

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

RENATA MONTI ROCHA

**SOCS2 COMO REGULADOR DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRÓ-
OXIDATIVOS EM MODELO DE INJÚRIA HEPÁTICA CAUSADA POR SOBREDOSE
DE PARACETAMOL.**

BELO HORIZONTE

2017

RENATA MONTI ROCHA

**SOCS2 COMO REGULADOR DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRÓ-
OXIDATIVOS EM MODELO DE INJÚRIA HEPÁTICA CAUSADA POR SOBREDOSE
DE PARACETAMOL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Dr^a Fabiana Simão Machado

Coorientador: Dr. Gustavo Batista de Menezes

BELO HORIZONTE

2017

043

Rocha, Renata Monti.

SOCS2 como regulador de processos inflamatórios e próoxidativos em modelo de injúria hepática causada por sobredose de paracetamol [manuscrito] / Renata Monti Rocha. – 2017.

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

Orientadora: Dra. Fabiana Simão Machado. Coorientador: Dr. Gustavo Batista de Menezes.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Acetaminofen. 3. Doença Hepática Induzida por Substâncias e Drogas. 4. Inflamação. 5. Estresse Oxidativo. I. Machado, Fabiana Simão. II. Menezes, Gustavo Batista de. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

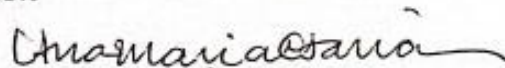
CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

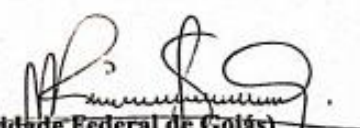


ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RENATA MONTI ROCHA. Aos seis dias do mês de abril de 2017 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "SOCS2 como regulador de processos inflamatórios e pró-oxidativos em modelo de injúria hepática causada por sobredose de paracetamol", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: . . . Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Ana Maria Caetano (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Cristiano Xavier Lima (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (Universidade Federal de Goiás), aprovada; Dr. Thiago Mattar Cunha (Faculdade de Medicina - USP - RP), aprovada; Dr. Gustavo Batista de Menezes - Co-Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de abril de 2017.



Dra. Ana Maria Caetano (UFMG)


 Dr. Cristiano Xavier Lima (UFMG)

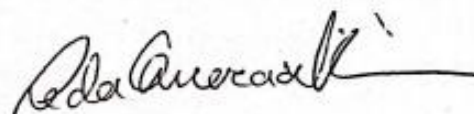

 Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (Universidade Federal de Goiás)


 Dr. Thiago Mattar Cunha (Faculdade de Medicina - USP - RP)


 Dr. Gustavo Batista de Menezes - Co-Orientador (UFMG)


 Dr. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)

Curso de PG em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627
 CEP 31270-901 - BH - MG



Profª Leda Quercia Vieiro
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

*Correção: Requisito final para obtenção de grau de Doutor em Ciências:

Imunologia

Elenice Moreira Lemos (*in memoriam*), para
sempre minha mentora científica.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a Fabiana Simão Machado, obrigada por me receber em seu laboratório e por ter me dado a oportunidade de exercer a ciência. Obrigada por todos os ensinamentos, por confiar no meu trabalho, e por sempre me estimular a ser cada vez melhor.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Menezes, por estar sempre presente no desenvolvimento desse trabalho, auxiliando para que ele progredisse da melhor forma possível. Além disso, te agradeço por ter me inserido em seu grupo de pesquisa. Aprendi muito com vocês.

As agências de financiamento, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Aos professores Aline Miranda, André Gustavo Oliveira, Caio Fagundes, Daniele de Souza, Flávio Amaral, Mauro Teixeira e Vanessa Pinho, por me receberem tão bem em seus laboratórios e por todo o auxílio científico prestado ao meu trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas do laboratório: Allysson, Andréia, Bruno, Cynthia, Diego, Fátima, Katherinne, Lísia, Melisa, Paulo, Pollyana, Ronan e Samuel, minha eterna gratidão. Além de sempre estarem dispostos a me ajudar nos experimentos, vocês fizeram muito mais que isso. Foram meus parceiros em todos os momentos, me trazendo alegria sempre. Adoro vocês!

A Jacque, por toda a paciência e sabedoria transmitidas durante esse tempo. Muito obrigada por todas as conversas e conselhos. Você é nosso ponto de equilíbrio no laboratório.

Aos colegas do NEI, em especial Bruna, Maísa e Rafaela, por estarem sempre à disposição para me ajudar nos experimentos. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela companhia!

Aos colegas do grupo imunofarmacologia, em especial a Ana Carol, Bráulio, Bruno, Denise, Iara, Izabela, Juliana, Lívía, Luciana e Rebeca, por todas as trocas de conhecimento, cafés, caretas, festas... obrigada por tudo. Vocês são demais!

Agradeço a meu pai e minha mãe, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por entenderem a minha ausência em muitos momentos, especialmente por estar longe de casa. Sem o apoio de vocês não teria conseguido. Amo vocês.

Ao meu irmão e minha cunhada, sou grata por todo o apoio de vocês em BH. Me ajudaram em todos os momentos que mais precisei. Ter vocês por perto faz toda a diferença. Amo vocês.

Por fim, mas não menos importante, ao Caio. Obrigada por me ouvir diversas vezes, e por sempre estar disposto a discutir ciência em qualquer momento. Você é minha inspiração. Te agradeço por me inserir em uma família tão maravilhosa. Amo muito todos vocês.

RESUMO

O paracetamol (APAP) tem sido muito utilizado para tratamento de dor e febre. Geralmente é seguro quando administrado em doses terapêuticas, entretanto a superdosagem e a maior susceptibilidade podem levar a graves lesões no fígado. A severa necrose gerada induz a uma intensa resposta inflamatória, que pode alterar eventos intracelulares e aumentar a lesão por ativação do estresse oxidativo. A proteína Supressor de Sinalização de Citocinas (SOCS) 2 é responsável por modular a sinalização de citocinas e fatores de crescimento, sendo importante na regulação de vários processos celulares. Esse trabalho avaliou o papel de SOCS2 na lesão hepática causada por APAP. A administração de uma dose tóxica de APAP (500mg/Kg) em camundongos leva à maior necrose hepática nos animais SOCS2 nocaute ($^{-/-}$) quando comparados aos animais WT, 2 e 12 horas após a administração de APAP. A deficiência de SOCS2 também resulta no maior recrutamento de neutrófilos para essas áreas, além da maior expressão de CXCL-1. Ainda, há maior produção de citocinas pró-inflamatórias no fígado como TNF- α e IL-6, e menor expressão das citocinas anti-inflamatória e próregenerativa IL-10 e TGF- β , respectivamente. Esses resultados justificam a maior necrose encontrada nos animais SOCS2 $^{-/-}$ após 12 horas do tratamento com APAP. No tempo de 2 horas, avaliamos o papel do estresse oxidativo na geração de necrose. Os resultados *in vitro* demonstraram uma maior produção de ROS e aumento da expressão de p-ERK e p-p65 pelos hepatócitos SOCS2 $^{-/-}$. Além disso, essas células são também mais sensíveis a morte celular na presença de IL-6 e de peróxido de hidrogênio. A adição de catalase *in vitro* e a sua administração *in vivo* resultam na redução da morte celular e levam à redução de necrose em ambos os grupos, sendo que nos animais deficientes para SOCS2 a redução de necrose é mais pronunciada. Portanto, nosso trabalho demonstrou que a proteína SOCS2 possui um papel protetor, controlando mecanismos pró-oxidativos e inflamatórios que ocorrem na lesão hepática gerada por APAP.

