UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

EXPRESSÃO GÊNICA DE TLR-2, TLR-4, HMGB1 E VEGF EM ÚLCERAS ABOMASAIS EM BOVINOS DE CORTE

LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN
Enfermeiro

ARAÇATUBA - SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

EXPRESSÃO GÊNICA DE TLR-2, TLR-4, HMGB1 E VEGF EM ÚLCERAS ABOMASAIS EM BOVINOS DE CORTE

Leonardo Aparecido Teixeira Bentin
Orientadora: Prof.ª Adjunto Juliana Regina Peiró

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais).

ARAÇATUBA - SP
2016

Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B476e

Bentin, Leonardo Aparecido Teixeira.
Expressão gênica de TLR-2, TLR-4, HMGB1 e VEGF em úlceras abomasais em bovinos de corte / Leonardo Aparecido Teixeira Bentin. - Araçatuba, 2015
37 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Orientadora: Profa. Juliana Regina Peiró

1. Abomaso 2. Cicatrização 3. Doenças dos bovinos 4. Proteína HMGB1 5. Úlcera I. T.

CDD 636.0896

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Expressão gênica de TLR-2, TLR-4, HMGB1 e VEGF em úlcera abomasal em bovinos de corte

AUTOR: LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN

ORIENTADORA: Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Dra. LINA MARIA WEHRLE GOMIDE

Dr. JOSÉ PAES DE OLIVEIRA FILHO

Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

DATA DA REALIZAÇÃO: 5 de janeiro de 2016.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEONARDO APARECIDO TEIXEIRA BENTIN – Penápolis – SP, 31 de março de 1983. Graduação em Enfermagem pela Universidade Paulista – UNIP, Câmpus de Araçatuba, São Paulo 17 de dezembro de 2005. Especialista em Enfermagem em Unidade de Terapia Intensiva pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo 15 de março de 2008. Desde 2013 é aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.
Cora Carolina

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra em primeiro lugar a Deus, por me guiar em todos os momentos da minha vida e abençoar-me com saúde, força e coragem para não desistir diante das dificuldades do caminho.

A minha esposa Andressa e meu filho João Pedro pela paciência e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao meu amigo Diogo Gaubeur de Camargo por me apresentar a minha orientadora, obrigado “irmão”.

“In memorian” de Joannes Wilhelmmus Braen, pela oportunidade, ensinamentos e educação.

A minha orientadora Prof.ª Adjunto Juliana R. Peiró pelos ensinamentos, amizade, confiança, estímulo, paciência, parceria e principalmente pela oportunidade durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar nesta estrada tortuosa me guiando pelo caminho certo.

Ao professor Fernando Cristiano Morelli, pelas aventuras e ensinamentos durante as coletas das amostras.

À Priscila Dalmagro pela paciência e apoio durante todos esses anos.

Às professoras Gisele Fabrino Machado e Flavia Lombardi Lopes pela valorosa contribuição neste projeto.

Ao professor Luiz Claudio Nogueira Mendes pela disposição em contribuir para o projeto.

À toda equipe “Gangue Peiró” na pós-graduação, pelo incentivo e amizade.

Aos professores do programa de pós-graduação da FMVA, pelas disciplinas ministradas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da FMVA-UNESP, na pessoa de sua Coordenadora, por toda a minha formação e pelos valiosos conhecimentos adquiridos graças ao corpo docente dedicado e extremamente competente.

Ao funcionário do Serviço de Patologia Veterinária da FMVA-UNESP Lorinaldo Lopes de Moraes pela ajuda na preparação das lâminas de histopatologia.

Agradeço aos funcionários da biblioteca do campus de Araçatuba por sempre serem muito prestativos e solícitos.

A minha orientadora professora Adjunto Juliana R. Peiró pela oportunidade e ensinamentos, durante esses anos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE TABELA xi
RESUMO.. xii
SUMMARY.....xiii
I. INTRODUÇÃO.....1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....3
III. MATERIAL E MÉTODOS.....7
IV. RESULTADOS 10
V. DISCUSSÃO 16
VI. CONCLUSÃO.....18
REFERÊNCIAS 19

LISTA DE ABREVIATURAS

HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade 1
TLR-2	Receptor Toll-like 2
TLR-4	Receptor Toll-like 4
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
RT qPCR	Transcriptase reversa quantitativa da reação em cadeia da polimerase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL1-a	Interleucina 1 a
IL1-b	Interleucina 1 b
IL6	Interleucina 6
IL1-Ra	Interleucina 1 receptor a
IL8	Interleucina 8
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-1β	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
LPS	Lipopolissacarídeo
RAGE	Receptor avançado de produtos de glicação
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase
HE	Hematoxilina e eosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Liberação extracelular de HMGB1. [A] Liberação a partir da estimulação ativa de macrófago. [B] Liberação passiva durante a necrose e apopitose. Fonte: (HARRIS et al., 2012) 5

Figura 2: HMGB1 extracelular se liga a receptores de membrana celular como TLR-2, TLR-4 e RAGE, regulando produção de citocinas. RAGE – Receptor avançado de produtos de glicação, LPS – lipopolissacarídeo. Fonte: (LEE et al., 2014) 6

Figura 3: Classificação macroscópica das úlceras abomasais. [A] Abomaso normal – Tecido íntegro sem presença de lesões. [B] Ulceração de grau 1 – Ulceração e erosão não perfuradas com mínima lesão na mucosa. [C] Ulceração de grau 2 – Ulceração e erosão não perfuradas combinadas com tecido desvitalizado. As setas de cor branca indicam as lesões. 11

Figura 4: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino. Abomaso normal, [a] presença de integridade de vilosidades (seta de cor azul), lamina própria (seta de cor verde), musculatura da mucosa (seta de cor laranja) e submucosa (seta de cor preta), [b] vilosidades íntegras com células parietais (seta de cor azul) e ducto gástrico (seta de cor verde) e [c] células parietais alinhadas (seta cor azul).....12

Figura 5: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino: Úlceras de grau 1, [d] presença de lesão com tecido necrótico (seta cor verde), [e] população de infiltrado inflamatório (seta cor laranja) e [f] infiltrado inflamatório mononuclear (seta de cor laranja). 13

Figura 6: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino: Úlceras de grau 2, [g] grande presença de tecido de revitalização (seta de cor azul), [h] presença de granulação (seta de cor azul), [i] presença de neutrófilos (seta de cor laranja).....14

Figura 7: Gráficos com médias dos grupos. Expressão gênica relativa dos genes HMGB1 [A], TLR-2 [B], TLR-4 [C] e VEGF [D]. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si p < 0,05. 15

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Sequências dos genes desenhados pelo Sistema online Prime3 selecionados para análise RT qPCR com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores 9

EXPRESSÃO GÊNICA DE TLR-2, TLR-4, HMGB1 E VEGF EM ÚLCERAS ABOMASAIS EM BOVINOS DE CORTE

RESUMO

As úlceras abomasais atingem bovinos de todas as idades e raças em todos os sistemas de produção, gerando perdas econômicas. A úlcera resulta da isquemia, atraindo leucócitos e macrófagos, estimulando fibroblastos, células endoteliais e epiteliais. A proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) liga-se a diferentes receptores de superfície celular, incluindo Toll-like-2 (TLR-2) e -4 (TLR-4), produzindo citocinas. A presença da HMGB1 causa aumento dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um regulador fundamental da angiogênese. Assim, investigou-se a participação da HMGB1, TLR-2, TLR-4 e VEGF em úlceras abomasais em bovinos de corte. Um total de 150 abomasos de bovinos de corte foi examinado em um abatedouro; 17 amostras da região cárdica foram colhidas. Os tecidos extraídos foram classificados em grupo normal (sem ulceração de mucosa); ulceração de grau 1 (erosões não perfuradas com lesões mínimas da mucosa) e ulceração de grau 2 (erosões não perfuradas combinadas com sangramento moderado da mucosa) e confirmado pela histopatologia. A expressão dos genes nas amostras normais ou ulceradas no abomaso foi avaliada pela RT qPCR. Os dados foram submetidos à ANOVA seguido por teste de Bonferroni ao nível de $p<0,05$. Não houve diferença de expressão de HMGB1, de TLR-4 e de VEGF entre os dois tipos de úlceras em relação aos abomasos normais. Úlceras de grau 2 tiveram expressão de TLR-2 superior a úlceras de grau 1. O aumento da expressão de TLR-2 pode estar associado à manutenção da cicatrização, promovendo a resposta inflamatória, evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear e neutrófilos.

