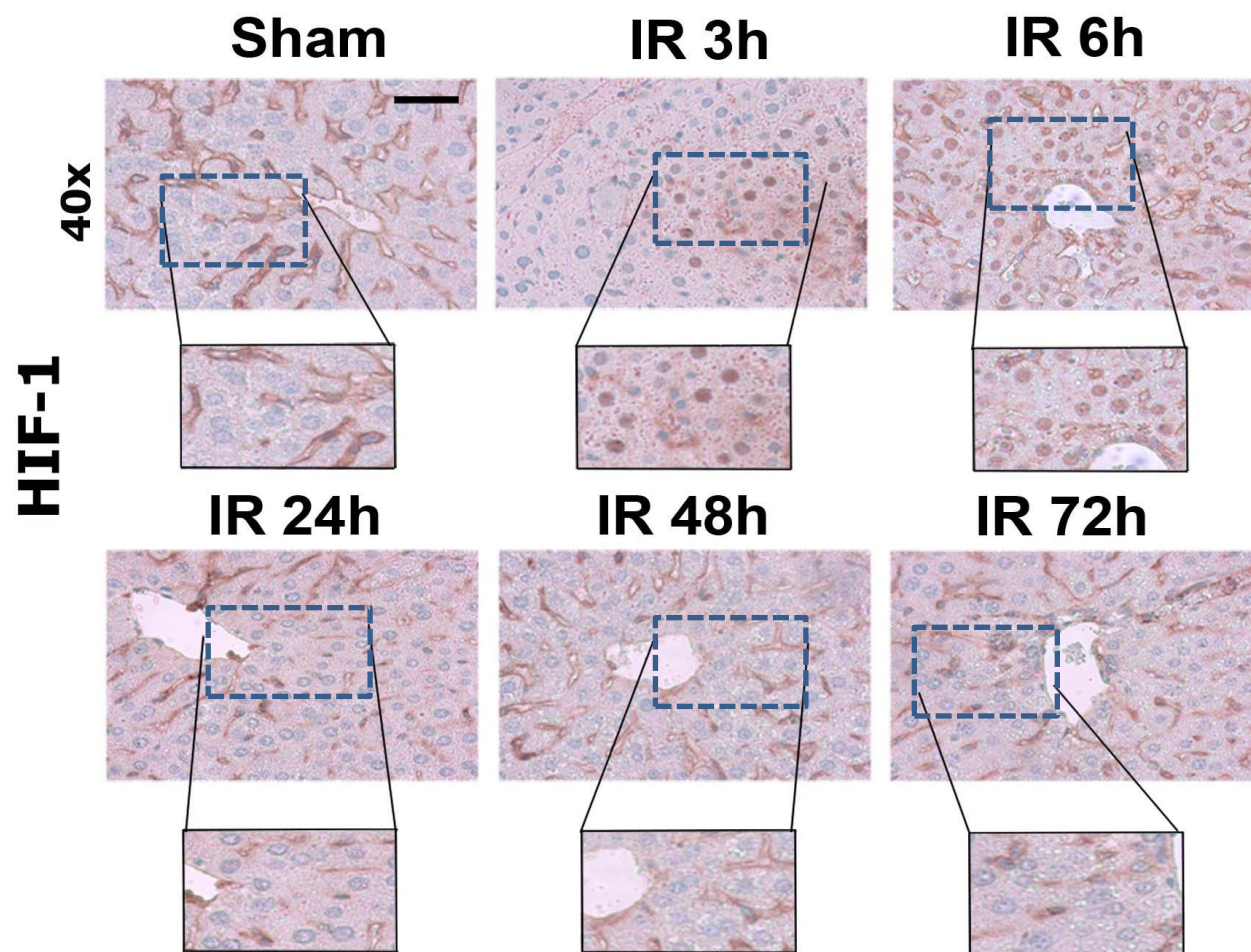


Figura 6 – Comprovação da hipóxia tecidual após modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática em camundongos. Imuno-histoquímica para fator induzível por hipóxia (HIF- α ; em marrom) mostrando a translocação nuclear do mesmo em horas iniciais da reperfusão em animais submetidos a isquemia de 75 minutos e reperfusão de 3, 6, 24, 48 ou 72 horas. Barras de escala, 25 μ m.

É importante ressaltar que juntamente com o dano tecidual induzido pela hipóxia, há também estresse oxidativo, sendo ele demonstrado pela presença de EROS e diminuição da concentração tecidual de enzimas antioxidantes. Desta forma, o estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação tecidual da catalase e superóxido dismutase (SOD-1) (**Figura 7**), duas enzimas antioxidantes essenciais para sequestro dos radicais livres após injúria pela isquemia-reperfusão (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016; LU; ZHOU; NI; WANG *et al.*, 2016). Como evidenciado pela expressão reduzida da catalase ($p < 0,01$) e SOD-1 ($p < 0,05$), houve estresse oxidativo, em comparação ao grupo sham. É possível observar também que estas enzimas antioxidantes aumentam com o passar da progressão da lesão, em acordo com os demais parâmetros de avaliação do dano hepático. Em conjunto, esses achados demonstram que esse modelo de lesão hepática em camundongos mimetiza características essenciais do processo de isquemia-reperfusão, como indução de hipóxia, dano tecidual, estresse oxidativo, morte celular e infiltração inflamatória (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016; CASILLAS-RAMIREZ; MOSBAH; RAMALHO; ROSELLO-CATAFAU *et al.*, 2006).

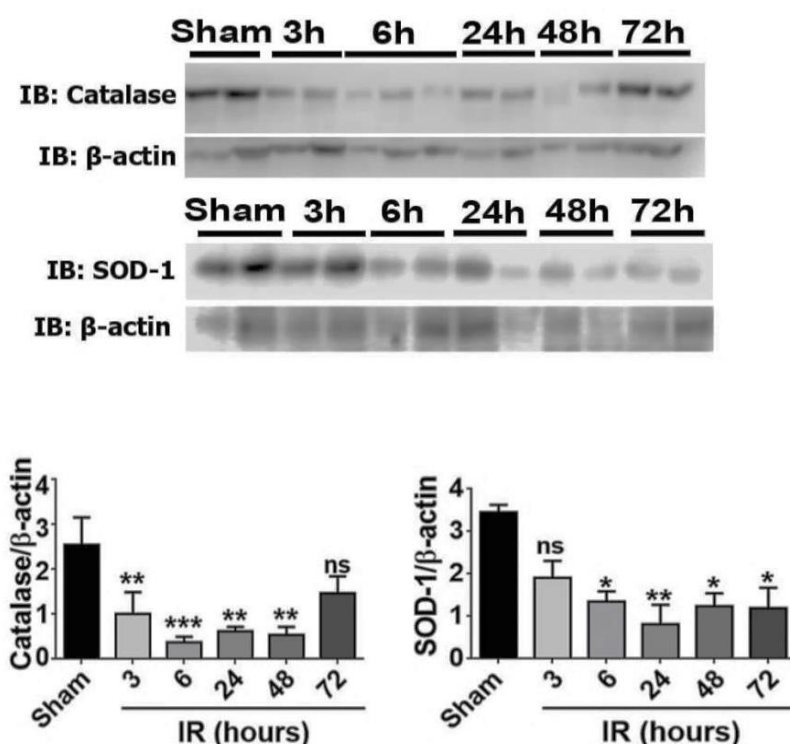


Figura 7 – O modelo de isquemia-reperfusão hepática gera estresse oxidativo em camundongos. Análise de Western blot para catalase e superóxido dismutase (SOD-1) em animais controle (sham) e após isquemia de 75 minutos e perfusão de 3, 6, 24, 48 ou 72 horas. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais/grupo, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Após validação da lesão hepática induzida pelo modelo utilizado, determinaram-se os efeitos da hipóxia induzida pela isquemia-reperfusão na sinalização intracelular de Ca^{2+} hepática. Já é bem descrito na literatura que a alteração desta sinalização está envolvida na patogênese da lesão hepática induzida pela isquemia-reperfusão (DHAR; TAKEMOTO; NAGASUE; UCHIDA *et al.*, 1996; FARBER, 1981; MELLSTROM; SAVIGNAC; GOMEZ-VILLAFUERTES; NARANJO, 2008; WANG; PATHAN; ETHELL; KRAJEWSKI *et al.*, 1999). Diante dos diferentes canais de Ca^{2+} existentes nas células

humanas, é conhecido que o único canal intracelular de liberação de Ca^{2+} expresso nos hepatócitos é o ITPR, sendo a sua expressão importante para a secreção biliar, proliferação dos hepatócitos e metabolismo, por exemplo (Hirata, Pusi et al. 2002, Mikoshiba 2007, Rodrigues, Gomes et al. 2007). No entanto, já foi descrito que em diversas doenças no fígado houve perturbação da expressão destes canais (FERIOD; OLIVEIRA; GUERRA; NGUYEN *et al.*, 2017; FRANCA; CARLOS MELO LIMA FILHO; GUERRA; WEERACHAYAPHORN *et al.*, 2019; GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019; LEMOS; FRANÇA; LIMA FILHO; FLORENTINO *et al.*; UEASILAMONGKOL; KHAMPHAYA; GUERRA; RODRIGUES *et al.*, 2019). Desta forma, inicialmente, para entender se e como a expressão de ITPR se altera durante a lesão de isquemia-reperfusão hepática, analisaram-se os níveis de RNAm de todas as isoformas de ITPR. Como resultado, notou-se que a expressão dos RNAm de *ITPR1* e *ITPR2* não foram alteradas nos fígados após isquemia-reperfusão (**Figura 8a-b**). No entanto, houve um aumento transitório, mas acentuado, do RNAm de *ITPR3*, que atingiu o pico em 3 horas de perfusão ($p < 0,05$) (**Figura 8c**), em comparação do grupo controle sham.

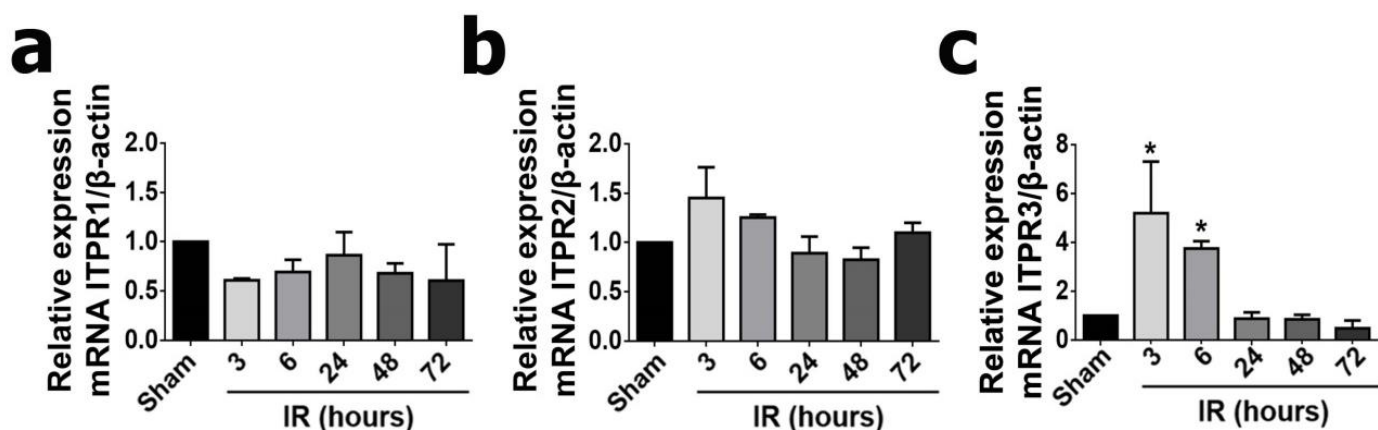


Figura 8 - A lesão de isquemia-reperfusão hepática leva à expressão de RNAm de ITPR3 nos hepatócitos. qPCR de fígado inteiro para as isoformas ITPR 1 (a), 2 (b) e 3 (c), mostrando que há expressão transitória de ITPR3 após 75 minutos de isquemia e 3, 6, 24, 48 ou 72 horas de reperfusão, em comparação ao controle sham. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais por grupo, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

No intuito de observar possível correlação entre o aumento da expressão do RNAm e expressão proteica, realizou-se a imuno-histoquímica para marcação de ITPR3 nas secções de tecido hepático dos animais após reperfusão de isquemia. Como apresentado na **Figura 9**, confirmou-se o aumento da presença de ITPR3 ($p < 0,01$), em comparação ao grupo controle sham. O ITPR3 estava distribuído difusamente por todo o fígado, com um discreto aumento na zona 2 do lóbulo hepático (representado na **figura 9**). Essa expressão alterada de ITPR3 coincidiu com o início precoce de eventos celulares e moleculares relacionados à progressão histológica da lesão de isquemia-reperfusão mostrada nos resultados anteriores. Em conjunto, esses resultados demonstram que houve aumento da expressão de ITPR3, sem

alteração significativa nos níveis de expressão de ITPR1 ou ITPR2 durante a isquemia-reperfusão hepática.