Palavras-chave: APAP; lesão hepática; SOCS2; inflamação; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Acetaminophen has been widely used to treat pain and fever. Usually it is safe when administered in therapeutic doses, however the overdose and the increased susceptibility can lead to severe liver injury. This stimulates an intense inflammatory response, which can change intracellular events and even enhance the injury by activation of oxidative stress. The Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 2 protein is able to modulate cytokine and growth factors signaling, being important in the regulation of many cellular processes, including hepatic. Our study evaluates the role of SOCS2 in APAP liver injury. The challenge with an APAP toxic dose (500mg/Kg) in mice leads to a higher necrosis in SOCS2^{-/-} mice when compared to WT mice, 2 and 12 hours after the administration. There is a greater neutrophil recruitment to necrosis area in knockout mice, and a higher expression of chemokine CXCL-1 and increased production of proinflammatory cytokines in the liver such as TNF- α and IL-6, and lower expression of the anti-inflammatory and pro-regenerative cytokines IL-10 and TGF- β , respectively. These results justify the higher necrosis found in SOCS2^{-/-} mice after 12 hours of APAP challenge. In the time of 2 hours, we evaluated the role of oxidative stress in the generation of necrosis. *In vitro* results showed increased production of ROS and expression of p-ERK and p-p65 by SOCS2^{-/-} hepatocytes. In addition, hepatocytes deficient in SOCS2 were also more sensitive to cell death in the presence of IL-6 and hydrogen peroxide. The addition of catalase *in vitro* and the *in vivo* administration resulted in reduction of cell death and necrosis, respectively, in both groups, and in animals deficient for SOCS2 necrosis reduction is more pronounced. Therefore, our study demonstrated that SOCS2 protein has a protective role, controlling pro-oxidative and inflammatory mechanisms that occur in the hepatic injury generated by APAP.

Keywords: APAP; liver injury; SOCS2; inflammation; oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

18S – Ácido ribonucléico ribossomal 18S

AINEs - Antiinflamatórios não-esteroidais

APAP – Acetaminofeno, paracetamol

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

CCL-2 - *C-C Motif Chemokine Ligand 2*

cDNA – Ácido desoxiribonucléico complementar

CIS - *Cytokine-inducible SH2*

COX – Ciclooxygenase

Ct - *Threshold cycle*

CYP 450 - Citocromo P450

CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

DAF-2DA - *4,5-diaminofluorescein diacetate*

DAMPs - *Danger-associated-molecular patterns*

DHR 123 - *Dihydrorhodamine 123*

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT - Ditioneito

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM – Erro padrão da média

ERK – *Extracellular signal-regulated kinases*

g – Força G

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSH – Glutathiona reduzida

H2DCF-DA - *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

H&E - Hematoxicilina e eosina

HMGB1 - *High-mobility group box protein 1*

HPRT - *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*

HTAB – *Hexadecyltrimethylammonium bromide*

IKB- α - *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

(IL) – Interleucina iNOS - *Inducible nitric oxide synthase*

i.p. – Intraperitoneal

JAK - *Janus kinase/signal transducers*

JNK - *c-jun-N-terminal kinase*

KC - Células de kupffer

Kg – Quilogramas

LDH - Lactato desidrogenase

M - Molar

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos

mg - Miligramas

mL - Mililitros

μ L - Microlitros

μ M - Micrometros

NAC - N-acetilcisteína

NaCl – Cloreto de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NaVO₃ – Metavanadato de sódio

Nm - Nanômetros

NAPQI - N-acetil-p-benzoquinona imina

NF κ B - *Factor nuclear kappa B*

NO - Óxido nítrico

P38 - *P38 mitogen-activated protein kinases*

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PE - *Phycoerythrin*

PGE2 - Prostaglandina E2

PMSF - *Phenylmethane sulfonyl fluoride*

qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPL4 - *Ribosomal Protein L4*

Rpm – Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SOCS - *Suppressor of cytokine signalling*

SOCS2 *-/-* - animal deficiente para SOCS2

STAT - *Activators of transcription*

TBS - *Tris-buffered saline*

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TLR9 - *Toll-like receptor 9*

TMB - *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*

VEGF-A - *Vascular endothelial growth factor A*

WT – wild-type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de como o metabolismo hepático do paracetamol pode gerar toxicidade. A maior fração do APAP que chega ao hepatócito é conjugada as enzimas UDP-glicorunosil transferase e sulfotransferase, e conseqüentemente é excretada do organismo. Da mesma forma, uma pequena fração do APAP (entre 10 a 15%) é metabolizada pelas isoenzimas do complexo citocromo P450 (CYP 450), gerando um metabólito tóxico (NAPQI) que é eliminado após conjugação com a enzima glutathione reduzida (GSH). Porém, quando administrado em doses altas, o APAP gera mais NAPQI do que a GSH consegue se conjugar e eliminar. Dessa forma, o NAPQI fica disponível para se ligar a macromoléculas celulares nucleofílicas, impedindo o exercício da sua correta função na célula. Assim, inicia-se o processo de disfunção celular gerado pela sobredose de APAP. Adaptado de James *et al.*, 2003.....28

Figura 2 - Fases da hepatotoxicidade após a superdosagem de paracetamol. Passo 1: a toxicidade no fígado inicia-se após a fase de metabolismo, onde o fármaco, nos hepatócitos, é metabolizado pelo complexo do citocromo P450 (CYP 450), gerando o metabólito tóxico NAPQI (passo 2). A geração excessiva de NAPQI resulta na ligação dessa molécula a proteínas celulares, principalmente mitocondriais (passo 3), iniciando o processo de lesão. A formação desses conjugados de proteínas resulta em aumento na geração de estresse oxidativo mitocondrial, principalmente de ROS (passo 4). Esse fato leva à formação do *MPT (mitochondrial permeability transition)* e liberação de proteínas dessa organela tais como o fator indutor de apoptose e a endonuclease G (passo 5). Esses, por sua vez, translocam para o núcleo, levando a fragmentação do DNA (passo 6) e subsequente necrose celular. Os hepatócitos necrosados liberam, então, DAMPs (passo 7), que podem amplificar o processo de lesão e/ou iniciar a fase regenerativa, com recrutamento de células do sistema imune como os neutrófilos (passo 8).....30