Palavras chaves: abomaso, cicatrização, doenças de bovinos, proteína HMGB1, úlceras

GENE EXPRESSION OF TLR-2, TLR-4, HMGB1 AND VEGF IN ABOMASUM ULCER OF BEFF CATTLE

SUMMARY

Abomasal ulcers affect cattle of all ages and breeds in all production systems, leading to economic losses. The ulcer resulting from tissue ischemia, attracting leukocytes and macrophages, stimulates fibroblasts, endothelial and epithelial cells. The protein of high mobility group 1 (HMGB1) binds to different cell surface receptors, including Toll-like-2 (TLR-2) and 4 (TLR-4) resulting in cytokine production. The presence of HMGB1 causes increased levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), a key regulator of angiogenesis. Thus, it was investigated whether HMGB1, TLR-2, TLR-4 and VEGF play a role in abomasal ulcers in beef cattle. A total of 150 abomasums from beef cattle were examined in a slaughterhouse; 17 samples were collected from the cardiac region. The extracted tissues were divided into normal group (without ulceration of the mucosa); type 1 ulcers (unperforated erosions with minimal mucosal injury) and type 2 ulcers (unperforated erosions combined with moderate bleeding of the mucosa) and confirmed by histopathology. Gene expression was evaluated by RT qPCR in samples of normal or ulcerated abomasums. Data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni test at $p < 0.05$. No difference in expression of HMGB1, TLR-4 and VEGF was detected between the two types of ulcers when compared to normal abomasums. TLR-2 expression was higher in type 2 ulcers than in type 1 ulcers. Increased TLR-2 expression might be associated with the maintenance of abomasal healing, promoting the inflammatory response, as evidenced by the presence of mononuclear cell infiltration and neutrophils.

Keywords: abomasum, cattle deseases, healing, HMGB1 protein, ulcers

I. INTRODUÇÃO

As úlceras abomasais provocam indigestão e atingem bovinos de todas as idades e raças em todos os sistemas de produção, causando importantes perdas econômicas (PALMER et al., 2001; MARSHALL, 2009; HUND et al., 2015). O estômago do ruminante está subdividido em quatro compartimentos: o rúmem, retículo, omaso e abomaso (SCALA et al., 2011). O abomaso é considerado o "estômago verdadeiro", tendo funções semelhantes àquelas em humanos, produzindo ácido clorídrico e enzimas que iniciam a digestão de proteínas (HALL, 2009). As erosões abomasais são classificadas em quatro categorias, grau 1: úlcera não perfurada, com erosão superficial da mucosa e de hemorragia intraluminal mínima; grau 2: lesão mais profunda, porém não perfurada com comprometimento de vasos sanguíneos, causando hemorragia intraluminal significativa; grau 3: lesão com perfuração da parede abomasal e peritonite local e grau 4: lesão com perfuração da parede abomasal, porém com peritonite difusa (MARSHALL, 2009; HUND et al., 2015).

A úlcera é consequência da necrose tecidual desencadeada por isquemia da mucosa, ocorrendo a liberação de leucotrienos B e atração de leucócitos e macrófagos, que fagocitam o tecido necrosado e liberam citocinas pró-inflamatórias como por exemplo, TNF-α, lL-1a, e IL-1b (TARNAWSKI, 2005). A proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), também conhecida como anfoterina, foi descoberta há 30 anos (LI et al., 2003; PARK et al., 2004; ZHANG et al., 2008; LI et al., 2013). Expressa em quase todas as células nucleadas, é uma proteína nuclear altamente conservada, desempenha papéis importantes na organização da cromatina e regula a transcrição de proteínas de fase aguda (PALUMBO et al., 2004; MANGANELLI et al., 2010; PISETSKY et al., 2011). A HMGB1 é liberada passivamente durante a necrose celular, sendo secretada ativamente por células imunológicas, tais como monócitos e macrófagos (DOMMETT et al., 2005; BISCETTI, FEDERICO et al., 2010). Presente na lesão, a HMGB1 liberada por macrófagos estimula citocinas pró-inflamatórias, tais

como o TNF-α ou IL-6, e por sua vez pode estimular outras células na lesão a liberar mais mediadores inflamatórios como IL-1a, IL-1b, IL-1Ra, IL-6, IL-8 e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP)-1α e -1β (ANDERSSON et al., 2000; ZHANG et al., 2012).

No ambiente extracelular, a HMGB1 se liga a vários receptores de membrana entre eles os receptores Toll-like-2 (TLR-2) e -4 (TLR-4), sinalizando a resposta pró-inflamatória (PARK et al., 2004; ZHANG et al., 2012). A inflamação e a imunidade inata são a primeira linha de defesa, de tal forma que os TRL-2 e -4, através de sua via de sinalização intracelular, desencadeiam a cascata de ativação, promovendo a liberação de citocinas e quimiocinas (KAISHO e AKIRA, 2006; RIVA et al., 2010). A capacidade da HMGB1 em induzir a inflamação nas doenças gastrointestinais está clara e bem documentada em humanos (TAKAHASHI et al., 1997), ratos (WU et al., 2009), camundongos (YANG et al., 2010) e em suínos (SPLICHALOVA; SPLICHAL, 2012).

Os fatores de crescimento têm sido bastante estudados pela sua capacidade de regular as funções celulares essenciais na reparação tecidual (TAKAHASHI et al., 1997). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) estimula a angiogênese, processo considerado essencial no tecido de granulação para restabelecer o epitélio superficial, o epitélio glandular, a lâmina própria e a rede microvascular, oferecendo oxigenação local e contribuindo para a reparação da úlcera (TAKAHASHI et al., 1997; BISCETTI et al., 2010).

Devido seu papel pró-inflamatório o aumento da expressão de TLR-2 também pode estar associado à proteção e manutenção da mucosa na cicatrização, promovendo a resposta inflamatória e recrutando infiltrado inflamatório mononuclear e neutrófilos no compartimento abomasal (CARIO, 2008).

II. REVISÃO DA LITERATURA

Ulcerações abomasais são comumente encontradas em bovinos de diversas idades, sendo que inúmeros fatores estão envolvidos como manejo intensivo e dietas altamente ácidas (SPLICHALOVA; SPLICHAL, 2012). Múltiplas teorias têm sido sugeridas para explicar sua ocorrência, tais como abrasão da mucosa, deficiência nutricional, administração de anti-inflamatórios não esteroidais e bolas de pelos (MARSHALL, 2009; SASAKI et al., 2012; HUND et al., 2015).

O estômago do ruminante está subdividido em quatros compartimentos: o rúmen, retículo, omaso e abomaso (SCALA et al., 2011). O abomaso é considerado o "estômago verdadeiro" no ruminante, tendo as mesmas funções que no ser humano, produzindo ácido clorídrico e enzimas que iniciam a digestão de proteínas (HALL, 2009).

Fisiologicamente, a mucosa gástrica é protegida por uma linha de muco, bicarbonato e alta taxa de circulação de sangue no tecido submucoso, porém quando há um desequilíbrio entre o mecanismo de proteção e fatores agressivos, como ácido clorídrico e abrasão, danificam o revestimento gástrico provocando ulcerações (TARNAWSKI et al., 1995; HUND et al., 2015).

Alterações vasculares causam necrose tecidual desencadeada por isquemia, formando radicais livres, diminuindo a oferta de nutrientes devido a oclusão vascular, liberando leucotrienos B, atraindo leucócitos e macrófagos que fagocitam o tecido necrosado e liberam citocinas pró-inflamatórias (TARNAWSKI, 1993; TARNAWSKI, 2005).