Como observado nos resultados, a alteração do perfil de expressão do ITPR pode ser um evento comum a outros canais relacionados à sinalização de Ca^{2+} nos hepatócitos. Por exemplo, sabe-se que a concentração do Ca^{2+} intracelular é regulada por canais operados por voltagem e transportadores-ATPases presentes na membrana da célula, além de transportadores de compartimentalização do Ca^{2+} expressos no RE, lisossomos e mitocôndrias (JIN; ZHANG; ALHARBI; HANBASHI *et al.*, 2020; LEITE; THROWER; ECHEVARRIA; KOULEN *et al.*, 2003; LEMOS; FLORENTINO; LIMA FILHO; DOS SANTOS *et al.*, 2019; NATHANSON; BURGSTAHLER; MENNONE; FALLON *et al.*, 1995). Esta hipótese permaneceu em aberto, uma vez que devido à importância fundamental da expressão do ITPR para o funcionamento normal do fígado, o presente trabalho focou apenas neste aspecto da sinalização intracelular.

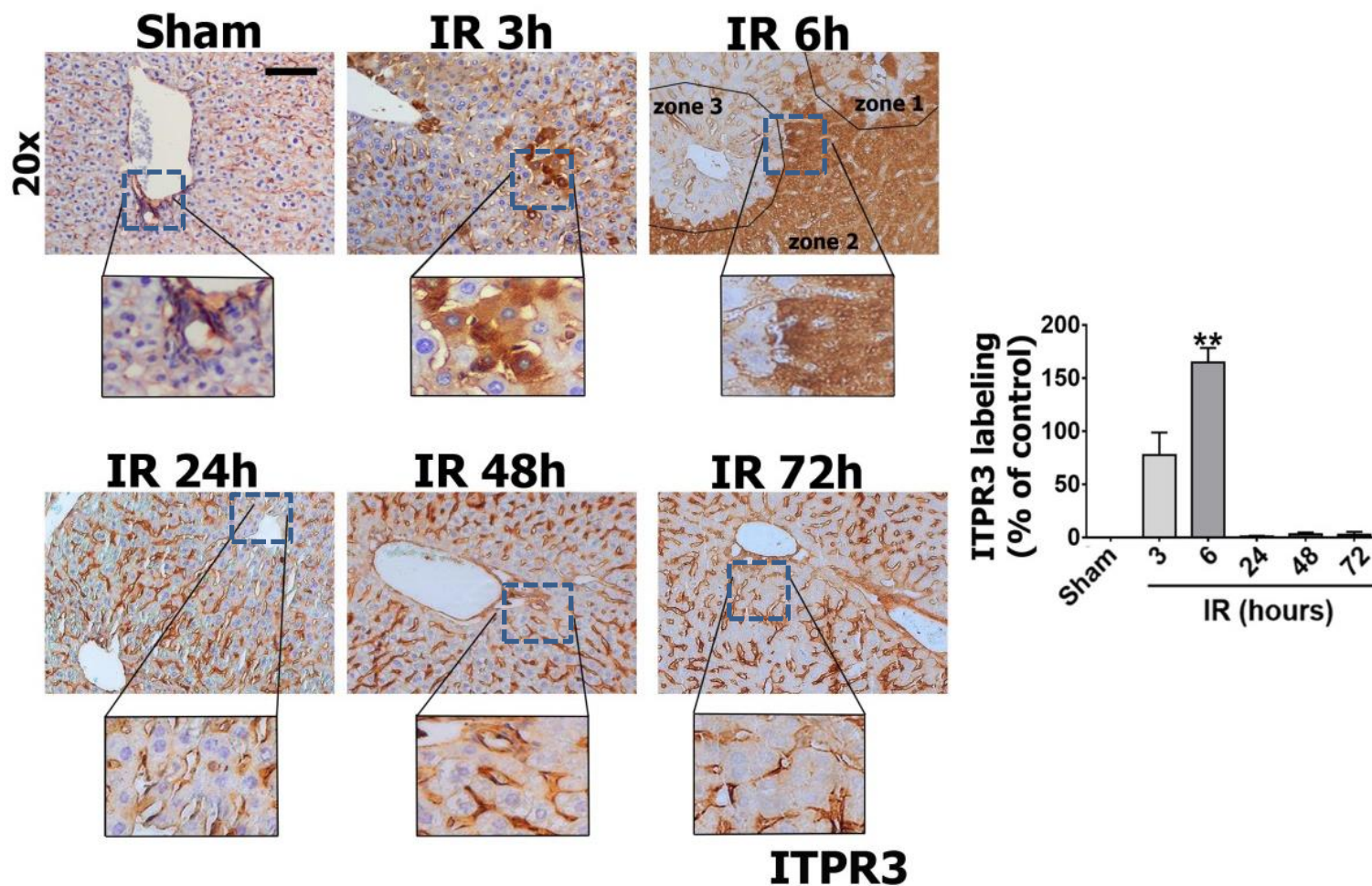


Figura 9 – ITPR3 esta presente nas amostras de fígado após isquemia-reperfusão hepática (IR) em camundongos. Imuno-histoquímica para ITPR3 (em marrom) em amostras de tecido hepático após 75 minutos de isquemia e 3, 6, 24, 48 ou 72 horas de perfusão, em comparação ao controle sham. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais por grupo, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Como o ITPR1 e ITPR2 são as únicas isoformas do canal Ca^{2+} que normalmente regulam as funções dos hepatócitos (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002), investigou-se como a expressão *de novo* do ITPR3 afetaria a sinalização de Ca^{2+} no fígado dos animais. Para compreender este evento, realizaram-se medições *in vivo* do sinal de Ca^{2+} usando o marcador Fluo-4, a fim de verificar o aumento de Ca^{2+} livre no citoplasma e no compartimento nuclear, em relação ao nível basal, desencadeado por um agonista que ativa diretamente uma cascata dependente de InsP_3 (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019). Embora o Fluo-4 seja um marcador não-ratiométrico, o mesmo foi utilizado devido as várias vantagens de uso *in vivo*, tais como a alta afinidade com o Ca^{2+} , baixa absorção de fundo (“background”) e menor necessidade da concentração do marcador em experimento, o que implica em tempos de incubação mais curtos do que outros marcadores de Ca^{2+} (PAREDES; ETZLER; WATTS; ZHENG *et al.*, 2008). O tempo de isquemia-reperfusão de 6 horas foi escolhido devido ser o tempo em que houve maior expressão de ITPR3 nos hepatócitos, como já demonstrado.

Desta forma, como resultado (**Figura 10**) observou-se que, embora a amplitude da sinalização de Ca^{2+} atinja o pico duas vezes mais rápido em fígados de animais submetidos a isquemia-reperfusão, a amplitude dos sinais e o número de células que respondem à arginina vasopressina (AVP) diminuíram ($p < 0,05$) (**Figura 10a-b**). De modo inesperado, não houve alteração nos sinais nucleares de Ca^{2+} (**Figura 10c**). Os histogramas das células respondentes mostram que a maioria das células do grupo IR 6h responde a AVP com menor amplitude do sinal Ca^{2+} em comparação com o grupo Sham (**Figura 10d**).

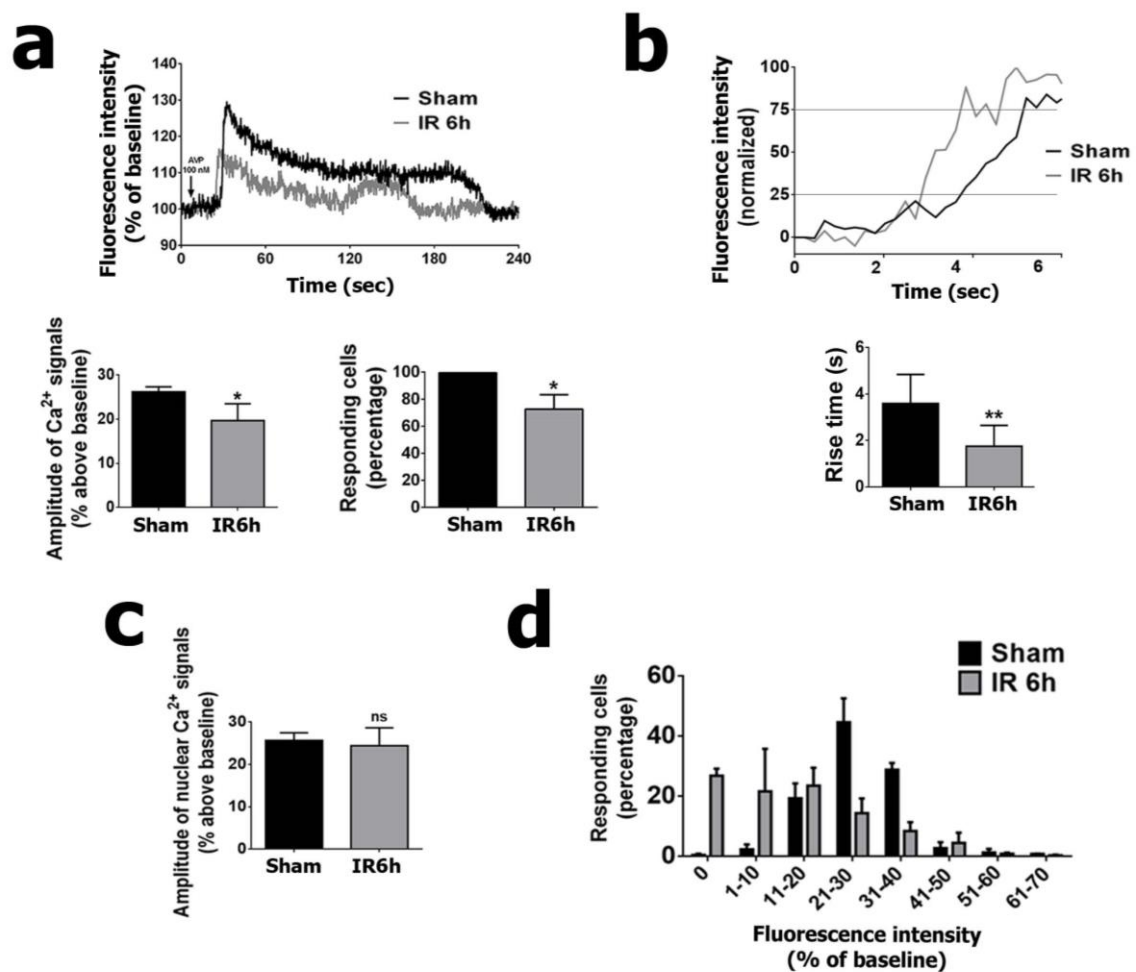


Figura 10 - A sinalização de Ca^{2+} está reduzida na isquemia-reperfusão hepática. (a) Traçados representativos da cinética de sinalização de Ca^{2+} em fígados inteiros (in vivo) de animais após isquemia-reperfusão (IR), em relação à linha de base. Amplitude dos sinais Ca^{2+} induzidos por vasopressina (AVP; 100 nM) e porcentagem de células responsivas à AVP. (b) Gráfico expandido ilustrando que o tempo de subida para o pico é mais rápido da sinalização de Ca^{2+} em camundongos, em comparação ao grupo sham. (c) Não há alteração da amplitude do sinal de Ca^{2+} nuclear em animais IR e sham. (d) Histograma do número de células responsivas ao estímulo com AVP de acordo com a intensidade de fluorescência normalizada em relação a linha de base. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5$ animais por grupo, ns – não significativo; $*p < 0,05$ $**p < 0,01$.

Além disso, houve a redução na amplitude de sinalização de Ca^{2+} de modo semelhante em ambas as regiões pericentrais e periportais do lóbulo hepático ($p < 0,05$) (**Figura 11**).