Figura 3 - Estrutura protéica da família SOCS. As proteínas SOCS contém um domínio SOCS box C-terminal, um domínio central SH2 e uma região N-terminal com comprimento e composição de aminoácidos variáveis. Os membros da família estão agrupados em pares baseado na homologia da sequência de aminoácidos presentes no domínio SH2 (mostrado como percentual). Características próprias estão diferenciadas pela cor e enumeradas na legenda. Abreviações: região inibitória de cinase (*kinase inhibitory region - KIR*), domínio SH2 estendido (*extended SH2 domain - ESS*), região rica em prolina, ácido glutâmico, serina e treonina (*proline, glutamic acid, serine and threonine – PEST - rich region*). Adaptado de Linossi *et al.* (2013).33

Figura 4 - Mecanismo de ação da família SOCS como inibidores da sinalização celular. As citocinas geram o sinal por meio da ligação a seus receptores, levando à fosforilação de JAK dando início a cascata. Em seguida, ocorre fosforilação e dimerização de STATs, que translocam para o núcleo iniciando a transcrição gênica. Além de ativar genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e função, STATs também ativam a transcrição de SOCS. Esses então podem atuar inibindo a sinalização de citocinas de quatro maneiras: (1) bloqueando o recrutamento de STAT para o receptor de citocina; (2) marcando o receptor para degradação no proteassoma; (3) ligando-se a JAKs, inibindo diretamente sua atividade cinase; (4) marcando JAKs para degradação no proteassoma. Adaptado de Palmer & Restifo (2009).35

Figura 5 – Expressão de SOCS2 no fígado de animal WT após tratamento com sobredose de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP, e após 2, 6 e 12 horas foram eutanasiados para coleta do fígado. Posteriormente foi realizado western blot dos fígados utilizando anticorpos específicos para SOCS2 e β -actina (controle endógeno e normalizador). O gráfico representa o resultado da razão entre a expressão da proteína analisada pela expressão do controle endógeno. A. Western blot representativo de dois experimentos independentes (n=4 por grupo). B. Densitometria média dos mesmos dois experimentos de western blot. Os dados representam média \pm EPM. ** $p < 0,01$, ambos vs controle e 2h (significância estatística realizada por one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey).54

Figura 6 – Deficiência de SOCS2 leva à maior letalidade em camundongos após tratamento com sobredose de APAP (600 mg/Kg). Os animais WT (n=12) e SOCS2^{-/-} (n=12) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP, e posteriormente observados por 48 horas para avaliação da letalidade. O gráfico representa os resultados de dois experimentos independentes (n total = 12 por grupo). * p<0,05 (significância estatística realizada pelo teste de Log-rank).....55

Figura 7 – Avaliação do comportamento dos animais WT e SOCS2^{-/-} após tratamento com APAP (600 mg/Kg). A. Esquema representativo do experimento, no qual foram acomodados quatro animais por gaiola. Os animais foram filmados por 4 horas e o vídeo foi avaliado posteriormente. A quantidade de vezes que eles atravessaram o centro da caixa (caminho “A”) foi contabilizado manualmente. O caminho percorrido pelo animal como em “B” não foi avaliado. B. O gráfico representa os resultados de dois experimentos independentes (n=12 por grupo), no qual os animais foram avaliados durante 4 horas.....56

Figura 8 – Deficiência de SOCS2 leva a maior liberação de ALT no soro após tratamento com 600 mg/Kg de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O soro foi coletado para avaliação da transaminase hepática ALT. O gráfico é representativo de três experimentos independentes (n=4 por grupo). Os dados foram expressos como a média ± EPM. *p<0,05 (significância estatística realizada por teste T de *student*).57

Figura 9 – Maior lesão hepática ocorre na ausência de SOCS2 após 2 e 12 horas da intoxicação com 600mg/Kg de paracetamol. A. Escore histopatológico calculado com base nos seguintes parâmetros avaliados na histologia do fígado: necrose, degeneração, hemorragia e infiltrado inflamatório. Os valores utilizados para avaliação foram: 0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante; 5, severo. B.

Quantificação da fluorescência do marcador de necrose Sytox Green (verde); intensidade média de fluorescência (MFI). C. Histologia hepática com coloração H&E (aumento de 20x). As setas indicam as áreas de necrose cetrolubular. D. Microscopia confocal intravital em que a necrose foi marcada por Sytox Green e neutrófilos por GR1-PE (vermelho) (aumento de 60x). Ambas as técnicas foram realizadas no fígado de animais WT e SOCS 2^{-/-} após 2, 6 e 12 horas de tratamento com 600 mg/Kg de APAP. Imagens representativas de três experimentos independentes (n=3 por grupo). Os dados foram expressos como a média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 (significância estatística realizada por teste T de *student*).....58

Figura 10. Maior necrose encontrada nos animais deficientes para SOCS2 não está relacionada ao maior metabolismo do APAP. A. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O fígado foi coletado para medida da GSH utilizando reação colorimétrica com DNTB. B e C. Liberação da enzima LDH foi utilizada como medida de morte celular em culturas de hepatócitos primários (2x10⁵ células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-}, tratados com 5mM de APAP (B) e 40mM de APAP (C). A razão é sempre em relação aos hepatócitos tratados apenas com veículo (controle - meio William's + 1% DMSO). Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes (GSH: n=4 por grupo); os ensaios de viabilidade celular foram realizados em triplicata experimental.61

Figura 11 – Há maior infiltrado de neutrófilos na área de necrose nos animais deficientes para SOCS2 após intoxicação com APAP. As análises foram realizadas no fígado de animais WT (n=4) e SOCS2^{-/-} (n=4) após tratamento com 600 mg/Kg de APAP. A. Microscopia confocal intravital mostra os neutrófilos Gr1-PE+ (vermelhos) dentro da área hepática de necrose (marcada com Sytox Green – verde) 12 horas após tratamento. As figuras em *merge* representam a sobreposição das imagens de neutrófilos e necrose. Aumento de 40x. B. Quantificação dos das células Gr1-PE+ utilizando o programa Volocity 6.3. C. Atividade da enzima mieloperoxidase no fígado dos animais após 2, 6 e 12 horas de tratamento com 600m/Kg de APAP. Os dados

representam média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (significância estatística realizada por teste T de *student*).....62

Figura 12 – Deficiência de SOCS2 leva a maior expressão hepática de genes próinflamatórios após sobredose de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O fígado foi coletado para análise de qPCR de genes relacionados a citocinas e quimiocina. Os resultados foram normalizados com o gene endógeno GAPDH, e expressos em relação ao controle tratado com veículo (salina). Os gráficos representam média de três experimentos independentes (n=4 por grupo) \pm EPM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ (significância estatística realizada por one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey).....64

Figura 13 – Ativação *in vitro* da via das MAPK em hepatócitos primários tratados com 5 mM de APAP. Hepatócitos primários (2×10^5 células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* com 5 mM de APAP, durante a cinética de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Após cada tempo, as células foram lisadas e as proteínas coletadas para western blot. A. Western blot das proteínas JNK e pJNK (54 e 46Kda), ERK e pERK (44 e 42 KDa), e o controle endógeno GAPDH (37 KDa). B e C. Densitometrias correspondentes ao western blot da figura A. D. Western blot das proteínas p38 e pp38 (43 Kda), IK β e p IK β (37 KDa), e o controle endógeno GAPDH (37 KDa). E e F. Densitometrias correspondentes ao western blot da figura D. As figuras e os gráficos são representativos de três experimentos independentes.66