As erosões abomasais são classificadas em quatro categorias, grau 1: úlcera não perfurada, com erosão superficial da mucosa e de hemorragia intraluminal mínima; grau 2: lesão mais profunda, porém não perfurada com comprometimento de vasos sanguíneos, causando hemorragia intraluminal significativa; grau 3: lesão com perfuração da parede abomasal e peritonite local e grau 4: lesão com perfuração da parede abomasal, porém com peritonite difusa (MARSHALL, 2009; HUND et al., 2015)

Na microscopia de luz, a úlcera consiste em duas estruturas principais, uma margem distinta formada por epitélio não necrótico nas adjacências e outra de tecido de granulação na base do tecido conjuntivo, com presença de fibroblastos, macrófagos e neovascularização (TARNAWSKI; HALTER, 1995; TARNAWSKI et al., 2001; TARNAWSKI, 2005).

A reparação da úlcera é controlada por diversos processos como fatores de transcrição, fatores de crescimento e citocinas, e ainda estão envolvidos a migração e a proliferação celulares, a angiogênese, a reepitelização e a deposição da matriz extracelular. Todos estes processos desempenham um papel crucial, dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação (SCAFFIDI et al., 2002; TARNAWSKI, 2005; STRAINO et al., 2008).

Os fatores de crescimento têm sido muito estudados devido sua capacidade de regular funções celulares essenciais na reparação tecidual. O VEGF promove angiogênese, restabelecendo a rede microvascular e tecido conjuntivo contribuindo assim na restauração da estrutura da mucosa. Estudos apontam que a HMGB1 aumenta os níveis de fatores de crescimento como o VEGF em células cultivadas (CROSS et al., 2003; BISCETTI et al., 2010).

A HMGB1 (Figura 1) é liberada passivamente durante a necrose celular, sendo secretada ativamente por células imunológicas, tais como monócitos e macrófagos envolvendo-se em respostas inflamatórias e reparação tecidual (DOMMETT et al., 2005; YU et al., 2006; VAN ZOELEN et al., 2009; BISCETTI et al., 2010). No ambiente extracelular, a HMGB1 se liga a vários receptores de membrana entre eles os receptores TLR-2 e TLR-4 (Figura 2). A inflamação e a imunidade inata são a primeira linha de defesa, de tal forma que o TRL-2 e -4 iniciam o mecanismo através de sinalização, desencadeando a cascata de ativação promovendo liberação de citocinas e quimiocinas (LI et al., 2003; RIVA et al., 2010).

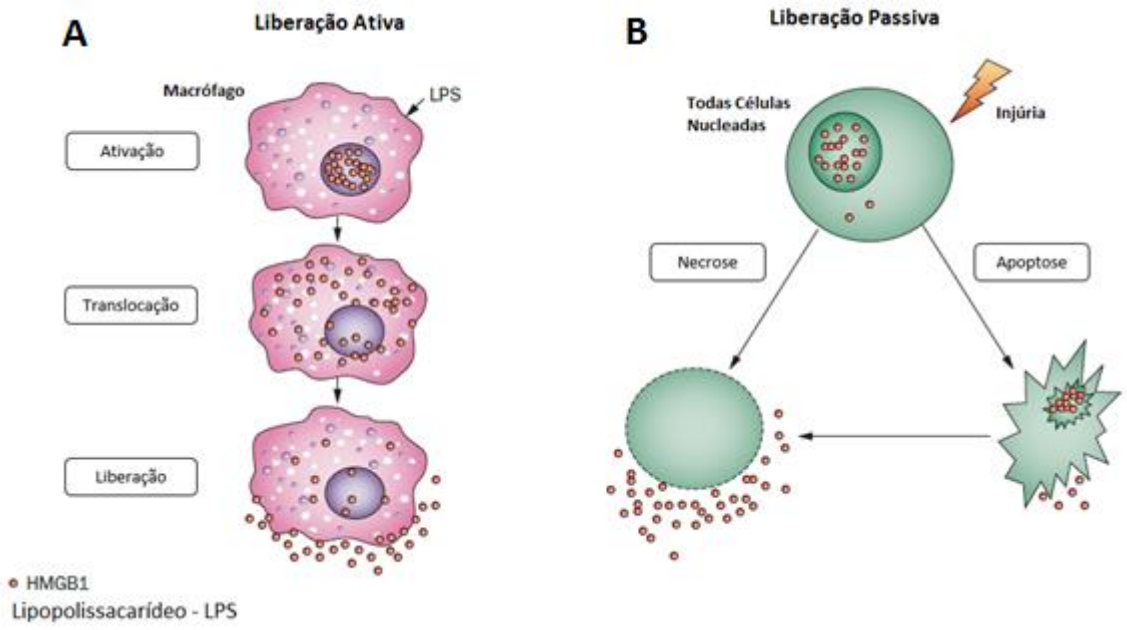


Figura 1: Liberação extracelular de HMGB1. [A] Liberação a partir da estimulação ativa de macrófago. [B] Liberação passiva durante a necrose e apoptose. Fonte: (HARRIS et al., 2012)

Os receptores Toll-like são considerados protetores da integridade estrutural do tecido, ativando moléculas inflamatórias protegendo o tecido de mais danos onde a inflamação e a cicatrização estão ligadas pela necessidade de recrutar fibroblastos para a reparação dos tecidos e de macrófagos para a remoção de detritos (HUEBENER; SCHWABE, 2013). No entanto, um ambiente com excessiva produção de citocinas pode acarretar em uma inflamação persistente dificultando a cicatrização da lesão (MARUSAWA; JENKINS, 2014; MACLEOD; MANSBRIDGE, 2015).

Assim, a finalidade do estudo foi investigar a expressão dos genes TLR-2, TLR-4, HMGB1 e VEGF em úlceras abomasais comparando-os com tecidos abomasais normais.

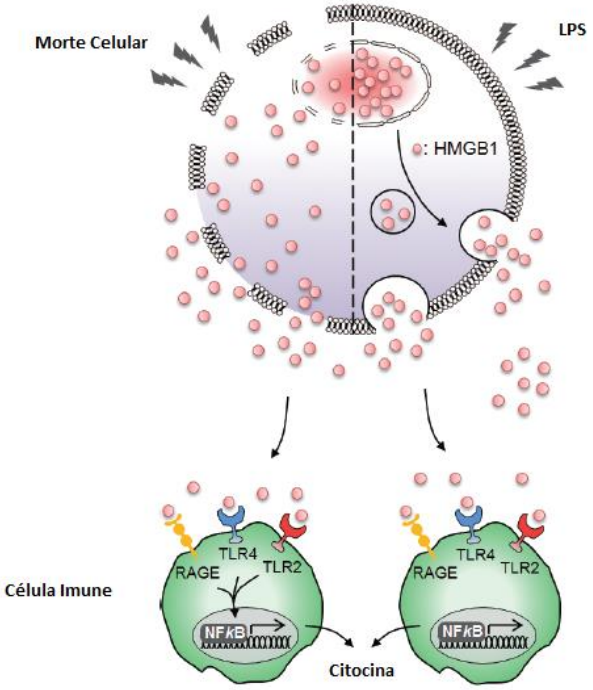


Figura 2: HMGB1 extracelular se liga a receptores de membrana celular como TLR-2, TLR-4 e RAGE, regulando produção de citocinas. RAGE – Receptor avançado de produtos de glicação, LPS – lipopolissacarídeo. Fonte: (LEE et al., 2014)

III. MATERIAL E MÉTODOS

Animais - Um total de 150 abomasos de bovinos de corte foi examinado em um abatedouro comercial da região de Araçatuba e 17 amostras da região cárdica abomasal foram colhidas (13 machos e 4 fêmeas). Os animais tinham idade entre 3,5 a 4 anos e foram abatidos nas mesmas condições entre os meses de maio e agosto de 2015. Estes animais eram oriundos de fazendas cuja criação utilizava regime de confinamento ou pastagem para a engorda.

Colheita e classificação dos tecidos - Os tecidos foram colhidos aleatoriamente na linha de produção e classificados macroscopicamente de acordo as características das erosões. Os grupos foram divididos em grupo normal, com amostras de tecido abomasal (sem alterações de mucosa, n=5), grupo ulceração de grau 1 (úlcera não perfurada, com erosão superficial da mucosa e de hemorragia intraluminal mínima, n=6) e grupo ulceração de grau 2 (lesão mais profunda, porém não perfurada com comprometimento de vasos sanguíneos, causando hemorragia intraluminal significativa, n=6) conforme descrito por (HUND et al., 2015) e confirmado por histopatologia. Nas amostras colhidas para análise histopatológica e para o isolamento do RNA, os tecidos sem ulcerações continham 100% de tecido saudável, enquanto para os demais grupos estas continham 50% de tecido saudável e 50% de tecido ulcerado, para não interferir nas análises da expressão dos genes entre os grupos.