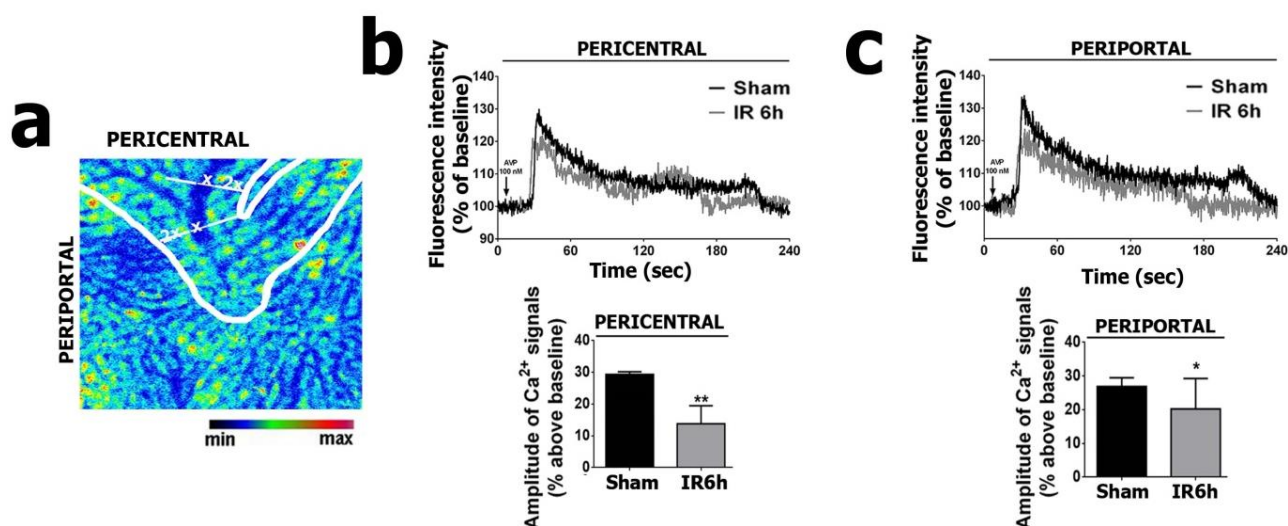


Figura 11 – Diminuição da amplitude dos sinais de Ca^{2+} na região pericentral e periportal hepática após isquemia-reperfusão (IR) em camundongos. (a) Imagem representativa da divisão do fígado do animal em regiões pericentral e periportal, visualizado em microscopia confocal com marcação do Ca^{2+} por Fluo4/AM. (b-c) Traçados representativos da cinética e amplitude de sinalização de Ca^{2+} em fígados inteiros de animais após isquemia-reperfusão (IR), em relação à linha de base, estimulado com vasopressina (AVP 100 nM). Barra de escala, 25 μm . Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5$ animais por grupo, $*p < 0,05$ $**p < 0,01$.

Como a sinalização diminuída de Ca^{2+} pode ser secundária à redução do conteúdo celular de Ca^{2+} , analisamos a concentração de Ca^{2+} total em fatias de fígado usando espectroscopia de fluorescência de raios X baseada em sincrotron (**Figura 12a**). Como resultado, observou-se que o conteúdo de Ca^{2+} no fígado estava ainda maior no grupo isquemia-reperfusão em comparação

com o grupo sham ($p < 0,001$), indicando que a menor amplitude de sinalização de Ca^{2+} observada no grupo isquemia-reperfusão não foi uma consequência da depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Tal achado está em acordo com a literatura, mas, não explica a relação existente com a diminuição da sinalização observada.

Uma terceira hipótese para explicar a diminuição da sinalização de Ca^{2+} e número de células respondentes, poderia estar relacionada com a redução da perfusão sanguínea, de modo que haveria redução da concentração de AVP disponível aos hepatócitos nos fígados lesionados. Para analisar tal possibilidade, injetou-se albumina FITC por via intravenosa nos animais dos grupos sham e isquemia-reperfusão, sendo feito acompanhamento em tempo real da sua distribuição (**Figura 12b**). A albumina foi igualmente distribuída no fígado dos animais dos grupos experimentais analisados, demonstrando que havia perfusão sanguínea adequada. Desta forma, concluiu-se que a redução no sinal de Ca^{2+} induzido por AVP no modelo animal de isquemia-reperfusão não foi devido a danos estruturais na entrega de AVP aos hepatócitos. Em conjunto, esses resultados demonstram que a expressão *de novo* do ITPR3 em fígados após a isquemia-reperfusão está associada a uma amplitude reduzida de sinalização intracelular de Ca^{2+} em hepatócitos.

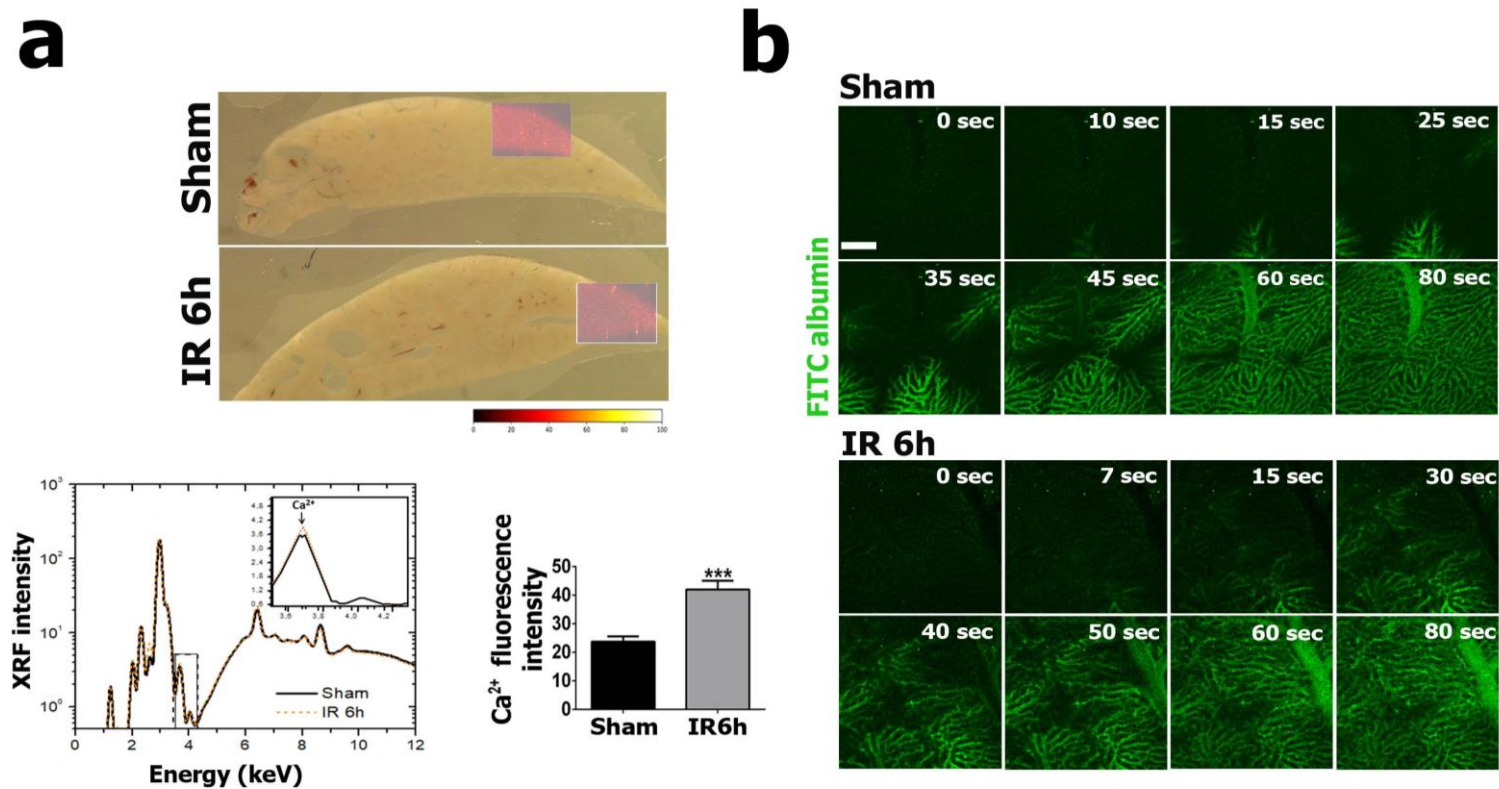


Figura 12 – Sinalização de Ca^{2+} não está alterada devido diminuição dos estoques intracelulares de Ca^{2+} ou má perfusão sanguínea. (a) Imagens representativas da espectroscopia de fluorescência Ca^{2+} por raios-X para avaliação do conteúdo total de Ca^{2+} no tecido hepático após isquemia-reperfusão (IR). (b) Imagens representativas do fígado de camundongos após injeção de albumina-FITC (5 mg/mL, i.v.) após IR, em comparação ao grupo sham. Barra de escala, 25 μm . Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5$ animais por grupo, *** $p < 0,001$.

Com os experimentos realizados, observou-se que o dano específico do ácino hepático também poderia contribuir para a sinalização de Ca^{2+} reduzida observada nos fígados após isquemia-reperfusão, já que a lesão é mais grave na região pericentral. Dando suporte a esta ideia, já é bem descrito que hepatócitos pericentrais têm maior densidade de receptores de AVP em comparação aos periportais (NATHANSON; BURGSTHALER; MENNONE; FALLON *et al.*, 1995), o que resulta em diferenças na sensibilidade ao AVP e na formação de ondas Ca^{2+} pericentral a região periportal ao longo do lóbulo hepático (TORDJMAN; BERTHON; JACQUEMIN; CLAIR *et al.*, 1998). Somado a este fato, experimentos em modelo animal similar ao utilizado neste trabalho demonstraram que há também regulação negativa do receptor V1 causada após isquemia-reperfusão (LIU; LUO; JIANG; MA *et al.*, 2016). Tal fato auxilia na explicação para a diminuição dos sinais de Ca^{2+} induzidos por AVP.

No entanto, com o objetivo de demonstrar o envolvimento direto da expressão de ITPR3 na diminuição da amplitude dos sinais de Ca^{2+} induzidos por AVP, foi feita a avaliação da sinalização de Ca^{2+} *in vivo* nos tempos de perfusão de 3h e 24h, momentos nos quais não há expressão significativa de ITPR3 nos hepatócitos do fígado dos animais (**Figure 13**) e redução significativa do receptor V1 (LIU; LUO; JIANG; MA *et al.*, 2016). Assim, é possível observar que nos tempos analisados, não houve alteração significativa da amplitude dos sinais de Ca^{2+} e no número de células responsivas ao estímulo por AVP. Este resultado representa um importante achado, pois mesmo diante da lesão tecidual causada pela hipóxia, foi observada alteração da sinalização de Ca^{2+} apenas no momento em que houve expressão do ITPR3 (**Figura 10**).

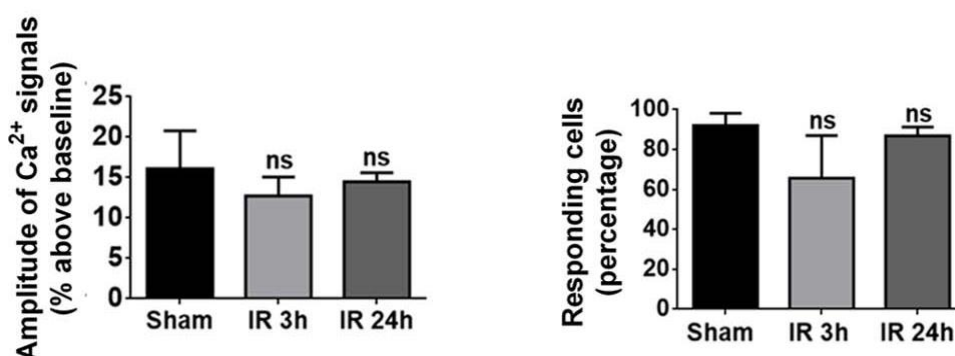


Figura 13 – A sinalização de Ca^{2+} in vivo não é perturbada quando não há expressão significativa de ITPR3. Amplitude dos sinais de Ca^{2+} e número de células responsivas ao estímulo por AVP (100 nM) após isquemia hepática de 75 minutos e perfusão de 3 ou 24 horas. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais por grupo, ns- não significativo.