Figura 14. Translocação *in vitro* de NF- κ B é maior em hepatócitos primários deficientes para SOCS2 tanto sem estímulo quanto cultivados com 5mM de APAP. Hepatócitos primários (2×10^5 células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* com 5 mM de APAP, durante a cinética de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Após cada tempo, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos para imunofluorescência. A. Imagens representativas dos hepatócitos marcados com FITC (verde) para a proteína NF- κ B p-p65, e com PI (vermelho) para o núcleo. A figura mostra

os hepatócitos tratados apenas com o veículo e 30 minutos após a incubação com 5mM de APAP. B. Quantificação da translocação de p-p65 para o núcleo dos hepatócitos nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos após a incubação com 5mM de APAP. A intensidade média de fluorescência foi determinada pelo programa Volocity 6.3. Os dados acima são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata experimental, e foram expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (significância estatística realizada por teste T de *student*).68

Figura 15. Hepatócitos não são os principais produtores das citocinas TNF- α , IL-6 e da quimiocina CXCL-1 na overdose por paracetamol. Hepatócitos primários de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* (2×10^5 células/poço) com 5 mM de APAP, durante a cinética de 2, 6, 12 e 24 horas. Após cada tempo, o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas por ELISA. Os resultados demonstrados nos gráficos são uma razão dos valores das proteínas em pg/mL produzidas pelas células tratadas com APAP em relação as células tratadas com veículo de cada tempo analisado. Os gráficos representam a média \pm EPM dos valores encontrados em dois experimentos independentes, realizados em triplicata experimental. A significância estatística foi realizada por teste T de *student*.69

Figura 16. Deficiência de SOCS2 leva a maior sensibilidade celular dos hepatócitos primários à citocina IL-6 isolada e em combinação com TNF- α . Hepatócitos primários de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* (2×10^5 células/poço) com APAP (5 mM), TNF- α (100ng/mL) e IL-6 (100ng/mL) durante 12 e 24 horas. Após cada tempo, o sobrenadante foi coletado para a dosagem da enzima LDH. A morte celular foi representada como uma razão da liberação de LDH pelos hepatócitos na presença de citocinas/APAP em relação a liberação de LDH pelas células tratadas com veículo. O gráfico é representativo de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados estão representados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).71

Figura 17. Produção de ROS está acentuada em hepatócitos que não expressam SOCS2 após incubação com 5mM de APAP. Os experimentos foram realizados por meio da cultura de hepatócitos primários isolados de animais WT e SOCS2^{-/-}, que foram então incubados (2x10⁵ células/poço) com 5mM de APAP. As sondas para ROS (H2DCFDA, 25µM), NO (DAF-2DA, 10µM) e peroxinitrito (DHR123, 25µM) foram adicionadas em tempos específicos antes da leitura de fluorescência. Os resultados foram normalizados em relação ao controle tratado com veículo em cada tempo. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes com triplicata experimental, e mostram a média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).72

Figura 18. Efeitos da produção de ROS na morte dos hepatócitos tratados com APAP e ação das enzimas antioxidantes apocinina e catalase. A. Morte celular dos hepatócitos primários (2x10⁵ células/poço) isolados de animais WT e SOCS2^{-/-}, que foram cultivados com 5mM de APAP e 250 mM de H₂O₂. A viabilidade foi avaliada pela liberação da enzima LDH no sobrenadante das culturas, e o resultado normalizado em relação ao controle (tratado com veículo). B. Efeitos do tratamento com 250 µM de apocinina (APO) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. D. Efeitos do tratamento com 60U/mL de catalase (CAT) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. C. Efeitos do tratamento com 250 µM de apocinina e 60U/mL de catalase (CAT + APO) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes, realizados com triplicata experimental. Os dados representam a média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).74

Figura 19. Tratamento com catalase reduz a lesão hepática nos animais SOCS2^{-/-} em magnitude maior que no animal WT, alcançando o mesmo nível desses animais. Os animais WT (n=4) e SOCS2^{-/-} (n=4) foram tratados com 5000U/Kg i.p. de catalase

(CAT) 12 horas antes do tratamento com APAP. No momento da administração de 600mg/Kg de APAP, os animais receberam a mesma dose de catalase dada anteriormente. Após duas horas, os animais foram sacrificados e o soro e fígado coletados para análise. A. Medida da liberação de ALT no soro dos animais WT e SOCS2^{-/-} após tratamentos com APAP e APAP com catalase. B. Escore histopatológico do fígado desses animais avaliou: necrose, degeneração, hemorragia e infiltrado inflamatório. Os valores utilizados para avaliação foram: 0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante; 5, severo. C. Imagens representativas da histologia hepática. As setas indicam as áreas de necrose centrolobular. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes, realizados com n=4 por grupo. Os dados representam a média ± EPM. **p<0,01; ***p<0,001 (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).75

Figura 20. Mecanismo proposto para maior lesão hepática gerada na ausência de SOCS2 após a superdosagem de paracetamol. Passo 1: Dose de 500 mg/Kg de APAP foi administrada *in vivo*, e *in vitro* os experimentos foram realizados utilizando 5mM de APAP. Passo 2: a toxicidade no hepatócito inicia-se após a fase de metabolismo, onde o fármaco, nos hepatócitos, é metabolizado pelo complexo do citocromo P450 (CYP 450), gerando o metabólito tóxico NAPQI. No hepatócito deficiente para SOCS2, a geração excessiva de NAPQI resulta na ligação dessa molécula a proteínas principalmente mitocondriais, gerando diferencialmente mais ROS. Passo 3: O hepatócito deficiente para SOCS2 é mais sensível ao ROS, sofrendo então mais necrose. Passo 4: Outras células hepáticas são as responsáveis pela maior produção de IL-6 e TNF- α na ausência de SOCS2. Ainda, há menor expressão de IL-10 e TGF- β quando comparados aos animais WT. Como já bem descrito na literatura, os hepatócitos possuem receptor para IL-6. A sinalização de IL-6 pode estar ativando duas respostas detectadas na ausência de SOCS2. Passo 5: Maior ativação da ERK, que por sua vez pode estar contribuindo para o aumento de ROS. Passo 6: Maior ativação de NF- κ B, com maior translocação nuclear dessa proteína. Passo 7: ROS também pode controlar a ativação de NF- κ B, fazendo com que aumente a translocação nuclear dessa proteína. Passo 8: As alterações transcricionais geradas pela maior ativação de NF- κ B podem levar a maior