Exame histológico - As amostras dos tecidos abomasais (0,5 cm x 0,5 cm) foram colhidas da região cárdica abomasal e acondicionadas em tubos contendo 1 mL de formol a 10% tamponado. Todas as amostras foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. As amostras foram identificadas por números, não sendo conhecidos a identificação do animal e o grupo a que pertencia no momento da avaliação pelo patologista. À microscopia de luz, os elementos constituintes do tecido foram analisados quanto à integridade tecidual ou presença de alterações/erosões em vilosidades, lâmina

própria, musculatura da mucosa e submucosa, para confirmação do tipo de lesão (úlceras grau 1 ou 2).

Tecido para RT qPCR - Para realizar a qPCR, as amostras dos tecidos abomasais (0,5 cm x 0,5 cm) foram acondicionadas em tubos RNAse e DNAse-free (Axygen Scientific Inc, Union City, CA, USA) contendo 1 mL de *RNAlater* ® (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) e armazenadas a -80ºC, para posterior isolamento do RNA.

Isolamento do RNA e síntese de cDNA – Em média 220 ng/µL de RNA foi extraído a partir de 30 mg de tecido macerado, com o uso do homogeneizador de tecido (Ultra Stirrer, modelo ultra 80-I, CB Biotech, São Carlos, SP, Brasil), transferido para outro tubo de polipropileno DNAse e RNAse-free (Axygen Scientific Inc, Union City, CA, USA) e iniciados os procedimentos de extração de acordo com as instruções do fabricante (illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit **-** GE Healthcare, Amersham, UK). A integridade e a quantidade de RNA foram verificadas no espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). O RNA de cada amostra foi tratado com DNAse conforme o protocolo DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) para remoção de DNA genômico. Em seguida, a síntese de cDNA foi feita conforme o protocolo GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Análise de PCR Quantitativa em Tempo Real (RT qPCR) - A expressão dos genes foi mensurada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando um marcador *SYBR Green*, em um termociclador de PCR em tempo real Stratagene® MX3005P qPCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando-se GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA). O mix de PCR foi feito com 0,5 µL (5 µM) de cada primer e, 8 µL de cada amostra 11 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA), para uma reação de 20 µL de volume final. RNA (755 ng) foi adicionado a cada amostra em duplicata. As condições de temperatura foram um

período de dois minutos a 95ºC para ativação da enzima, seguida de 40 ciclos de temperatura a 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 60 segundos, para amplificação dos produtos, e a fluorescência do *SYBR Green* foi tomada ao final de cada ciclo; a corrida foi finalizada com uma curva de dissociação inicianda em 95ºC por 15 segundos, depois a temperatura foi abaixada a 65ºC, elevando-se novamente a 95ºC, variando 1ºC a cada 30 segundos, momento em que a fluorescência foi obtida. Para obtenção de seis pontos na curva padrão, foram realizadas diluições seriadas a partir de 755 ng na seguinte maneira 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64 em duplicata. Os cálculos da expressão relativa, baseou-se nos valores individuais dos Cts dos genes estudados sobre os *housekeeping* e transformados em média geométrica. Os oligonucleotídeos iniciadores usados (Tabela 1) foram desenhados através do sistema online Prime3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) e utilizou-se o GAPDH e a β-actina como genes *housekeeping*.

Tabela 1: Sequências dos genes desenhados pelo sistema online Prime3 selecionados para análise RT qPCR com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores

Gene		Primer	Gene Bank	pb
β-actina	F	5'-CCAGAGGCATACAGGGACAG-3'	NM_173979.3	98
	R	5'-ACTGGGACGACATGGAGAAG-3'		
GAPDH	F	5'-AAGGCCATCACCATCTTCCA-3'	NM_001034034.2	76
	R	5'-CCACTACATACTCAGCACCAGCAT-3'		
HMGB1	F	5'-CAAGGCCCGTTATGAAAGAG-3'	NM_176612.1	149
	R	5'-GTTCGCCTTTGATTTTTGGA-3'		
TLR-2	F	5'-CGATGACTACCGCTGTGACTC-3'	NM_174197.2	224
	R	5'-CCTTCCTGGGCTTCCTCTT-3'		
TLR-4	F	5'-GGCAGCCATAACTTCTCCAG-3'	NM_174198.6	136
	R	5'-GGATAGGGTTTCCCGTCAGT-3'		
VEGF	F	5'-CAAGATCCGCAGACGTGTAA-3'	NM_001316992.1	202
	R	5'-GCGGCTATGGGTAGTTCTGT-3'		

Análise Estatística - Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas entre os momentos estudados, seguido pelo teste F. Os dados foram transformados em médias geométricas e analisados pelo teste de Bonferroni para comparação entre as médias. As análises foram feitas com auxílio de um programa computacional estatístico (XLSTAT 2015, Addinsoft, NY, USA), sendo considerado significativo $p<0,05$.

IV. RESULTADOS

Macroscopia - Na macroscopia, foi realizada a avaliação minuciosa no compartimento gástrico por alterações na mucosa da região cárdica abomasal. Cinco amostras de abomasos foram consideradas normais no que se refere à integridade da mucosa livre de lesão superficial (Figura 3A). As erosões superficiais foram observadas em seis amostras de abomasos sem perfuração (Figura 3B). Em relação a erosões mais profundas e com presença de necrose, foram encontras em seis outros abomasos não perfurados (Figura 3C). Do total de 150 abomasos avaliados, não foram encontrados órgãos com perfuração completa da parede gástrica, motivo pelo qual não foram incluídas amostras de úlceras graus 3 ou 4.

Exame histopatológico - À microscopia de luz, as amostras de abomaso normal apresentavam integridade das vilosidades, da lâmina própria, das camadas muscular e submucosa (Figura 4 a-c). Entretanto, as úlceras de grau 1 apresentavam erosão superficial da mucosa afetando as vilosidades e a lâmina própria com necrose nas adjacências, com infiltrado inflamatório caracterizado pela população de células mononucleares (Figura 5 d-f]). As úlceras de grau 2 caracterizaram-se por presença de grande erosão e de processo cicatricial avançado tanto na camada muscular quanto na submucosa, além da presença de infiltrado inflamatório (células mononucleares e neutrófilos), hemorragia intersticial e neovascularização (Figura 6 g-i]).