Da mesma forma, ressalta-se ainda que outras proteínas intracelulares participantes da sinalização de Ca^{2+} podem encontrar-se alteradas após a isquemia-reperfusão hepática, levando a diminuição da sinalização de Ca^{2+} . Um exemplo é a própria PLC formadora de InsP_3 , que pode estar com expressão diminuída nos hepatócitos. Entretanto, em vista a consistências dos nossos achados apontando o papel da expressão do ITPR3 como fator central da diminuição, buscou-se entender quais vias moleculares poderiam estar envolvidos na indução da expressão do ITPR3 nestes hepatócitos. Dentre os possíveis mecanismos, é bem estabelecido que o ITPR3 é modulado por processos epigenéticos (FRANCA; CARLOS MELO LIMA FILHO; GUERRA; WEERACHAYAPHORN *et al.*, 2019; KHAMPHAYA; CHUKIJRUNGROAT; SAENGSIKISUWAN; MITCHELL-RICHARDS *et al.*, 2017; WEERACHAYAPHORN; AMAYA; SPIRLI; CHANSELA *et al.*, 2015), sendo a metilação um ponto importante nesta regulação (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019). Já foi evidenciado que a expressão de

ITPR3 é uma via em comum para nos casos de carcinoma hepatocelular (CHC) de diferentes etiologias, bem como um mecanismo hepatoprotetor em casos de hepatite aguda após infecção pelo vírus da febre amarela, estando ambas as condições de expressão do ITPR3 associadas à hipometilação da região promotora do gene (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019; LEMOS; FRANÇA; LIMA FILHO; FLORENTINO *et al.*).

Assim, surge a hipótese de que a expressão de ITPR3 na isquemia-reperfusão se dá como consequência da desmetilação da região promotora do seu gene. Esta hipótese é apoiada por vários estudos que mostram que durante a hipóxia ocorrem alterações epigenéticas no material genético em consequência da ativação de fatores transcricionais (ITEM; SCHANZER; METZ; GREBER-PLATZER *et al.*, 2019; STRZYZ, 2016). Em vista do exposto, avaliaram-se os níveis de metilação do DNA em fatias de fígado de camundongos submetidos a lesão de isquemia-reperfusão (**Figura 14**). Como apresentado na **figura 14a**, é possível observar que os níveis globais de metilação do DNA, avaliados pela marcação de 5-metilcitosina (5mC) do tecido hepático, diminuíram significativamente nas primeiras horas após a reperfusão hepática ($p < 0,001$). Esse resultado coincide com o curso do tempo da expressão transitória do RNAm do ITPR3 (**Figura 8**). A análise do estado de metilação do promotor ITPR3 (**Figura 14b**), em particular, demonstrou uma hipometilação significativa nos fígados do grupo isquemia-reperfusão ($p < 0,05$). Juntos, esses achados sugerem uma ligação entre o nível de metilação e a expressão de ITPR3 durante a lesão de isquemia-reperfusão.

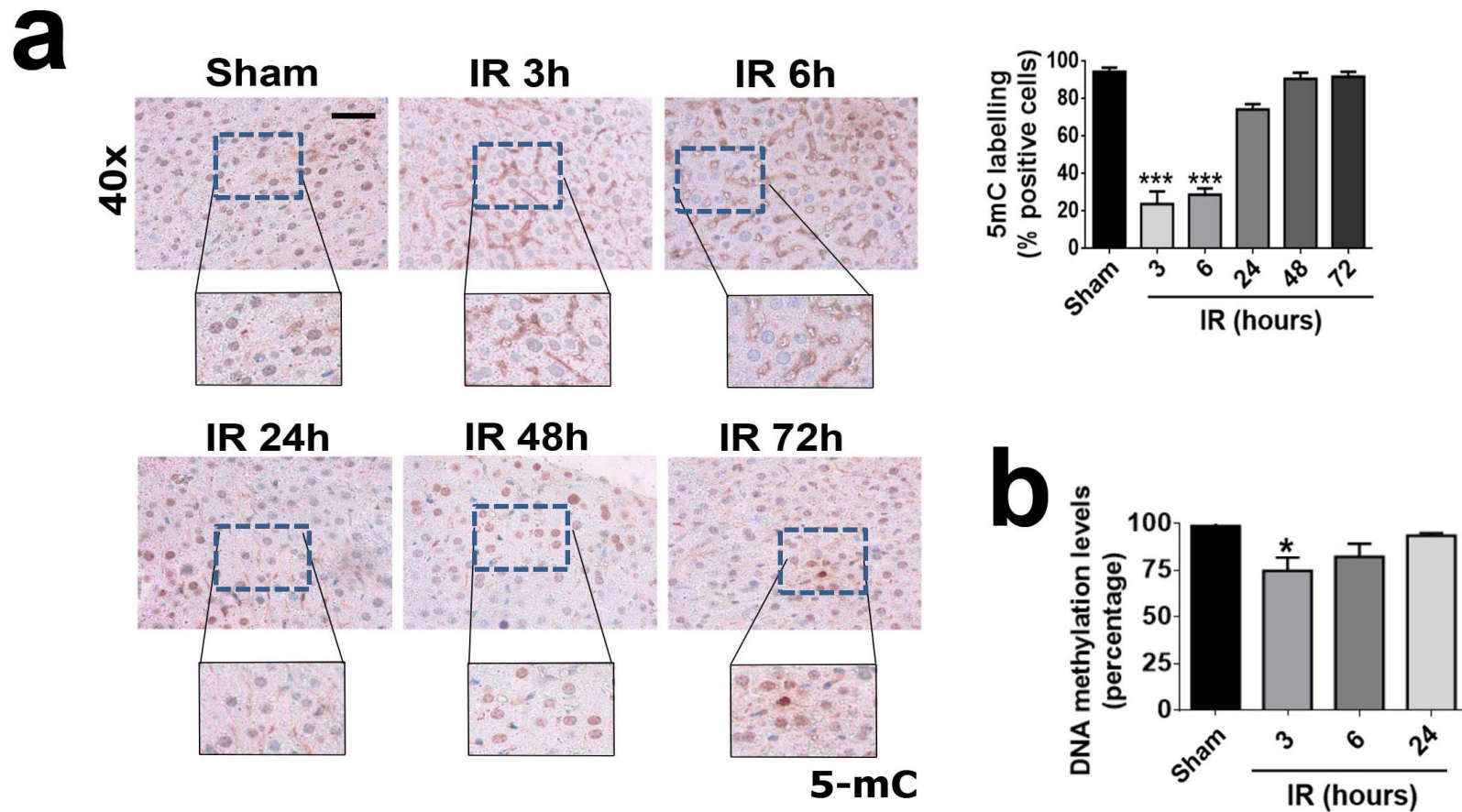


Figura 14 – A hipóxia leva à desmetilação da região promotora do ITPR3 em modelo de isquemia-reperfusão (IR) hepática em camundongos. (a) Imuno-histoquímica da 5-metilcitosina (5mC; coloração marrom) em fatias de fígado de animais controle e isquemia-reperfusão em diferentes momentos. (b) níveis de metilação do DNA (porcentagem) da região promotora de ITPR3. Barras de escala, 25 μ m. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5-7$ animais por grupo, $*p < 0,05$ $***p < 0,001$.

Como a expressão gênica requer hipometilação e recrutamento de fatores de transcrição, atuando assim diretamente no gene desmetilado (KENNETH; ROCHA, 2008), também investigou-se a participação de possíveis fatores de transcrição que poderiam regular a expressão de *ITPR3* durante a lesão de isquemia-reperfusão. Uma análise inicial *in silico* revelou que a região promotora 1 kb proximal do *ITPR3* humana contém 16 locais de ligação previstos para o fator Nuclear de células T ativadas (NFAT; **Figura 15a**).

O NFAT é um conhecido fator de transcrição associado aos processos inflamatórios, como também no dano causado pela isquemia-reperfusão (ZHANG; MEI; WANG; WANG *et al.*, 2005). Como descrito na literatura, a localização do NFAT no núcleo dos hepatócitos representa um índice da sua ativação (PENG; GERTH; RANGER; GLIMCHER, 2001). Assim, de acordo com a **Figura 15b**, observa-se que o NFAT encontrou-se aumentado no núcleo das células entre 3-6 horas após a lesão hepática induzida pela hipóxia ($p < 0,05$), coincidindo novamente com a expressão de *ITPR3* observada anteriormente (**Figura 8**).

Com o objetivo de analisar a relação direta do *ITPR3* com o NFAT, células de cultura primária hepática humana (colangiócitos humanos normais - NHC) foram transfectadas com a região promotora 1kb do *ITPR3* e membros da família NFAT (*NFAT2* e *NFAT4*), duas isoformas do NFAT expressas nos hepatócitos (ZHANG; MEI; WANG; WANG *et al.*, 2005). Desta maneira, após avaliação da atividade da luciferase, constatou-se que houve aumento da atividade do promotor *ITPR3* de modo significativo nas células co-transfectadas com *NFAT2* ($p < 0,05$) ou o *NFAT4* ($p < 0,001$), (**Figura 15c**). Assim, a desmetilação máxima da região promotora de *ITPR3* e a translocação nuclear

de NFAT coincidem com o pico da transcrição de RNAm de ITPR3 e precedem a expressão da proteína ITPR3. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão *de novo* do ITPR3 na isquemia-reperfusão se deve em parte à ativação do NFAT, assim como à desmetilação gênica.