necrose do hepatócito. Passo 9: Os DAMPs liberados pela necrose do hepatócito podem recrutar outros tipos celulares. Passo 10: Há maior recrutamento de neutrófilos para a zona de necrose, devido a maior expressão de CXCL-1 por algum leucócito ou outra célula hepática. Passo 11: A administração de catalase reverte os efeitos de necrose gerados pelo ROS.87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos genes amplificados na PCR quantitativa.....	47
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Paracetamol.....	25
1.1.1 Histórico e farmacologia.....	25
1.1.2 Toxicidade.....	26
1.1.3 Mecanismo de hepatotoxicidade.....	27
1.1.4 Mecanismo de imunidade na hepatotoxicidade.....	30
1.2 SUPRESSOR DA SINALIZAÇÃO DE CITOCINAS (SOCS).....	32
1.2.1 Família SOCS.....	32
1.2.2 SOCS2.....	36
1.2.2.1 Funções biológicas de SOCS2.....	36
1.2.2.2 Papel de SOCS2 no sistema imune.....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 ANIMAIS.....	42
3.2 INDUÇÃO DO MODELO DE TOXICIDADE E TRATAMENTO COM CATALASE.....	42
3.3 DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).....	43
3.4 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	43
3.5 ENSAIO DE DOSAGEM DA MIELOPEROXIDASE.....	43
3.6 HISTOLOGIA.....	44
3.7 MICROSCOPIA INTRAVITAL.....	44

3.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	45
3.8.1 Extração de RNA	45
3.8.2 Síntese de cDNA	45
3.8.3 PCR quantitativo (qPCR)	45
3.9 CULTURA CELULAR	48
3.9.1 Análise de viabilidade celular	48
3.9.2 Avaliação da geração de estresse oxidativo	49
3.9.3 Expressão de MAPK em hepatócitos primários	49
3.9.4 Imunofluorescência	50
3.9.5 ELISA.....	50
3.10 WESTERN BLOT	51
3.10.1 Extração e dosagem de proteínas	51
3.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	51
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4 RESULTADOS	54
4.1 EXPRESSÃO DE SOCS2 NO FÍGADO DURANTE A INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA SOBREDOSE DE PARACETAMOL.....	54
4.2 AVALIAÇÃO DA LETALIDADE E PERFIL COMPORTAMENTAL APÓS INDUÇÃO DA TOXICIDADE	55
4.3 EFEITOS DA SOBREDOSE DE PARACETAMOL NO FÍGADO DE ANIMAIS DEFICIENTES DE SOCS2	57
4.4 INFLUÊNCIA DO METABOLISMO HEPÁTICO DO APAP NA FORMAÇÃO DA LESÃO.....	60
4.5 RECRUTAMENTO CELULAR DURANTE A LESÃO POR APAP.....	62
4.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS LIBERADAS NO FÍGADO DURANTE A LESÃO POR APAP	63

4.7 EFEITOS DA AUSÊNCIA DE SOCS2 NA EXPRESSÃO DE MAPK NOS HEPATÓCITOS.....	65
4.8 PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS HEPATÓCITOS CULTIVADOS COM APAP	69
4.9 SENSIBILIDADE DOS HEPATÓCITOS FRENTE ÀS CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS	71
4.10 PERFIL <i>in vitro</i> DE GERAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO	72
4.11 SENSIBILIDADE DOS HEPATÓCITOS À PRODUÇÃO DE ROS E EFEITOS DO TRATAMENTO PARA SUA DEGRADAÇÃO	73
4.12 EFEITOS DO TRATAMENTO <i>in vivo</i> COM CATALASE	75
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1 Paracetamol

1.1.1 Histórico e farmacologia

Como descrito por Prescott (2000), a descoberta do paracetamol (APAP, acetaminofeno, N-acetil-para-aminofenol) ocorreu em 1878, quando Morse produziu a fenacetina por meio de uma reação que envolveu p-nitrofenol, estanho e ácido acético glacial. A fenacetina teve seu primeiro uso em humanos atribuído a Von Mering, porém o primeiro uso clínico como analgésico e antipirético foi realizado em 1894 por Hinsberg & Treupel. Em 1948, Brodie & Axelrod descobriram que a acetanilida e a fenacetina geravam como metabólito o paracetamol. Como a fenacetina possui alto potencial nefrotóxico, esta foi retirada do mercado nos Estados Unidos, e o APAP foi então introduzido como uma alternativa a esse fármaco. Na década seguinte, vários modelos clínicos de dor confirmaram a alta eficácia analgésica do APAP, que é semelhante à da aspirina (BEAVER, 1965), e até melhor que esta quando o fármaco é utilizado como antipirético em crianças (COLGAN & MINTZ, 1957).

Apesar de ser ineficiente como anti-inflamatório, o mecanismo de ação do APAP é muito semelhante ao do grupo dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). Ambos agem inibindo a enzima ciclooxigenase (COX), diminuindo assim a formação de prostaglandina E2 (PGE2). Porém, ao contrário dos AINEs, o APAP não possui ação periférica; os efeitos analgésicos e antipiréticos do paracetamol dependem da entrada do fármaco no sistema nervoso central, onde se distribui homoganeamente independente da dose (COURAD *et al.*, 2001). Enquanto os AINEs agem no sítio ativo da COX para a prostaglandina sintase, o APAP age no sítio ativo de ligação da peroxidase, inibindo indiretamente a ativação da COX (VANE & BOTTING, 1998). A isoforma COX-2 é o alvo clinicamente mais relevante do APAP, e, como consequência, a inibição de COX-2 leva à diminuição

na produção de prostaglandinas (GRAHAM & SCOTT, 2005). Recentemente, um outro mecanismo de analgesia para o APAP foi descrito pelos grupos de Hogestatt (2005) e Ottani (2006). Este mecanismo envolve a formação de um outro metabólito do APAP chamado AM404. Este funciona no cérebro, medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal como agonista de receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2). Tal fato ocorre pois o AM404 possui uma grande semelhança estrutural com o neurotransmissor canabinóide anandamida. Esse mecanismo ajuda a explicar a sensação de relaxamento e bemestar que alguns pacientes relatam após o uso de APAP (STOCKLER *et al.*, 2004; SIMA *et al.*, 2012).

1.1.2 Toxicidade

Desde a década de 1980 o APAP tem sido o primeiro fármaco de escolha para tratamento de dor e febre em crianças (BENTLEY & MACKIE, 1995; PANDOLFI & BONATI, 2005), e aproximadamente 79% da população dos Estados Unidos consome APAP regularmente em formulações que possuem apenas esse fármaco, ou quando ele está presente em combinações terapêuticas (WILCOX *et al.*, 2005).