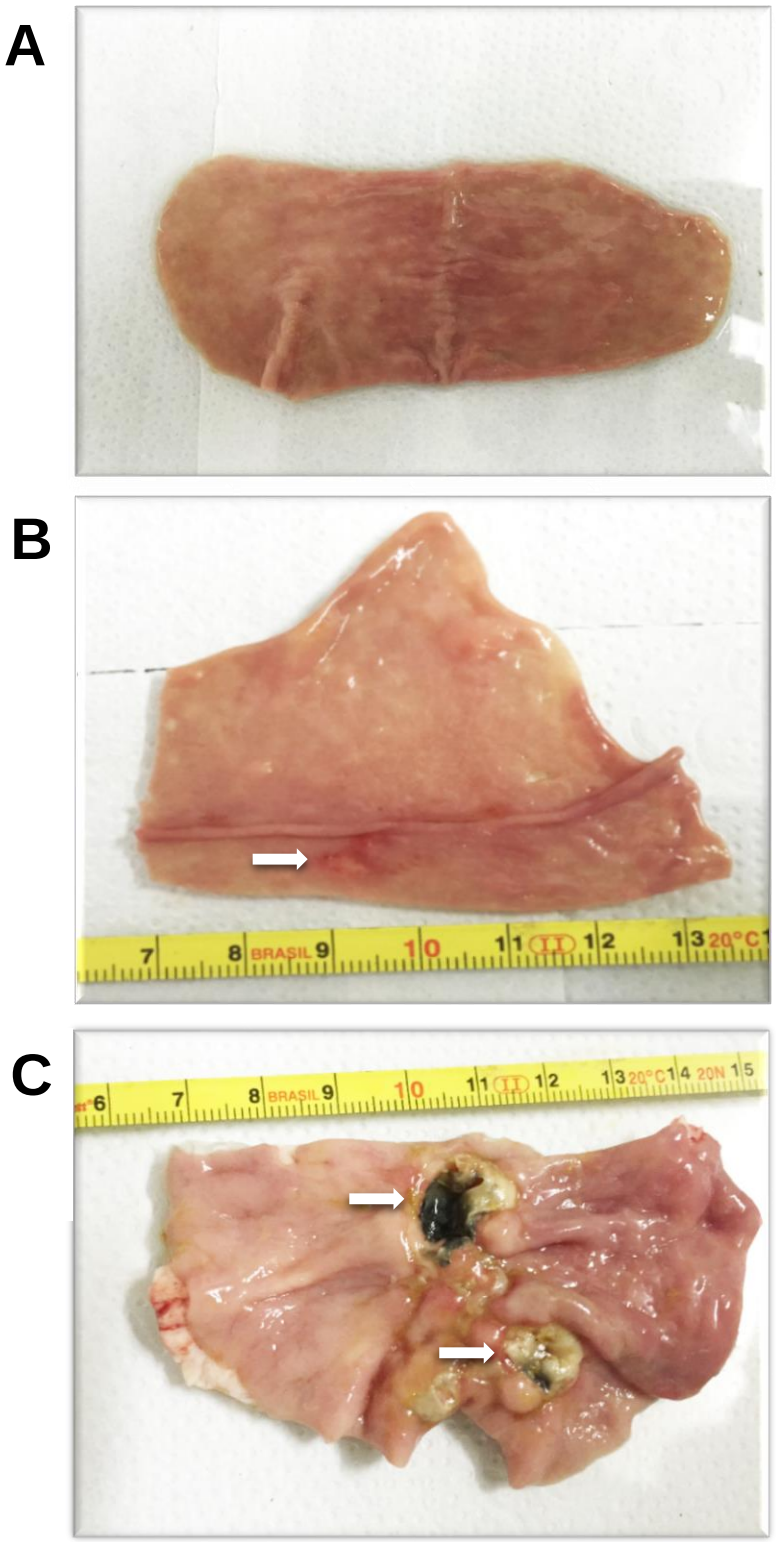


Figura 3: Classificação macroscópica das úlceras abomasais da região cárdica. [A] Abomaso normal – Tecido íntegro sem presença de lesões. [B] Ulceração de grau 1 – Ulceração e erosão não perfuradas com mínima lesão na mucosa. [C] Ulceração de grau 2 – Ulceração e erosão não perfuradas combinadas com tecido desvitalizado. As setas de cor branca indicam as lesões.

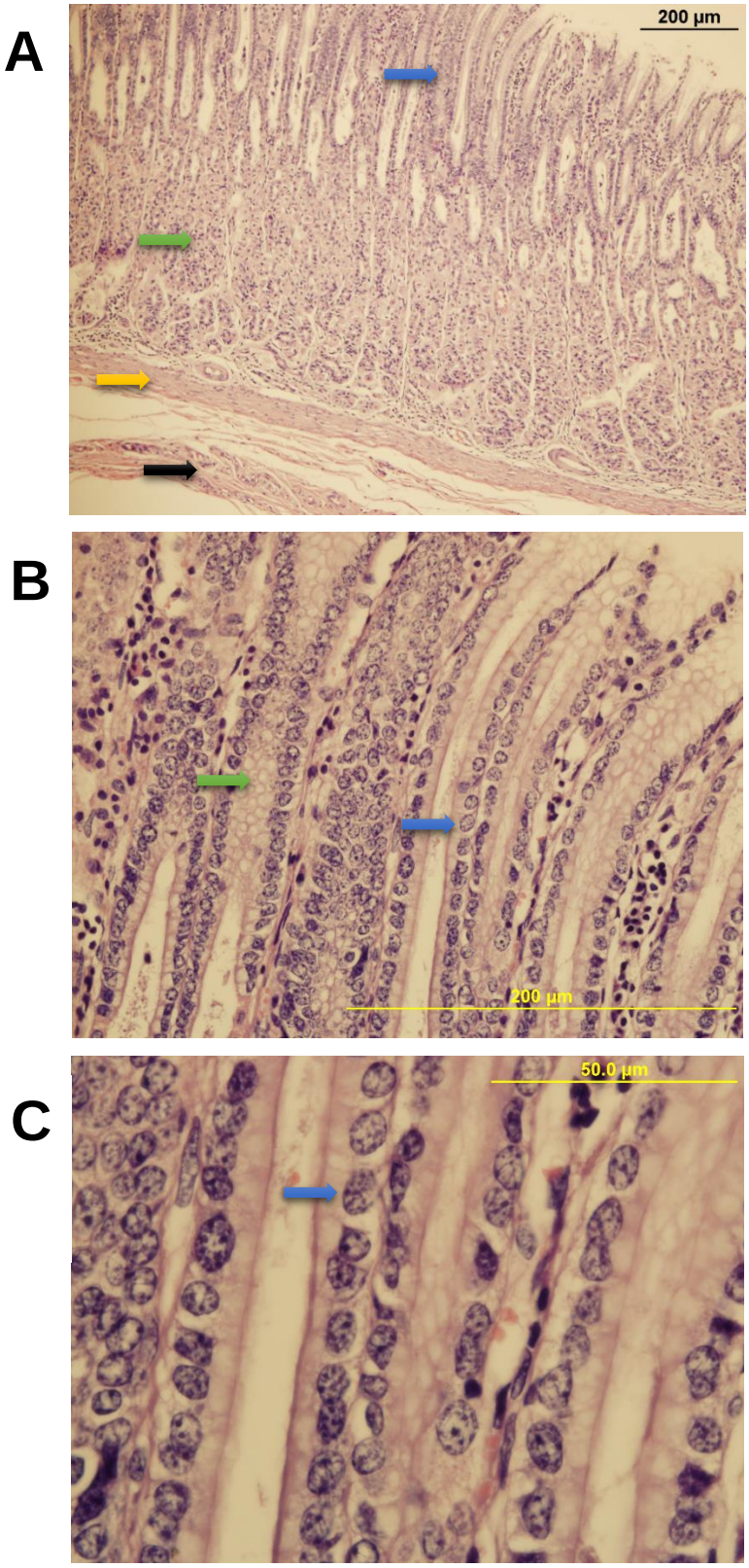


Figura 4: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino. Abomaso normal, [a – 10x] presença de integridade de vilosidades (seta de cor azul), lamina própria (seta de cor verde), musculatura da mucosa (seta de cor laranja) e submucosa (seta de cor preta), [b – 40x] vilosidades íntegras com células parietais (seta de cor azul) e ducto gástrico (seta de cor verde) e [c – 100x] células parietais alinhadas (seta cor azul). Coloração HE.