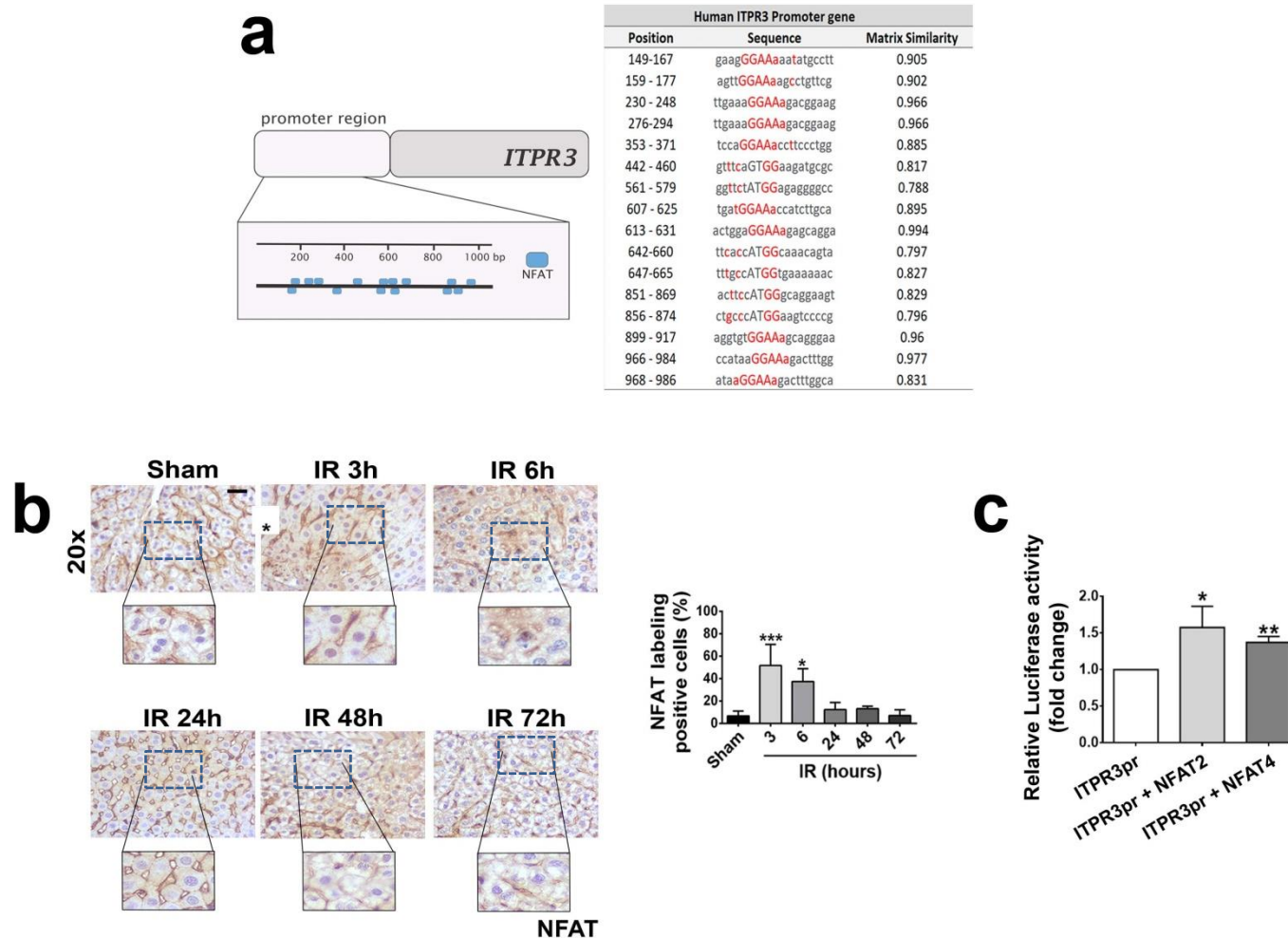


Figura 15 – NFAT induz a expressão de ITPR3 após a isquemia-reperfusão (IR) hepática em camundongos. (a) Locais de ligação ao NFAT na região do promotor ITPR3 humano. (b) Imuno-histoquímica para NFAT (em marrom) mostrando sua ativação em momentos iniciais da isquemia-reperfusão. (c) O ensaio de luciferase mostra que o NFAT aumenta a ativação do promotor ITPR3 humano. Barras de escala, 50 μ m. Valores expressos em média $\pm$ SEM, n = 5-7 animais, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Para confirmar se a ativação de NFAT induz a expressão de ITPR3 *in vivo*, os camundongos foram pré-tratados com ciclosporina (CsA), um importante inibidor de calcineurina que impede a desfosforilação do NFAT e com isso, a sua translocação para o núcleo e inibição indireta de suas ações (**Figura 16**). Como mostrado na **Figura 16a**, o pré-tratamento evitou a translocação do NFAT para o núcleo, fato confirmado pela diminuição da fluorescência (**Figura 16b**). Corroborando com a ideia levantada, houve diminuição da presença de ITPR3 nas amostras de tecido avaliadas como observado na **Figura 16b**. Entretanto, embora a presença do ITPR3 tenha diminuído, a mesma não retornou aos níveis basais indicando que outros fatores poderiam estar participando da regulação da sua expressão.

Com o intuito de eliminar as dúvidas sobre a indução direta do NFAT para expressão do ITPR3, os animais foram pré-tratados com um inibidor específico de NFAT (VIVIT) (ARAMBURU; YAFFE; LÓPEZ-RODRÍGUEZ; CANTLEY *et al.*, 1999; WANG; BI; XUE; LIAO *et al.*, 2015). Como mostrado na **Figura 16c**, não houve translocação de NFAT para o núcleo após o pré-tratamento com VIVIT, quando comparado com animais controle sem tratamento. Além disso, a presença da marcação para ITPR3 foi significativamente diminuída em animais com a translocação de NFAT inibida (**Figura 16d**).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação de NFAT induz a expressão de ITPR3 nos hepatócitos após lesão de isquemia-reperfusão hepática, uma vez que o mesmo já se encontra desmetilado pela ação da hipóxia (**Figura 14**).

Retornando a ideia de que a sinalização de Ca^{2+} estaria diminuída pela presença do receptor de ITPR3, somado aos danos nos hepatócitos pericentrais e diminuição da expressão do receptor V1, realizou-se a avaliação da sinalização de Ca^{2+} nestes mesmos animais. Assim, de acordo com seus efeitos na ativação de NFAT e na expressão de ITPR3 após lesão de isquemia-reperfusão, o pré-tratamento com VIVIT também restaurou a sinalização de Ca^{2+} e o número de células respondentes aos estímulos por AVP (**Figura 16e**). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a ativação do NFAT é um evento-chave que controla a expressão do ITPR3 em hepatócitos na lesão de isquemia-reperfusão.

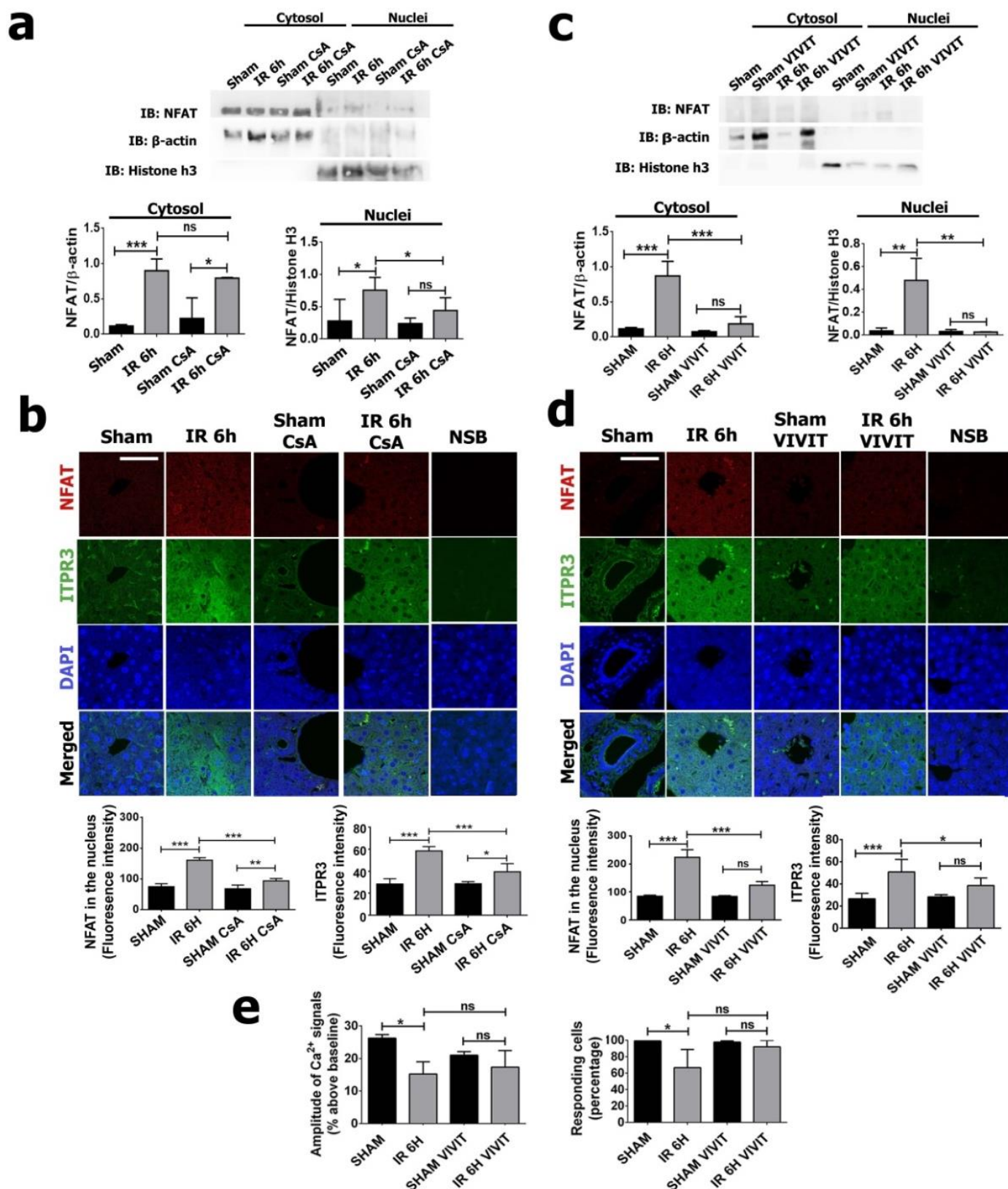


Figura 16 - A inibição da ativação de NFAT impede a expressão de ITPR3 induzida por isquemia-reperfusão (IR) hepática. Western blot da fração de

núcleos/citosol para NFAT em isquemia-reperfusão ou camundongos sham pré-tratados ou não com ciclosporina (CsA) (a) e VIVIT (c). Imunofluorescência para NFAT (em vermelho) e ITPR3 (em verde) após ciclosporina (b) e VIVIT (d) pré-tratamento. (e) Amplitude da sinalização de Ca^{2+} in vivo e número de células que respondem ao estímulo por vasopressina (AVP, 100 nM) em animais pré-tratados ou não com VIVIT, após isquemia-reperfusão. Barra de escala de 25 μ m. Valores expressos em média $\pm$ SEM, n=5 animais por grupo, * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$.

Para entender o papel da expressão de ITPR3 nos hepatócitos durante a lesão de isquemia-reperfusão, foram utilizados camundongos *knockout* específicos para o ITPR3 do fígado (ITPR3-LSKO) (**Figura 17a**). O tempo de perfusão de 6 horas foi escolhido de acordo com a expressão de ITPR3 máxima já observada (**Figura 9**). O dano hepático induzido por isquemia-reperfusão foi significativamente aumentado em camundongos ITPR3-LSKO quando comparado ao tipo selvagem (*wild type* – WD), visualizado pelo aumento da morte celular e infiltrado inflamatório ($p < 0,05$) (**Figura 17b**). Da mesma forma, houve aumento significativo dos níveis de AST nos camundongos ITPR3-LSKO ($p < 0,05$), embora nenhuma diferença tenha sido observada nos níveis de ALT (**Figura 17c**). Como a lesão hepática na isquemia-reperfusão pode ser mediada por um ambiente pró-inflamatório e pró-necrótico, avaliou-se também os níveis de RNAm das interleucinas pró-inflamatórias 1 e 6 (*IL-1* e *IL-6*, respectivamente). Observou-se que ambas as citocinas estavam ainda mais aumentadas nos animais KO (**Figura 17d**). Por fim, a apoptose, avaliada por meio da imunomarcagem do DNA de fita simples (ssDNA), diminuiu em camundongos ITPR3 LSKO em comparação com camundongos WT ($p < 0,05$) (**Figura 17e**).