O paracetamol geralmente é seguro quando administrado em doses terapêuticas, entretanto o uso prolongado e superdosagem podem levar a graves lesões no fígado (ZIMMERMAN & MADDREY, 1995). Nos Estados Unidos (EUA), a toxicidade a esse fármaco é a maior causa de falha hepática aguda (LEE, 2004). Aproximadamente 70% das hospitalizações decorrentes de superdosagem por APAP neste país são devido a tentativa de suicídio, 16,7% por ingestão não intencional (principalmente envolvendo formulações de medicamentos que contenham APAP), e os outros casos ocorrem por ingestão não supervisionada, sobretudo por crianças (BUDNITZ *et al.*, 2011). A atual recomendação diária do *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA é de 4g para pessoas com 50Kg ou mais, e de 75mg/Kg em indivíduos com menos de 50Kg (GANLEY *et al.*, 2009). De acordo com o FDA, doses diárias maiores que as recomendadas podem causar hepatotoxicidade aguda, particularmente em indivíduos que já possuem

doenças hepáticas, fazem uso crônico de álcool, utilizam outros medicamentos que induzem as enzimas CYP, e em pessoas malnutridas e com idade avançada (GANLEY *et al.*, 2009; SCHMIDT *et al.*, 2002; WHITCOMB & BLOCK, 1994). Ainda, alguns indivíduos com susceptibilidade aumentada podem desenvolver hepatotoxicidade mesmo em baixas doses, como descrito por Larson (2007).

Quando há toxicidade severa, pode-se detectar elevação nas transaminases hepáticas nas primeiras 24 horas após a intoxicação (DEFENDI, 2013; GREEN *et al.*, 2010), além de falha hepática fulminante, que se manifesta como injúria renal, coagulopatia, hemorragia, acidose, edema cerebral, encefalopatia hepática, sepse e falha múltipla dos órgãos. As consequências clínicas variam desde recuperação total, em que geralmente as sequelas desaparecem e há resolução hepática histológica após meses, até a morte ou necessidade de transplante de fígado, com taxas de sobrevivência de 70% para os primeiros 5 anos (LARSEN & WENDON, 2014).

O tratamento atual para intoxicação por paracetamol é a administração de Nacetilcisteína (NAC) (SMILKSTEIN *et al.*, 1988). Este antídoto age como precursor da síntese de glutatona reduzida hepática (GSH). Essa enzima sofre conjugação com o metabólito tóxico gerado pelo APAP, permitindo sua excreção (LAUTERBURG *et al.*, 1983). Porém, há uma limitação na garantia da eficácia de 100% na prevenção da hepatotoxicidade, que só ocorre quando o NAC é administrado até 8 horas após a ingestão do APAP (SMILKSTEIN *et al.*, 1988; SMILKSTEIN *et al.*, 1991).

1.1.3 Mecanismo de hepatotoxicidade

Após administração via oral, o paracetamol é absorvido no intestino nas primeiras horas após o consumo. A maior parte do fármaco é conjugada ao ácido glicurônico ou ao sulfato, formando conjugados que são facilmente excretados. A outra pequena fração (10-15%) é metabolizada nos hepatócitos pelas enzimas do complexo citocromo P450 (principalmente CYP2e1 e CYP1a2). Esse processo

leva à formação de um metabólito tóxico, chamado N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) (ZAHER *et al.*, 1998; RAUCY *et al.*, 1989). Em doses terapêuticas, a quantidade de NAPQI que é gerada consegue ser depletada pela GSH. Porém, após ingestão de uma dose alta de APAP há depleção rápida de GSH, e como consequência o NAPQI se acumula na célula (MITCHELL *et al.*, 1973). O NAPQI em excesso liga-se as proteínas celulares, principalmente mitocondriais (TIRMENSTEIN & NELSON, 1989), levando à toxicidade e ao prejuízo de processos celulares. Esse mecanismo está esquematizado na figura 1.

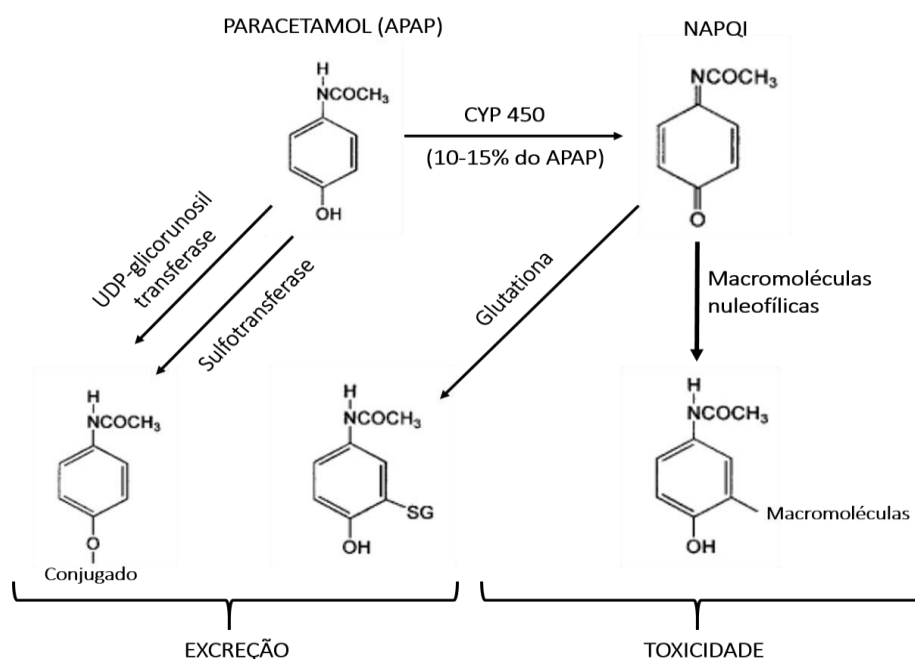


Figura 1. Representação esquemática de como o metabolismo hepático do paracetamol pode gerar toxicidade. A maior fração do APAP que chega ao hepatócito é conjugada as enzimas UDP-glicorunossil transferase e sulfotransferase, e consequentemente é excretada do organismo. Da mesma forma, uma pequena fração do APAP (entre 10 a 15%) é metabolizada pelas isoenzimas do complexo citocromo P450 (CYP 450), gerando um metabólito tóxico (NAPQI) que é eliminado após conjugação com a enzima glutathiona reduzida (GSH). Porém, quando administrado em doses altas, o APAP gera mais NAPQI do que a GSH consegue se conjugar e eliminar. Dessa forma, o NAPQI fica disponível para se ligar a macromoléculas celulares nucleofílicas, impedindo o exercício da sua correta função na célula. Assim, inicia-se o processo de disfunção celular gerado pela sobredose de APAP. Adaptado de James *et al.*, 2003.

A mitocôndria é, portanto, a principal organela alvo da toxicidade gerada pelo NAPQI, fato comprovado por ocorrer prejuízo na cadeia respiratória e aumento do estresse oxidativo nessa estrutura celular (MEYERS et al., 1988). O mecanismo envolve interferência na cadeia transportadora de elétrons, na qual a perda de elétrons leva ao aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente no complexo I mitocondrial (Figura 2) (KUSHNAREVA et al., 2002; GRIVENNIKOVA & VINOGRADOV, 2006; CAHOVA et al., 2015). Intervenção farmacológica com Metformina, que inibe o complexo I, se mostrou eficiente para redução do estresse oxidativo e da lesão hepática gerados pelo APAP (DU et al., 2016), provando a importância desse complexo na geração de lesão. Os elétrons liberados reagem com oxigênio para formar superóxido, que pode tanto ser dismutado em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular pela enzima manganês superóxido dismutase (MnSOD, SOD2) na mitocôndria, ou reagir com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito. O peróxido de hidrogênio produzido pela MnSOD pode reagir diretamente com GSH (KNIGHT et al., 2002; LIU et al., 1994) ou ser detoxificado por enzimas antioxidantes presentes no hepatócito, como catalase, GPx ou peroxirredoxinas (JAESCHKE, 2011). Já o peroxinitrito pode provocar a nitração de algumas moléculas (KNIGHT et al., 2001; KNIGHT et al., 2002; HINSON et al., 1998).