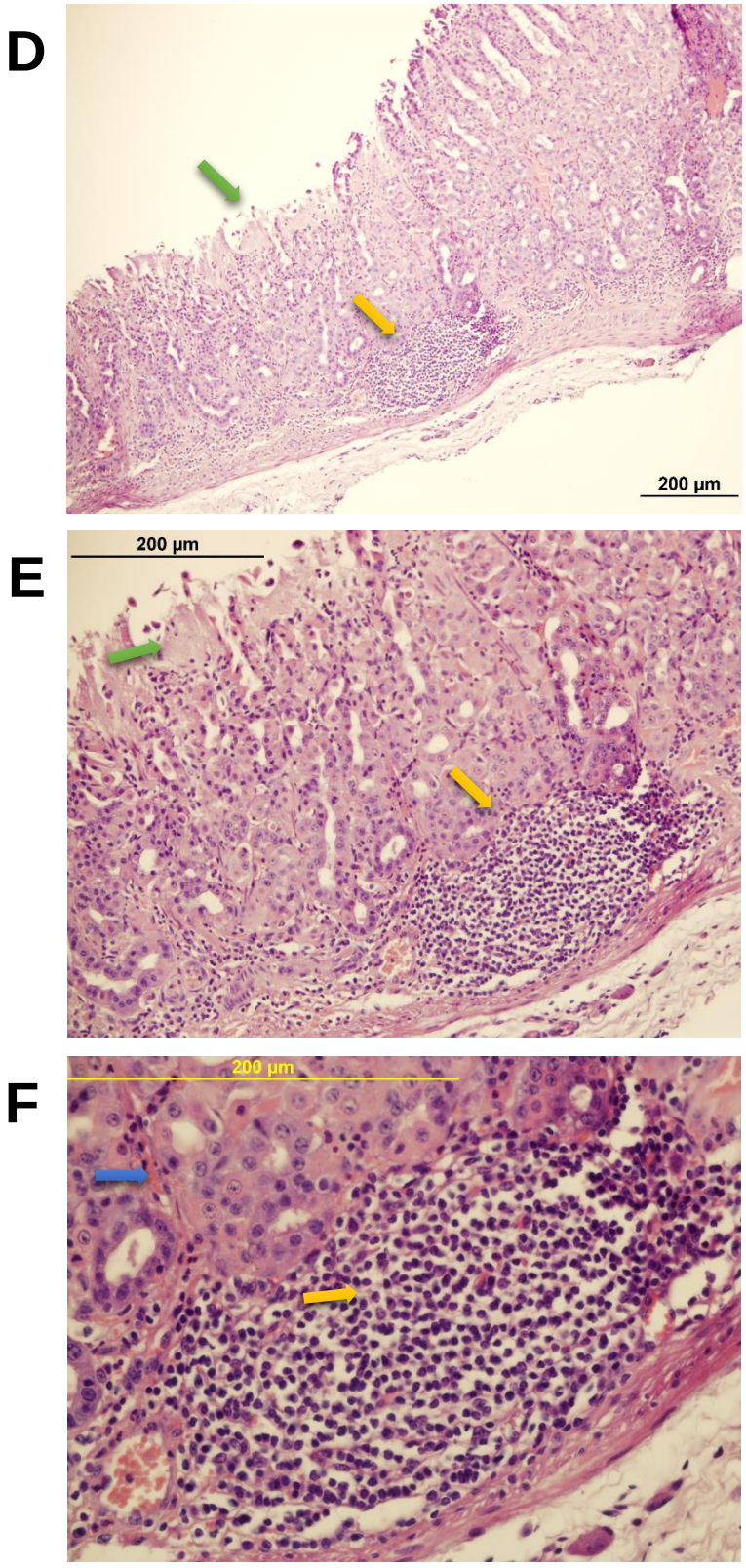


Figura 5: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino: Úlceras de grau 1, [d – 10x] presença de lesão com tecido necrótico (seta cor verde), [e – 40x] população de infiltrado inflamatório (seta cor laranja) e [f – 100x] infiltrado inflamatório mononuclear (seta de cor laranja) e hemorragia intraluminal (seta cor azul). Coloração HE.

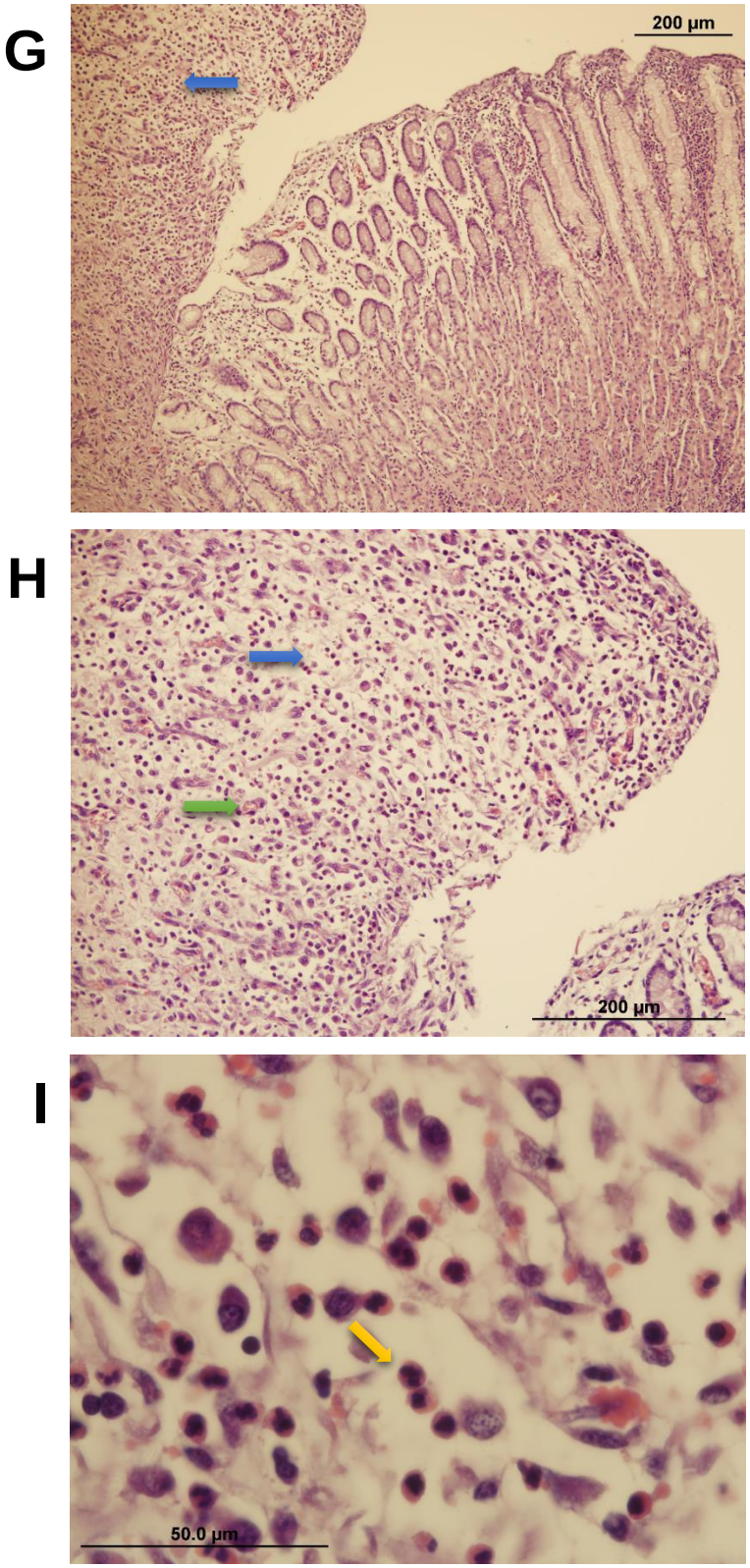


Figura 6: Estudo histológico se secções de tecido abomasal bovino: Úlceras de grau 2, [g – 10x] grande presença de tecido de revitalização (seta de cor azul), [h – 40x] presença de granulação (seta de cor azul) e neovascularização (seta de cor verde), [i – 100x] presença de neutrófilos (seta de cor laranja). Coloração HE.

Expressão dos genes selecionados - A expressão de HMGB1 (inclinação da reta: -3,804; R: 0,933 e eficiência: 83,2%) foi semelhante (p=0,341) entre os grupos (Figura 7A). As úlceras de grau 2 apresentaram uma expressão aproximadamente duas vezes maior de TLR-2 (inclinação da reta: -4,316, R: 0,999 e eficiência: 81,5%) em relação às úlceras de grau 1 (p=0,019) (Figura 7 B). A expressão dos genes TLR-4 (inclinação da reta: -3,660, R: 0,997 e eficiência: 87,6%) (Figura 7 C) e VEGF (inclinação da reta: -3,597, R: 0,992 e eficiência: 89,7%) (Figura 7 D) não foi diferente entre os grupos (p=0,598 e p=0,393, respectivamente).