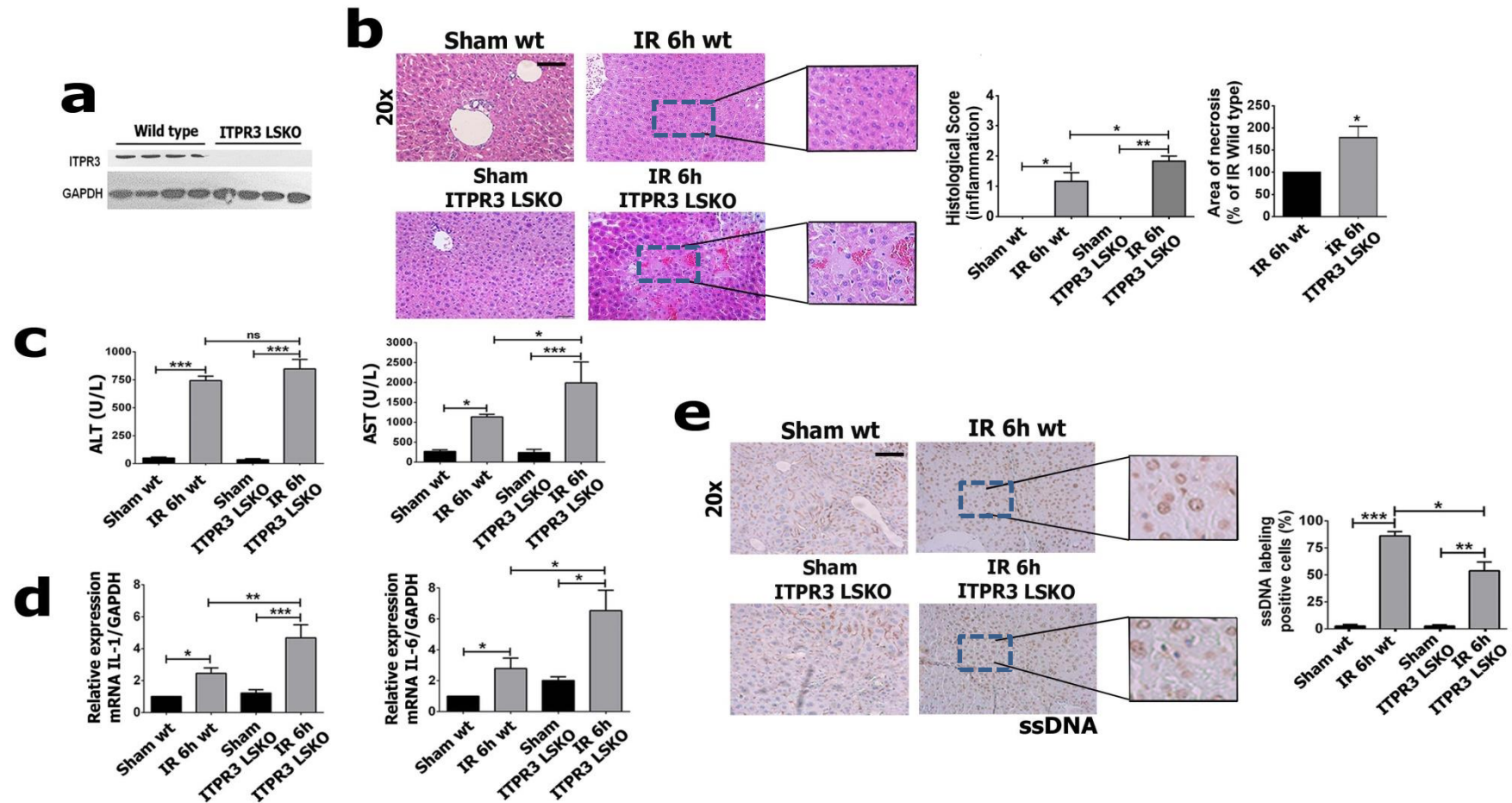


Figura 17 - A lesão causada pela isquemia-reperfusão hepática é pior em camundongos ITPR3 LSKO. (a) Western blot da proteína hepática total de ITPR3 em camundongos do tipo selvagem (WT) e nocaute específico do fígado para ITPR3 (ITPR3 LSKO). (b) Fotomicrografia do fígado mostrando um aumento nas áreas necróticas na LSKO em relação ao TP. Níveis séricos de (c) AST e ALT, níveis relativos de RNAm para (d) IL-6 e IL-1. (e) A imuno-histoquímica do ssDNA (em marrom) e sua quantificação mostrando a extensão da apoptose são atenuadas em camundongos ITPR3 LSKO e WT. Barra de escala, 50 μ m. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n = 5$ animais por grupo, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Tomados em conjunto, esses resultados mostram que o ITPR3 desempenha um papel protetor durante a isquemia-reperfusão, estando essa função relacionada apenas com a expressão deste canal, uma vez que não houve alteração dos níveis de RNAm de *ITPR1* e *ITPR2* (**Figura 18**).

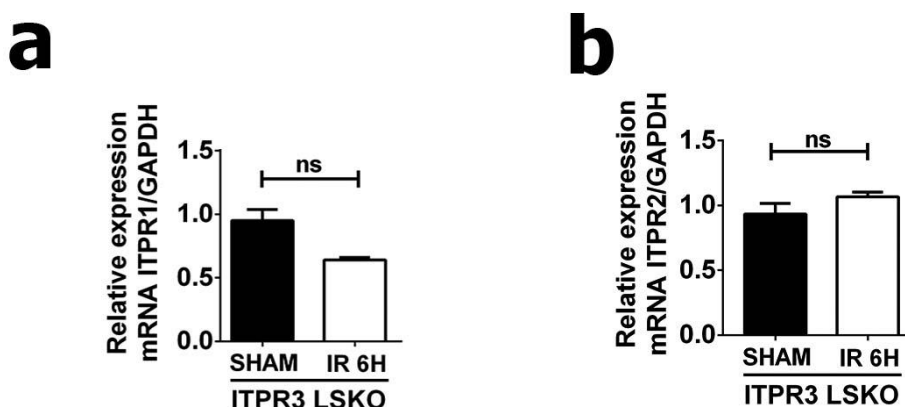


Figura 18 – Isoformas de *ITPR1* e *ITPR2* não encontram-se com expressão alteradas em animais knockout específico para o *ITPR3* do fígado (*ITPR3-LSKO*) após isquemia-reperfusão hepática. Expressão relativa dos níveis de RNAm para (a) *ITPR1* e (b) *ITPR2* em animais *ITPR3-LSKO* após 75 minutos de isquemia e 6 horas de perfusão. Valores expressos em média $\pm$ SEM, $n=5$ animais por grupo, ns- não significativo.

Esses achados são importantes porque demonstram, pela primeira vez, a função e expressão do ITPR3 induzidos pela hipóxia durante a isquemia-reperfusão hepática. Levando em consideração que os hepatócitos expressam apenas o ITPR1 e o ITPR2 (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002), e que os sinais de Ca^{2+} mitocondriais são diretamente dependentes do Ca^{2+} liberado pelo RE (HIRATA; PUSL; O'NEILL; DRANOFF *et al.*, 2002; SNEYD; TSANEVA-ATANASOVA; BRUCE; STRAUB *et al.*, 2003), a expressão adicional do ITPR3 no RE levaria à competição pelo InsP_3 , resultando na

redução dos sinais apoptóticos induzidos pela via ITPR1-RE-mitocôndrias (FERIOD; OLIVEIRA; GUERRA; NGUYEN *et al.*, 2017). Por sua vez, o ITPR3 tem menor afinidade para o InsP3 (RAMOS-FRANCO; BARE; CAENEPEEL; NANI *et al.*, 2000), o que auxiliaria ainda mais na redução dos sinais de Ca^{2+} já observados.

Neste sentido, já foi descrito que a expressão *de novo* do ITPR3 na febre amarela desempenha um papel protetor nos hepatócitos, através do aumento da sinalização de Ca^{2+} nuclear e com isso, aumento da proliferação celular (LEMOS; FRANÇA; LIMA FILHO; FLORENTINO *et al.*). Em comparação aos eventos inflamatórios agudos que ocorrem na isquemia-reperfusão, o efeito protetor do ITPR3 não está associado ao aumento da sinalização de Ca^{2+} nuclear (**figura 10**), mas sim com a diminuição da necrose e aumento da apoptose, similar ao encontrado em casos de colangiocarcinoma (UEASILAMONGKOL; KHAMPHAYA; GUERRA; RODRIGUES *et al.*, 2019). Esta diferença de sinalização de Ca^{2+} nos casos de isquemia-reperfusão e infecção pela febre amarela, também são explicadas em parte pelo aumento do ITPR2 (LEMOS; FRANÇA; LIMA FILHO; FLORENTINO *et al.*).

Um segundo exemplo para a expressão de ITPR3 em hepatócitos é também contrária a ideia de que a expressão do ITPR3 pode aumentar a apoptose. Foi observado que em casos de hepatócitos que expressam ITPR3 cronicamente, como no CHC, as células apresentam resistência à apoptose como forma de adaptação aos eventos agudos (GUERRA; FLORENTINO; FRANCA; LIMA FILHO *et al.*, 2019). Entretanto, esta diferença relaciona-se com o fato de que em lesões hepáticas agudas, como o caso da isquemia-reperfusão, a expressão do ITPR3 é transitória e leva à apoptose, enquanto

que a sua expressão de forma constitutiva está envolvido na evasão da apoptose, levando a formação de hepatócitos cancerígenos. Destaca-se também o fato de que nos dois exemplos citados, Febre amarela e CHC, o ambiente em que o hepatócitos estão inseridos também é diferenciado. Na isquemia-reperfusão os hepatócitos recebem estímulos advindos da hipóxia e inflamação gerada, enquanto que na infecção por febre amarela, não havia inflamação significativa, e no CHC, diversas cascatas de sinalização intracelular também estão alteradas.

Além disso, é importante ressaltar que a ciclosporina é um importante agente anti-inflamatório utilizado para a diminuição do risco de rejeição pós-transplante hepático e tem se mostrado um importante fator de redução das complicações após isquemia-reperfusão (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005; YAMANOI; NAGASUE; KOHNO; CHANG *et al.*, 1991). Como apresentado na **Figura 19**, camundongos pré-tratados com ciclosporina possuem menor dano tecidual, níveis de interleucinas pró-inflamatórias e concentração de transaminases séricas, em comparação aos animais sem pré-tratamento. Mesmo não sendo tão eficaz quanto o pré-tratamento com ciclosporina devido sua ação anti-inflamatória, a expressão do ITPR3 durante a isquemia-reperfusão hepática sugere ser um evento protetor propriamente dos hepatócitos.

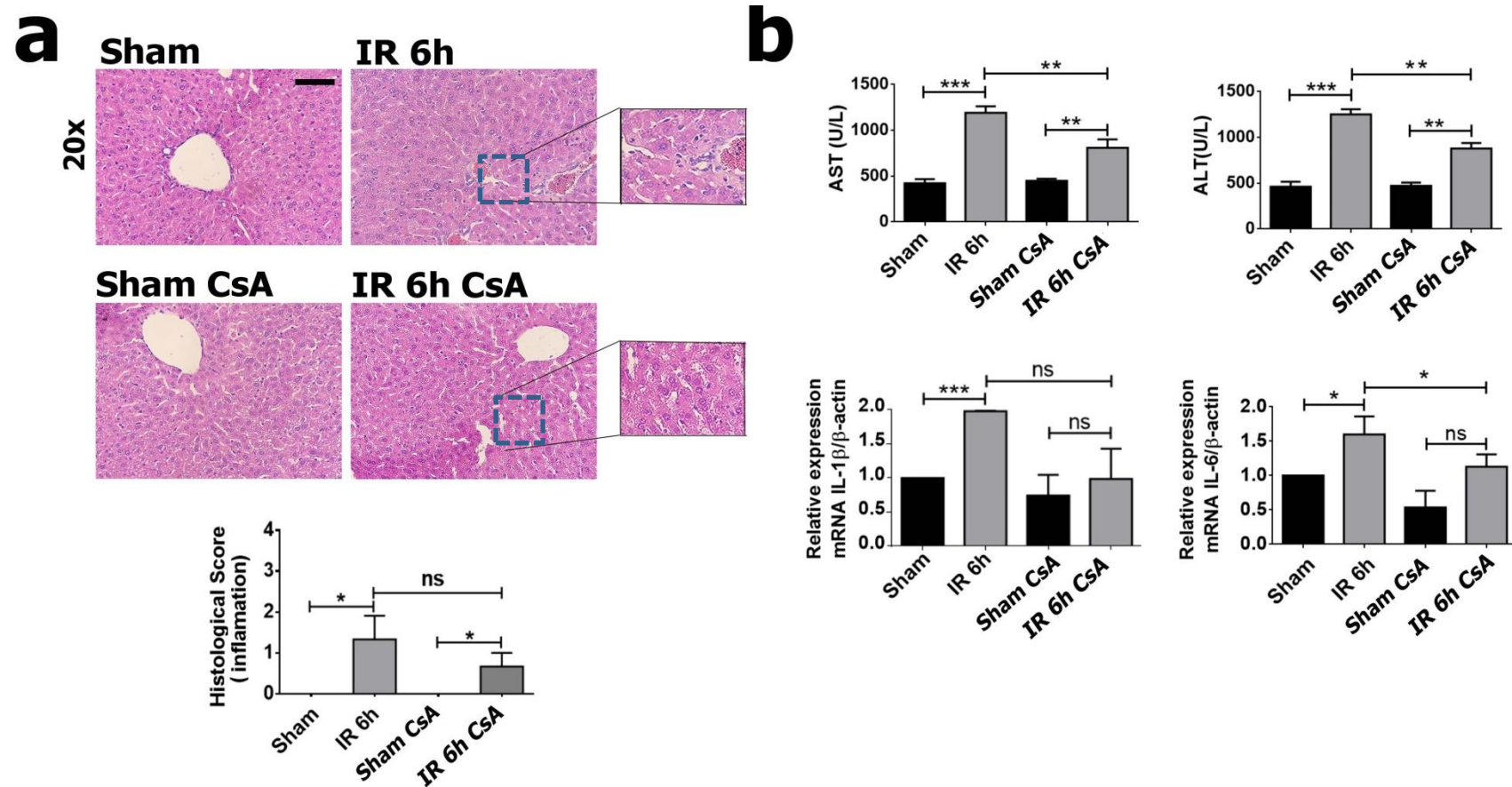


Figura 19 - O pré-tratamento com ciclosporina (CsA) melhora a lesão de isquemia-reperfusão. Coloração com HE, dosagem de AST e ALT (U/L) e níveis relativos de RNAm de IL-1 β e IL-6 após IR. Barra de escala, 50 μ m. Os animais controle sham não foram submetidos ao procedimento de isquemia, havendo pré-tratamento ou não com inibidor da ativação da NFAT. Valores expressos em média $\pm$ SEM, ns - não significativo, n = 5 animais por grupo, * p <0,05 ** p <0,01 *** p <0,001.