O estresse oxidativo somado a captação lisossomal de ferro na mitocôndria (SHUHENDLER et al., 2014) levam a formação do poro de transição da permeabilidade de membrana mitocondrial (*mitochondrial membrane permeability transition pore, MPT*), o qual é responsável por gerar colapso do potencial de membrana e parada na síntese de ATP (KEHRER, 2008; NEGRE-SALVAYRE et al., 2010) (Figura 2).

Além de o estresse oxidativo mitocondrial descrito acima ser muito importante para levar a morte celular, um segundo mecanismo estaria envolvido na amplificação desse processo. Esse mecanismo seria a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (*mitogenactivated protein, MAP*) *c-jun-N-terminal kinase* (JNK), que é ativada (fosforilada) no citosol no início no processo de

toxicidade. P-JNK transloca para a mitocôndria, amplificando o estresse oxidativo (YUAN *et al.*, 2010; GAO & ZHOU, 2005). Mais recentemente, estudos mostraram que a ativação de ERK, outra MAP, também é responsável por amplificar esse processo (LATCHOUMYCANDANE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010). Como consequência, toda a disfunção mitocondrial descrita acima contribui para fragmentar o DNA nuclear, levando à necrose dos hepatócitos (COHEN *et al.*, 1997; MCGILL & JAESCHKE, 2013).

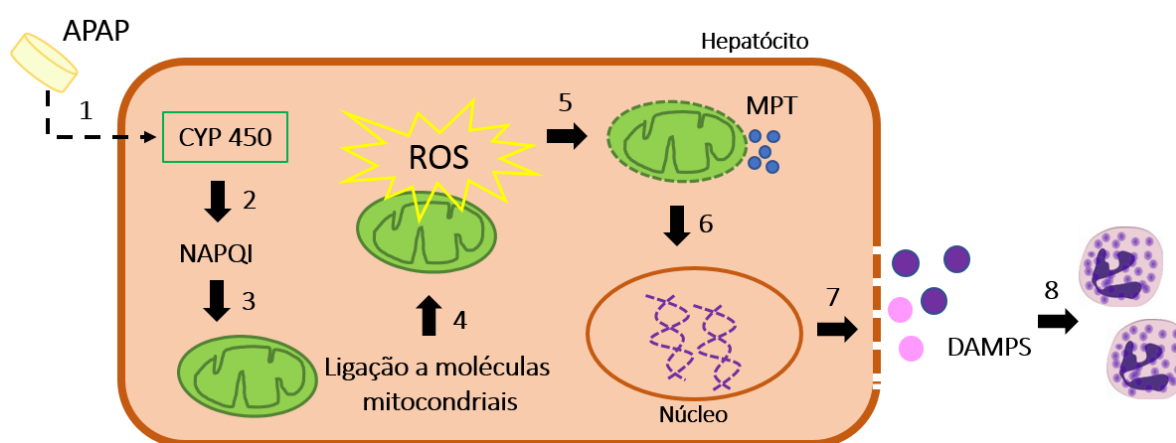


Figura 2. Fases da hepatotoxicidade após a superdosagem de paracetamol. Passo 1: a toxicidade no fígado inicia-se após a fase de metabolismo, onde o fármaco, nos hepatócitos, é metabolizado pelo complexo do citocromo P450 (CYP 450), gerando o metabólito tóxico NAPQI (passo 2). A geração excessiva de NAPQI resulta na ligação dessa molécula a proteínas celulares, principalmente mitocondriais (passo 3), iniciando o processo de lesão. A formação desses conjugados de proteínas resulta em aumento na geração de estresse oxidativo mitocondrial, principalmente de ROS (passo 4). Esse fato leva à formação do *MPT* (*mitochondrial permeability transition*) e liberação de proteínas dessa organela tais como o fator indutor de apoptose e a endonuclease G (passo 5). Esses, por sua vez, translocam para o núcleo, levando a fragmentação do DNA (passo 6) e subsequente necrose celular. Os hepatócitos necrosados liberam, então, DAMPs (passo 7), que podem amplificar o processo de lesão e/ou iniciar a fase regenerativa, com recrutamento de células do sistema imune como os neutrófilos (passo 8).

1.1.4 Mecanismo de imunidade na hepatotoxicidade

Estudos mais recentes comprovam que a resposta inflamatória gerada pela intoxicação por APAP é crítica na determinação da severidade e desfecho clínico dessa condição (ANTONIADES *et al.*, 2012). O mecanismo de geração de

necrose do hepatócito é o responsável pela posterior ativação do sistema imune. A formação de ROS pode controlar a ativação do fator transcricional pró-sobrevivência NF- κ B, e também ativar a fosforilação de JNK. (HANAWA *et al.*, 2008). Isso aumenta a produção de ROS, levando a disfunção mitocondrial e necrose do hepatócito, seguido pela liberação de vários padrões moleculares associados ao dano (*danger-associated-molecular patterns, DAMPs*) (DAHLIN *et al.*, 1984) (Figura 2).

Os *DAMPs* mais importantes gerados pela necrose do hepatócito na intoxicação por APAP são *high-mobility group box protein 1* (HMGB-1), proteínas do choque térmico e fragmentos de DNA. Os *DAMPs* são reconhecidos via receptores tipo toll (TLR) em células do sistema imune como células de kupffer (KC), macrófagos recrutados em resposta a injúria celular e células dendríticas (MARTIN-MURPHY *et al.*, 2010). Nas KC's, a ativação do inflamassoma leva a liberação de IL-1 β e IL-18 (KUBES & MEHAL, 2012), que ativam o sistema imune promovendo recrutamento celular para o sítio de inflamação. O reconhecimento de *DAMPs* nessas células também leva a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α (FISHER *et al.*, 2013). Ainda, a produção de IL-10 por KC's atenua a produção de ROS e peroxinitrito, ajudando no controle da lesão (JU *et al.*, 2002; BOURDI *et al.*, 2002).

Danos gerados por substâncias tóxicas podem levar a massiva infiltração de monócitos circulantes no fígado. Esses monócitos recrutados se diferenciam das KC's principalmente pelo padrão de expressão gênica (HOLT *et al.*, 2008). Logo quando recrutados os monócitos são ainda imaturos, sendo capazes de produzir IL-1 β , IL6, TNF- α , IFN- γ e IL-10 quando ativados (TACKE & ZIMMERMANN, 2014). Os macrófagos recrutados estão fortemente envolvidos no processo de recuperação hepática, mediando a angiogênese e o remodelamento da microvasculatura pela secreção de VEGF-A e metaloproteinases (YOU *et al.*, 2013).