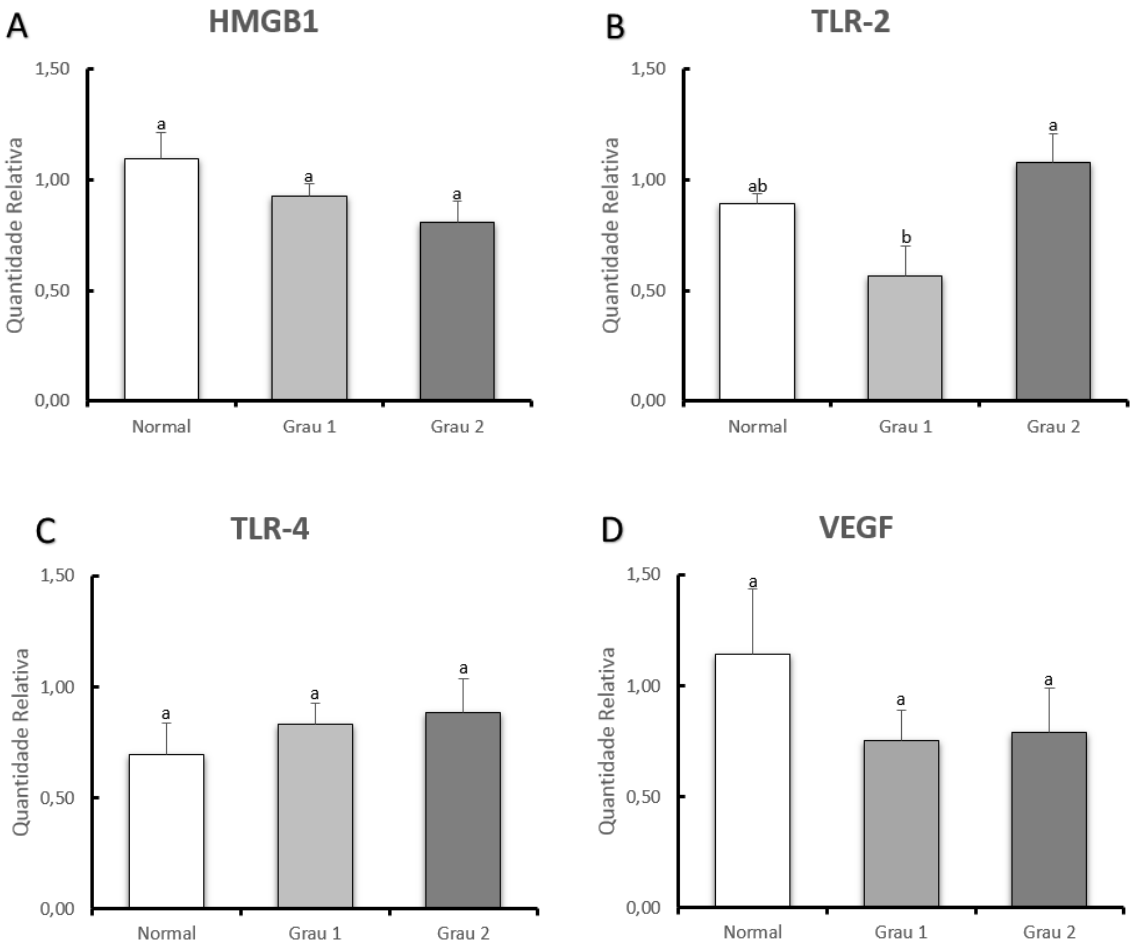


Figura 7: Gráficos demonstrando a expressão gênica dos grupos. Expressão gênica relativa dos genes HMGB1 [A], TLR-2 [B], TLR-4 [C] e VEGF [D]. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si $p < 0,05$.

V. DISCUSSÃO

No presente estudo observamos o aumento da expressão de TLR-2 nas úlceras grau 2 em relação ao grupo grau 1 e também o recrutamento de infiltrado inflamatório mononuclear e neutrofílico. Tais resultados sugerem que a elevação da expressão do TLR-2 possa favorecer a cicatrização das úlceras, fato evidenciado à histopatologia com a presença de tecido de granulação e neovascularização.

TLR-2 é expresso em várias células, incluindo as do trato gastrointestinal. Na presença de lesão da mucosa, desempenha a importante função de proteção da barreira da mucosa gastrointestinal (CARIO, 2008). Estudo realizado em cultura celular, utilizando um lipopeptídeo sintético ($Pam_3CysSK4$), demonstrou que a sinalização via TLR-2 regulou as funções de barreira através da proteína quinase C, um regulador da integridade do epitélio intestinal (TURNER et al., 1999; CARIO et al., 2004). Biópsias da mucosa do intestino delgado de humanos demonstraram aumento na expressão de TLR-2 na lâmina própria e submucosa inflamada (TAN et al., 2014). Em um modelo de cultivo *ex vivo* de células epiteliais intestinais, observou-se que a ativação de TLR-2 promove a sobrevivência celular por inibir a resposta inflamatória e a apoptose (CARIO et al., 2007). Com base nestes resultados, o aumento da expressão de TLR-2 no presente estudo, proporcionaria condições para a manutenção do processo cicatricial de úlceras de abomaso do grupo grau 2.

O aumento da expressão de HMGB1 tem sido relatado no trato gastrintestinal em decorrência da disfunção da barreira de proteção e em várias doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e sepse (PORRO et al., 1996; BIANCHI, 2007). Em ratos, foi demonstrado que a HMGB1 prejudica a cicatrização de feridas pela redução da deposição de colágeno via RAGE (ZHANG et al., 2012). Assim, a inalteração da expressão de HMGB1 nos tecidos ulcerados em relação aos abomasos normais poderia ser decorrente da pequena destruição tecidual observada tanto em úlceras de grau 1 quanto nas de grau 2, como pode-se confirmar à histopatologia devido à presença de neovascularização, de tecido de granulação e de poucos neutrófilos nas

camadas da mucosa. Em camundongos, o aumento da expressão de HMGB1 agiu como um fator complicador na reparação tecidual, levando aumento da expressão de TNF-α e de um infiltrado excessivo de neutrófilos após a indução experimental de úlceras gástricas (WANG et al., 2004; NADATANI et al., 2013).

Contrariamente aos achados *in vivo*, observou-se que a HMGB1 extracelular e os seus receptores eram fundamentais para a cicatrização das feridas quando utilizavam linhagens celulares em cultura de monocamada. A proliferação e a migração de fibroblastos 3T3 ocorria através da ativação do RAGE pela HMGB1 extracelular, regulada pela via quinase (RANZATO et al., 2010). Entretanto, os resultados descritos naquele estudo foram obtidos na ausência de células inflamatórias.

O VEGF é o principal mediador de diversos efeitos fisiológicos e patológicos incluindo migração, proliferação, sobrevivência e permeabilidade celular (HOLMES et al., 2007). O VEGF atua como as citocinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade celular endotelial, induzindo a expressão de moléculas de adesão endotelial, através de sua capacidade quimiotática de monócitos e de células polimorfonucleares (GRIGA et al., 1999; ASAAD JASSIM, 2014). Nossos dados sugerem que não foi necessário alterar a expressão de VEGF nos tecidos ulcerados para estimular a cicatrização da mucosa abomasal, uma vez que a expressão de HMGB1 também estava inalterada em relação aos tecidos normais, desta forma havendo pouca necrose e acelerando o processo de cicatrização local.

VI. CONCLUSÃO

A maior expressão de TLR-2 no grupo úlcera grau 2 em relação ao grupo 1, provavelmente esteja ligada à manutenção da cicatrização, promovendo a resposta inflamatória, evidenciada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear e neutrofílico observado na histopatologia.

Entretanto, a expressão de TLR-4, HMGB1 e VEGF participam da resposta inflamatória recrutando infiltrado inflamatório mononuclear e neutrofílico no compartimento abomasal. Estudos futuros são necessários para esclarecer o papel desses genes no compartimento abomasal, buscando compreender os mecanismos de desenvolvimento das úlceras, a participação de padrões moleculares associados a patógenos e o processo de cicatrização local para se escolher tratamentos mais eficazes para esta enfermidade na espécie bovina.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, U. et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. **The Journal of experimental medicine,** v. 192, n. 4, p. 565-70, 2000.

ASAAD JASSIM, A. A. R. Y. A. Q. H. K. Study on Abomasal Ulcer in Sheep in Iraq. **International Journal of Advanced Research,** v. 2, n. 1, p. 342-349, 2014. ISSN 2320-5407.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology,** v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BISCETTI et al. High-mobility group box-1 protein promotes angiogenesis after peripheral ischemia in diabetic mice through a VEGF-dependent mechanism. **Diabetes,** v. 59, n. 6, p. 1496-505, Jun 2010. ISSN 0012-1797.