A lesão de isquemia-reperfusão está associada ao aumento do risco de disfunção primária do enxerto após o transplante de fígado, devido à ativação local da maquinaria de estresse oxidativo e processo inflamatório (CANNISTRA; RUGGIERO; ZULLO; GALLELLI *et al.*, 2016; CASILLAS-RAMIREZ; MOSBAH; RAMALHO; ROSELLO-CATAFAU *et al.*, 2006). Para investigar a relevância clínica da expressão do ITPR3 neste contexto, amostras de fígado humano foram coletadas de pacientes diagnosticados com trombose aguda da artéria hepática 72 horas após o transplante foram marcadas para NFAT e ITPR3 (**Figura 20**). A trombose da artéria hepática é uma complicação grave no transplante ortotópico de fígado, sendo uma das principais causas de disfunção precoce do enxerto (LU; ZHOU; NI; WANG *et al.*, 2016; PAREJA; CORTES; NAVARRO; SANJUAN *et al.*, 2010). Após avaliação da marcação NFAT, observou-se que o mesmo estava presente no núcleo das células (**Figura 20a**) e, além disso, havia marcação citoplasmática de ITPR3 (**Figura 20b**) em todas as amostras de fígado humano lesadas por isquemia. Desta forma, estes resultados fornecem evidências de que a expressão do ITPR3 *de novo* ocorre em resposta à isquemia hepática em pacientes e que é mediada pelo menos em parte pela ativação do NFAT, corroborando com os resultados já apresentados em modelo animal.

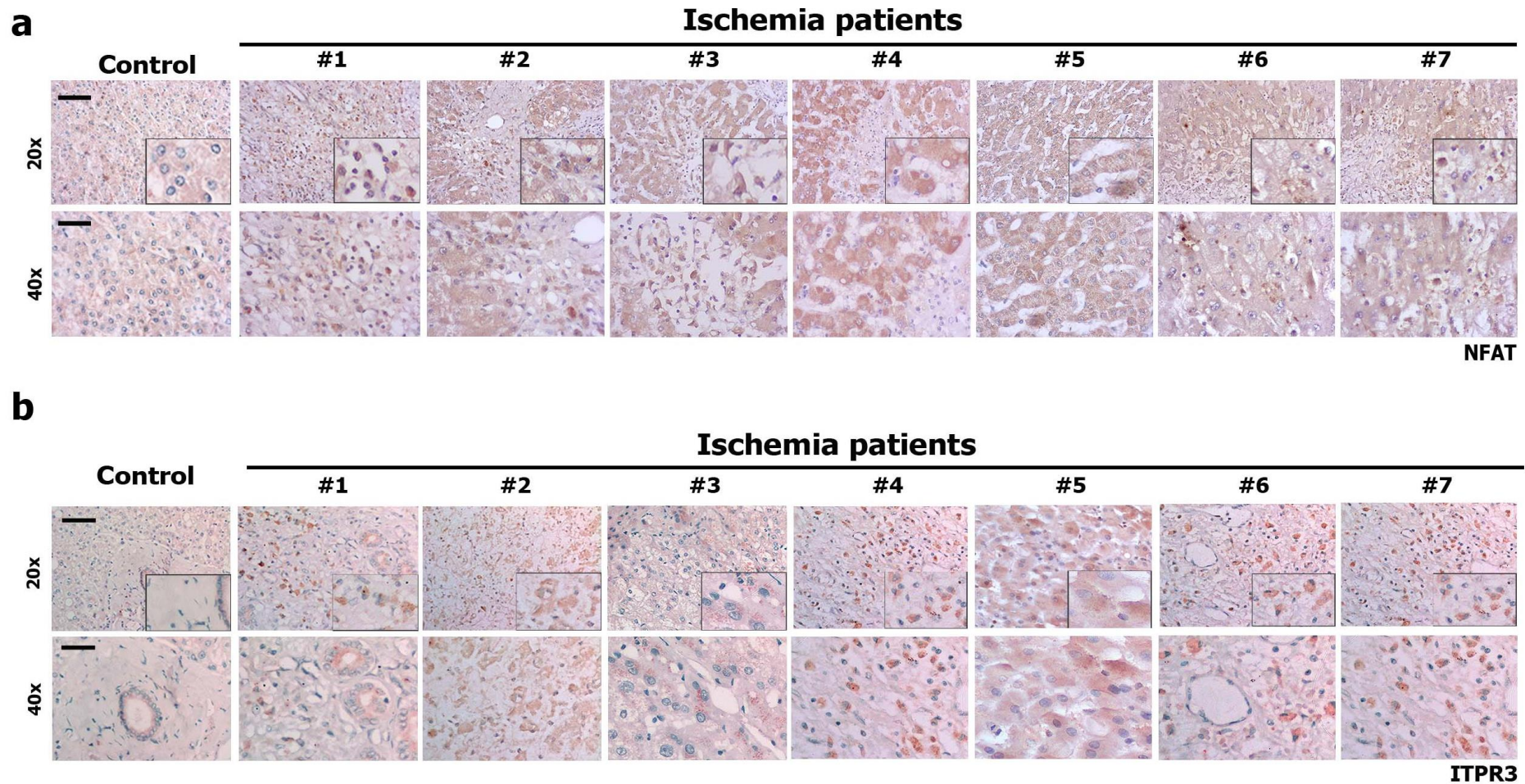
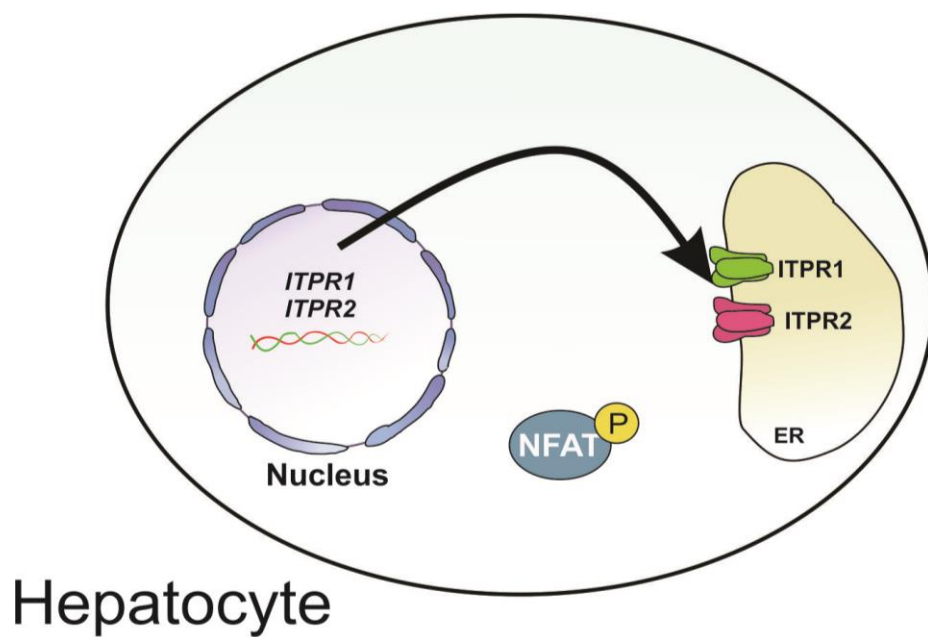


Figura 20 – ITPR3 esta expresso após isquemia hepática em humanos. Imuno-histoquímica representativa para (a) NFAT e (b) ITPR3 em pacientes diagnosticados com isquemia hepática após bloqueio da artéria hepática, mostrando que há translocação nuclear (ativação) do NFAT e aumento da expressão do ITPR3 (ambos em marrom). Os ductos biliares na figura 7b representam um controle positivo para a coloração de ITPR3. Barras de escala, 50 e 25 μ m. Controle: tecidos histologicamente normais obtidos a partir de ressecções hepáticas de pacientes com câncer de cólon metastático.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, estes resultados mostram que a desmetilação promovida pela hipóxia, associada à ativação do NFAT, levam à expressão do ITPR3 em hepatócitos após a isquemia-reperfusão, sendo a expressão deste canal de Ca^{2+} importante para o processo de proteção do fígado.

Normal condition



Hepatic ischemia reperfusion

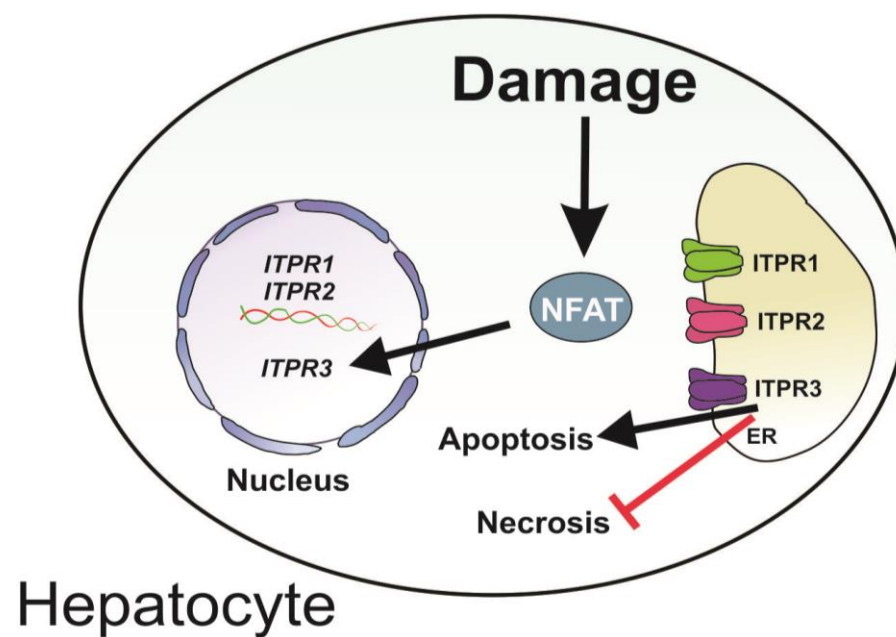


Figura 21- Possível mecanismo molecular induzido pela isquemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAYA, M. J.; NATHANSON, M. H. Calcium signaling in the liver. **Comprehensive Physiology**, 3, n. 1, p. 515-539, 2013.

ARAMBURU, J.; YAFFE, M. B.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C.; CANTLEY, L. C. *et al.* Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. **Science**, 285, n. 5436, p. 2129-2133, Sep 24 1999.

BERRIDGE, M. J. The AM and FM of calcium signalling. **Nature**, 386, n. 6627, p. 759-760, 1997/04/01 1997.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 4, n. 7, p. 517-529, Jul 2003.

BHATIA, S. N.; UNDERHILL, G. H.; ZARET, K. S.; FOX, I. J. Cell and tissue engineering for liver disease. **Science Translational Medicine**, 6, n. 245, p. 245sr242, 2014.

BIRRER, R.; TAKUDA, Y.; TAKARA, T. Hypoxic hepatopathy: pathophysiology and prognosis. **Intern Med**, 46, n. 14, p. 1063-1070, 2007.

BISMUTH, H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. **World Journal of Surgery**, 6, n. 1, p. 3-9, 1982/01/01 1982.

CANNISTRA, M.; RUGGIERO, M.; ZULLO, A.; GALLELLI, G. *et al.* Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. **Int J Surg**, 33 Suppl 1, p. S57-70, Sep 2016.

CASILLAS-RAMIREZ, A.; MOSBAH, I. B.; RAMALHO, F.; ROSELLO-CATAFAU, J. *et al.* Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. **Life Sci**, 79, n. 20, p. 1881-1894, Oct 12 2006.

CHEDID, M. F.; KRUEL, C. R. P.; PINTO, M. A.; GREZZANA-FILHO, T. J. M. *et al.* HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. **Arq Bras Cir Dig**, 30, n. 4, p. 272-278, Oct-Dec 2017.

DAVID, B. A.; REZENDE, R. M.; ANTUNES, M. M.; SANTOS, M. M. *et al.* Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. **Gastroenterology**, 151, n. 6, p. 1176-1191, Dec 2016.