CARIO, E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. **Mucosal immunology,** v. 1 Suppl 1, p. S62-6, 2008.

CARIO, E.; GERKEN, G.; PODOLSKY, D. K. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. **Gastroenterology,** v. 127, n. 1, p. 224-38, 2004.

CARIO, E.; GERKEN, G.; PODOLSKY, D. K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. **Gastroenterology,** v. 132, n. 4, p. 1359-74, 2007.

CROSS, M. J. et al. VEGF-receptor signal transduction. **Trends in biochemical sciences,** v. 28, n. 9, p. 488-494, 2003. ISSN 0968-0004.

DOMMETT, R. et al. Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. **Molecular immunology,** v. 42, n. 8, p. 903-12, 2005.

GRIGA, T. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. **Dig Dis Sci,** v. 44, n. 6, p. 1196-201, Jun 1999. ISSN 0163-2116 (Print) 0163-2116.

HARRIS, H. E.; ANDERSSON, U.; PISETSKY, D. S. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. **Nature reviews. Rheumatology,** v. 8, n. 4, p. 195-202, 2012.

HOLMES, K. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. **Cellular Signalling,** v. 19, n. 10, p. 2003-2012, 10// 2007. ISSN 0898-6568.

HUEBENER, P.; SCHWABE, R. F. Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. **Biochimica et biophysica acta,** v. 1832, n. 7, p. 1005-17, 2013.

HUND, A. et al. Characterization of mucosa-associated bacterial communities in abomasal ulcers by pyrosequencing. **Veterinary microbiology,** v. 177, n. 1-2, p. 132-41, 2015.

JOHN B. HALL, S. S. Nutrition and Feeding of the Cow-Calf Herd: Digestive System of the Cow. **Virginia Cooperative Extension,** v. 400-010, 2009.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor function and signaling. **The Journal of allergy and clinical immunology,** v. 117, n. 5, p. 979-87; quiz 988, 2006.

LEE, S.-A. et al. The role of high mobility group box 1 in innate immunity. **Yonsei medical journal,** v. 55, n. 5, p. 1165-76, 2014.

LI, G.; LIANG, X.; LOTZE, M. T. HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. **Frontiers in immunology,** v. 4, p. 68-68, 2013. >.

LI, J. et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.),** v. 9, n. 1-2, p. 37-45, 2003.

MACLEOD, A. S.; MANSBRIDGE, J. N. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, 2015. ISSN 2162-1918.

MANGANELLI, V. et al. Increased HMGB1 expression and release by mononuclear cells following surgical/anesthesia trauma. **Critical care (London, England),** v. 14, n. 6, p. R197-R197, 2010.

MARSHALL, T. S. Abomasal ulceration and tympany of calves. **Vet Clin North Am Food Anim Pract,** v. 25, n. 1, p. 209-20, viii, Mar 2009. ISSN 0749-0720 (Print) 0749-0720.

MARUSAWA, H.; JENKINS, B. J. Inflammation and gastrointestinal cancer: An overview. **Cancer Letters,** v. 345, n. 2, p. 153-156, 2014.

NADATANI, Y. et al. High-mobility group box 1 inhibits gastric ulcer healing through Toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products. 2013. ISSN 1932-6203.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; WHIPPLE, D. L. Abomasal ulcers in captive white-tailed deer (Odocoileus virginianus). **J Comp Pathol,** v. 125, n. 2-3, p. 224-7, Aug-Oct 2001. ISSN 0021-9975 (Print) 0021-9975.

PALUMBO, R. et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. **The Journal of cell biology,** v. 164, n. 3, p. 441-449, 2004.

PARK, J. S. et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. **The Journal of biological chemistry,** v. 279, n. 9, p. 7370-7, 2004.

PISETSKY, D. S.; GAULEY, J.; ULLAL, A. J. HMGB1 and microparticles as mediators of the immune response to cell death. **Antioxidants & redox signaling,** v. 15, n. 8, p. 2209-2219, 2011.

PORRO, G. B. et al. Role of Helicobacter pylori in ulcer healing and recurrence of gastric and duodenal ulcers in longterm NSAID users. Response to omeprazole dual therapy. **Gut,** v. 39, n. 1, p. 22-26, 1996. ISSN 1468-3288.

RANZATO, E. et al. Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via RAGE-dependent ERK1/2 activation. **Cell biochemistry and biophysics,** v. 57, n. 1, p. 9-17, 2010.

RIVA, F. et al. TIR8 receptor expression in bovine tissues. **Veterinary immunology and immunopathology,** v. 136, n. 1-2, p. 65-70, 2010.

SASAKI, H. et al. Perforating abomasal ulcer caused by yolk sac tumor in a Holstein calf. **J Vet Diagn Invest,** v. 24, n. 4, p. 804-6, Jul 2012. ISSN 1040-6387.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature,** v. 418, n. 6894, p. 191-5, 2002.

SCALA, G.; CORONA, M.; MARUCCIO, L. Structural, histochemical and immunocytochemical study of the forestomach mucosa in domestic ruminants. **Anatomia, histologia, embryologia,** v. 40, n. 1, p. 47-54, 2011.

SPLICHALOVA, A.; SPLICHAL, I. Local and systemic occurrences of HMGB1 in gnotobiotic piglets infected with E. coli O55 are related to bacterial translocation and inflammatory cytokines. **Cytokine,** v. 60, n. 3, p. 597-600, Dec 2012. ISSN 1043-4666.

STRAINO, S. et al. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. **J Invest Dermatol,** v. 128, n. 6, p. 1545-53, Jun 2008. ISSN 0022-202x.

TAKAHASHI, M. et al. Promoters of epithelialization induce expression of vascular endothelial growth factor in human gastric epithelial cells in primary culture. **FEBS letters,** v. 418, n. 1-2, p. 115-118, 1997.

TAN, Y. et al. Expression and implication of toll-like receptors TLR2, TLR4 and TLR9 in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci,** v. 34, n. 5, p. 785-90, Oct 2014. ISSN 1672-0733 (Print) 1672-0733.

TARNAWSKI, A. Cellular Mechanisms of Gastric Ulcer Healing. In: DOMSCHKE, W. e KONTUREK, S. J. (Ed.). **The Stomach**: Springer Berlin Heidelberg, 1993. chap. 12, p.177-192. ISBN 978-3-540-56613-7.

TARNAWSKI, A.; HALTER, F. Cellular mechanisms, interactions, and dynamics of gastric ulcer healing. **Journal of clinical gastroenterology,** v. 21 Suppl 1, p. S93-7, 1995.

TARNAWSKI, A. et al. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. **J Physiol Paris,** v. 95, n. 1-6, p. 337-44, Jan-Dec 2001. ISSN 0928-4257 (Print) 0928-4257.

TARNAWSKI, A. et al. Cellular and molecular mechanisms of gastric ulcer healing. Is the quality of mucosal scar affected by treatment? **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement,** v. 210, p. 9-14, 1995.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences,** v. 50 Suppl 1, p. S24-33, 2005.

TURNER, J. R. et al. PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. **The American journal of physiology,** v. 277, n. 3 Pt 1, p. C554-62, 1999.

VAN ZOELEN, M. A. D. et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. **Shock (Augusta, Ga.),** v. 31, n. 3, p. 280-4, 2009.

WANG, H.; YANG, H.; TRACEY, K. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. **Journal of internal medicine,** v. 255, n. 3, p. 320-331, 2004. ISSN 1365-2796.

WU, R. et al. Orexigenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats. **Critical care medicine,** v. 37, n. 8, p. 2421-2426, 2009.

YANG, H. et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 107, n. 26, p. 11942-7, 2010.

YU, M. et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. **Shock (Augusta, Ga.),** v. 26, n. 2, p. 174-9, 2006..

ZHANG, B. et al. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN,** v. 19, n. 5, p. 923-932, 2008.

ZHANG, Q. et al. Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing. **Journal of Surgical Research,** v. 176, n. 1, p. 343-347, 2012. ISSN 0022-4804.