DEPPING, R.; STEINHOFF, A.; SCHINDLER, S. G.; FRIEDRICH, B. *et al.* Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. **Biochim Biophys Acta**, 1783, n. 3, p. 394-404, Mar 2008.

DHAR, D. K.; TAKEMOTO, Y.; NAGASUE, N.; UCHIDA, M. *et al.* FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. **J Surg Res**, 60, n. 1, p. 142-146, Jan 1996.

DIMAURO, I.; PEARSON, T.; CAPOROSSO, D.; JACKSON, M. J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC Res Notes**, 5, p. 513, Sep 20 2012.

ECHEVARRÍA, W.; LEITE, M. F.; GUERRA, M. T.; ZIPFEL, W. R. *et al.* Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nature Cell Biology**, 5, n. 5, p. 440-446, 2003/05/01 2003.

FARBER, J. L. The role of calcium in cell death. **Life Sci**, 29, n. 13, p. 1289-1295, Sep 28 1981.

FERIOD, C. N.; OLIVEIRA, A. G.; GUERRA, M. T.; NGUYEN, L. *et al.* Hepatic Inositol 1,4,5 Trisphosphate Receptor Type 1 Mediates Fatty Liver. **Hepatol Commun**, 1, n. 1, p. 23-35, Feb 2017.

FRANCA, A.; CARLOS MELO LIMA FILHO, A.; GUERRA, M. T.; WEERACHAYAPHORN, J. *et al.* Effects of Endotoxin on Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Human Cholangiocytes. **Hepatology**, 69, n. 2, p. 817-830, Feb 2019.

GASBARRINI, A.; BORLE, A. B.; FARGHALI, H.; BENDER, C. *et al.* Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes. **J Biol Chem**, 267, n. 10, p. 6654-6663, Apr 5 1992.

GUERRA, M. T.; FLORENTINO, R. M.; FRANCA, A.; LIMA FILHO, A. C. *et al.* Expression of the type 3 InsP3 receptor is a final common event in the

development of hepatocellular carcinoma. **Gut**, 68, n. 9, p. 1676-1687, Sep 2019.

GUERRA, M. T.; FONSECA, E. A.; MELO, F. M.; ANDRADE, V. A. *et al.* Mitochondrial calcium regulates rat liver regeneration through the modulation of apoptosis. **Hepatology**, 54, n. 1, p. 296-306, Jul 2011.

HARDINGHAM, G. E.; CHAWLA, S.; JOHNSON, C. M.; BADING, H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. **Nature**, 385, n. 6613, p. 260-265, Jan 16 1997.

HATA, S.; NAMAIE, M.; NISHINA, H. Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy. **Development, Growth & Differentiation**, 49, n. 2, p. 163-170, 2007/02/01 2007.

HIRATA, K.; PUSL, T.; O'NEILL, A. F.; DRANOFF, J. A. *et al.* The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca²⁺ waves in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, 122, n. 4, p. 1088-1100, Apr 2002.

HUPPERT, S. S.; IWAFUCHI-DOI, M. Chapter Four - Molecular regulation of mammalian hepatic architecture. *In*: WELLIK, D. M. (Ed.). **Current Topics in Developmental Biology**: Academic Press, 2019. v. 132, p. 91-136.

ITEM, C. B.; SCHANZER, A.; METZ, T.; GREBER-PLATZER, S. *et al.* Demethylation of the hypoxia induction factor 1 binding site of GPX3 at excess blood ammonia in propionic acidemia. **Clin Biochem**, 66, p. 100-102, Apr 2019.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. **J Gastroenterol Hepatol**, 26 Suppl 1, p. 173-179, Jan 2011.

JIN, X.; ZHANG, Y.; ALHARBI, A.; HANBASHI, A. *et al.* Targeting Two-Pore Channels: Current Progress and Future Challenges. **Trends Pharmacol Sci**, 41, n. 8, p. 582-594, Aug 2020.

KENNETH, N. S.; ROCHA, S. Regulation of gene expression by hypoxia. **Biochem J**, 414, n. 1, p. 19-29, Aug 15 2008.

KHAMPHAYA, T.; CHUKIJRUNGROAT, N.; SAENGSRISUWAN, V.; MITCHELL-RICHARDS, K. A. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease impairs expression of the type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **Hepatology**, Oct 10 2017.

KRISHNA, M. Microscopic anatomy of the liver. **Clinical Liver Disease**, 2, n. S1, p. S4-S7, 2013/03/01 2013.

LEE, J. W.; KO, J.; JU, C.; ELTZSCHIG, H. K. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. **Experimental & Molecular Medicine**, 51, n. 6, p. 1-13, 2019/06/01 2019.

LEITE, M. F.; THROWER, E. C.; ECHEVARRIA, W.; KOULEN, P. *et al.* Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 5, p. 2975-2980, Mar 4 2003.

LEMOS, F. d. O.; FRANÇA, A.; LIMA FILHO, A. C. M.; FLORENTINO, R. M. *et al.* Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection. **Hepatology Communications**, n/a, n. n/a.

LEMOS, F. O.; FLORENTINO, R. M.; LIMA FILHO, A. C. M.; DOS SANTOS, M. L. *et al.* Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in the liver: Expression and function. **World J Gastroenterol**, 25, n. 44, p. 6483-6494, Nov 28 2019.

LIU, X.; LUO, G.; JIANG, J.; MA, T. *et al.* Signaling through hepatocyte vasopressin receptor 1 protects mouse liver from ischemia-reperfusion injury. **Oncotarget**, 7, n. 43, p. 69276-69290, 2016.

LU, L.; ZHOU, H.; NI, M.; WANG, X. *et al.* Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. **Transplantation**, 100, n. 12, p. 2601-2610, Dec 2016.

MAHER, J. J. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. **J Clin Invest**, 91, n. 5, p. 2244-2252, May 1993.

MELLSTROM, B.; SAVIGNAC, M.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; NARANJO, J. R. Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. **Physiol Rev**, 88, n. 2, p. 421-449, Apr 2008.

MENDES, C. C.; GOMES, D. A.; THOMPSON, M.; SOUTO, N. C. *et al.* The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. **J Biol Chem**, 280, n. 49, p. 40892-40900, Dec 9 2005.

MIKOSHIBA, K. The InsP₃ receptor and intracellular Ca²⁺ signaling. **Curr Opin Neurobiol**, 7, n. 3, p. 339-345, Jun 1997.

MIKOSHIBA, K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. **J Neurochem**, 102, n. 5, p. 1426-1446, Sep 2007.

NATHANSON, M. H.; BURGSTAHLER, A. D.; MENNONE, A.; FALLON, M. B. *et al.* Ca²⁺ waves are organized among hepatocytes in the intact organ. **Am J Physiol**, 269, n. 1 Pt 1, p. G167-171, Jul 1995.

OH-HORA, M.; RAO, A. The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells. **Microbes Infect**, 11, n. 5, p. 612-619, Apr 2009.

PAREDES, R. M.; ETZLER, J. C.; WATTS, L. T.; ZHENG, W. *et al.* Chemical calcium indicators. **Methods**, 46, n. 3, p. 143-151, Nov 2008.

PAREJA, E.; CORTES, M.; NAVARRO, R.; SANJUAN, F. *et al.* Vascular complications after orthotopic liver transplantation: hepatic artery thrombosis. **Transplant Proc**, 42, n. 8, p. 2970-2972, Oct 2010.

PENG, S. L.; GERTH, A. J.; RANGER, A. M.; GLIMCHER, L. H. NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. **Immunity**, 14, n. 1, p. 13-20, Jan 2001.

PERRY, R. J.; ZHANG, D.; GUERRA, M. T.; BRILL, A. L. *et al.* Glucagon stimulates gluconeogenesis by INSP3R1-mediated hepatic lipolysis. **Nature**, 579, n. 7798, p. 279-283, 2020/03/01 2020.

RAMOS-FRANCO, J.; BARE, D.; CAENEPEEL, S.; NANI, A. *et al.* Single-channel function of recombinant type 2 inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. **Biophysical journal**, 79, n. 3, p. 1388-1399, 2000.

REZENDE, K. M.; BONECKER, M.; PEREZ, C. A.; MANTESSO, A. Synchrotron radiation X-ray micro-fluorescence: Protocol to study mesenchymal stem cells. **Microsc Res Tech**, 79, n. 3, p. 149-154, Mar 2016.

RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; LEITE, M. F.; GRANT, W. *et al.* Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. **J Biol Chem**, 282, n. 23, p. 17061-17068, Jun 8 2007.

SHIBAO, K.; HIRATA, K.; ROBERT, M. E.; NATHANSON, M. H. Loss of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors from bile duct epithelia is a common event in cholestasis. **Gastroenterology**, 125, n. 4, p. 1175-1187, Oct 2003.

SNEYD, J.; TSANEVA-ATANASOVA, K.; BRUCE, J. I.; STRAUB, S. V. *et al.* A model of calcium waves in pancreatic and parotid acinar cells. **Biophys J**, 85, n. 3, p. 1392-1405, Sep 2003.

SONG, A. T. W.; ABDALA, E.; DE MARTINO, R. B.; MALBOUISSON, L. M. S. *et al.* Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Attributed to Yellow Fever. **Hepatology**, 69, n. 3, p. 1349-1352, Mar 2019.

STRZYZ, P. Hypoxia as an off switch for gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 17, p. 610, 09/01/online 2016.

TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J.; BRADLEY, J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Crit Rev Oncol Hematol**, 56, n. 1, p. 23-46, Oct 2005.

TORDJMAN, T.; BERTHON, B.; JACQUEMIN, E.; CLAIR, C. *et al.* Receptor-oriented intercellular calcium waves evoked by vasopressin in rat hepatocytes. **Embo j**, 17, n. 16, p. 4695-4703, Aug 17 1998.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Curr Biol**, 27, n. 21, p. R1147-r1151, Nov 6 2017.

UEASILAMONGKOL, P.; KHAMPHAYA, T.; GUERRA, M. T.; RODRIGUES, M. A. *et al.* Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Increased and Enhances Malignant Properties in Cholangiocarcinoma. **Hepatology**, Jun 28 2019.

UEMURA, T.; RANDALL, H. B.; SANCHEZ, E. Q.; IKEGAMI, T. *et al.* Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. **Liver Transpl**, 13, n. 2, p. 227-233, Feb 2007.

WANG, F. S.; FAN, J. G.; ZHANG, Z.; GAO, B. *et al.* The global burden of liver disease: the major impact of China. **Hepatology**, 60, n. 6, p. 2099-2108, Dec 2014.

WANG, H. G.; PATHAN, N.; ETHELL, I. M.; KRAJEWSKI, S. *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. **Science**, 284, n. 5412, p. 339-343, Apr 9 1999.

WANG, X.; BI, Y.; XUE, L.; LIAO, J. *et al.* The calcineurin-NFAT axis controls allograft immunity in myeloid-derived suppressor cells through reprogramming T cell differentiation. **Mol Cell Biol**, 35, n. 3, p. 598-609, Feb 2015.

WEERACHAYAPHORN, J.; AMAYA, M. J.; SPIRLI, C.; CHANSELA, P. *et al.* Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 Regulates Expression of Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and Calcium Signaling in Cholangiocytes. **Gastroenterology**, 149, n. 1, p. 211-222.e210, Jul 2015.

WISSE, E.; BRAET, F.; DIANZHONG, L.; DE ZANGER, R. *et al.* Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. **Toxicologic Pathology**, 24, n. 1, p. 100-111, 1996/01/01 1996.

YAMANOI, A.; NAGASUE, N.; KOHNO, H.; CHANG, Y. C. *et al.* Attenuation of ischemia-reperfusion injury of the liver in dogs by cyclosporine. A comparative study with allopurinol and methylprednisolone. **Transplantation**, 52, n. 1, p. 27-30, Jul 1991.

YAN, S.; ZHOU, B.; ZHANG, Q.; LI, Z. *et al.* Hepatic venous occlusion causes more impairment after reperfusion compared with portal clamping in a murine model. **J Surg Res**, 169, n. 1, p. 117-124, Jul 2011.

ZHANG, Y. J.; MEI, H. S.; WANG, C.; WANG, Y. L. *et al.* Involvement of nuclear factor of activated T-cells (NFATc) in calcineurin-mediated ischemic brain damage in vivo. **Yao Xue Xue Bao**, 40, n. 4, p. 299-305, Apr 2005.