Durante esse tipo de inflamação, os macrófagos são responsáveis por orquestrar respostas de outras células imunes, como os neutrófilos (ZIGMOND *et al.*, 2014). A secreção das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 por KC's guiam os neutrófilos até a área periférica de necrose. Uma vez nesse local, os neutrófilos mudam seu mecanismo de quimiotaxe e infiltram no local da necrose guiados pelo gradiente de peptídeos formilados derivados da mitocôndria (McDONALD *et al.*, 2010). Uma vez infiltrados, o reconhecimento de produtos de necrose pode aumentar a citotoxicidade dos neutrófilos. Além disso, os neutrófilos conseguem reconhecer DNA mitocondrial liberado na circulação por meio da expressão de TLR9 (MARQUES *et al.*, 2012), e são então guiados para as áreas de necrose, que também possuem alta quantidade de DNA depositado. Nessas áreas, o reconhecimento do DNA por TLR9 nos neutrófilos é crucial para a progressão da lesão, já que a remoção do DNA por uma DNase ou a ausência de TLR9 reduzem significativamente a inflamação sistêmica, o recrutamento de neutrófilos e a lesão hepática (MARQUES *et al.*, 2015b).

Não há dúvidas que a grave necrose gerada pela superdosagem de APAP induz a uma intensa resposta inflamatória estéril. As citocinas geradas durante essa resposta podem modular eventos intracelulares, e ainda aumentar a lesão através da ativação do estresse oxidativo (BOURDI *et al.*, 2002). Portanto, é de extrema importância entender como o sistema imune pode ser controlado.

1.2 SUPRESSOR DA SINALIZAÇÃO DE CITOCINAS (SOCS)

1.2.1 Família SOCS

A família das citocinas engloba uma variedade de glicoproteínas que controlam importantes processos biológicos como proliferação, diferenciação, imunidade e hematopoiese (LOTEM & SACHS, 2002). Essas proteínas são secretadas pelas células após estímulo, com objetivo de levar informações a outras células. A ligação das citocinas ao seu receptor inicia uma série de cascatas de sinalização intracelular que levam a mensagem até o núcleo. A sinalização mais importante

gerada pelas citocinas é o mecanismo da cinase Janus e transdução do sinal e ativador da transcrição (JAK-STAT). Porém, essa sinalização deve ser controlada em magnitude e duração. Logo, deve haver uma desativação desses eventos, para que a resposta celular gerada não se torne prejudicial. A sinalização gerada pelas proteínas membro da família SOCS (*Supressor of cytokine signalling*) representam um mecanismo pelo qual esse controle de resposta negativa ocorre (WORMALD & HILTON, 2003; O'SULLIVAN *et al.*, 2007).

As proteínas SOCS são responsáveis por modular a sinalização de citocinas e fatores de crescimento, sendo que prejuízos nessa regulação têm sido relacionados a várias doenças inflamatórias e neoplásicas. Existem oito membros da família SOCS descritos em mamíferos: SOCS1-7 e CISH (*cytokine-inducible SH2-containing protein*). Cada proteína é constituída por três diferentes domínios; um domínio Nterminal de baixa conservação (variável em comprimento entre os membros), um domínio central e conservado SH2 (*Src-homology 2*), e um domínio ainda mais conservado C-terminal chamado SOCS box (ZHANG *et al.*, 1999; HILTON *et al.*, 1998) (Figura 3).

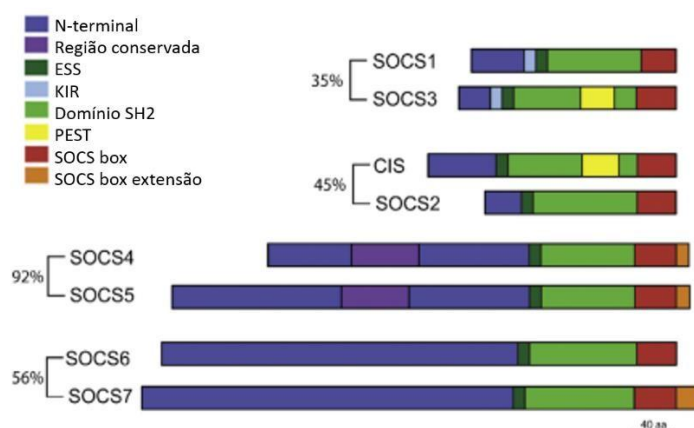


Figura 3. Estrutura proteica da família SOCS. As proteínas SOCS contém um domínio SOCS box Cterminal, um domínio central SH2 e uma região N-terminal com comprimento e composição de aminoácidos variáveis. Os membros da família estão agrupados em pares baseado na homologia da sequência de aminoácidos presentes no domínio SH2 (mostrado como percentual). Características próprias estão diferenciadas pela cor e enumeradas na legenda. Abreviações: região inibitória de cinase (*kinase inhibitory region* - *KIR*), domínio SH2 estendido (*extended SH2 domain* - *ESS*), região rica em prolina,

ácido glutâmico, serina e treonina (*proline, glutamic acid, serine and threonine – PEST-rich region*). Adaptado de Linossi *et al.*, 2013.

Apesar de os membros da família SOCS possuírem homologia na sua estrutura, durante a evolução eles tornaram-se distintos. O papel de SOCS tem sido estudado em sinalização de citocinas via receptores que perdem a atividade intrínseca de tirosina cinase, que são responsáveis por recrutar efetores como as cinases citoplasmáticas JAKs (O'SULLIVAN *et al.*, 2007). Como descrito por Uren & Turnley (2014), a ligação das citocinas ao receptor na superfície celular promove associação das subunidades do receptor e, como consequência, ocorre uma cascata de eventos de fosforilação. Essa cascata inicia-se com a fosforilação e ativação do receptor JAK. A proteína JAK então fosforila sítios na parte citoplasmática do receptor, criando locais de ligação para as proteínas STAT. Há fosforilação e dimerização de STATs, e esses dímeros translocam para o núcleo onde podem iniciar a transcrição de vários genes, relacionados principalmente a sobrevivência e proliferação. Ainda, STAT também induz a transcrição de reguladores negativos da sinalização como SOCS.

De forma geral, SOCS são considerados inibidores negativos da sinalização JAKSTAT induzida por citocinas. Há quatro principais formas de as proteínas SOCS exercerem essa inibição. Primeiro, SOCS pode se ligar competitivamente ao receptor alvo, bloqueando o recrutamento de STAT (BABON *et al.*, 2006). Segundo, SOCS pode marcar o receptor para degradação no proteassoma; terceiro, JAK pode ser marcado para degradação no proteassoma (PIESSEVAUX *et al.*, 2008) e, por último, um mecanismo exclusivo de SOCS 1 e 3 é se ligar a JAK e inibir diretamente sua atividade cinase, já que essas duas proteínas possuem uma região inibidora de cinases que funciona como um pseudo-substrato para JAK (YASUKAWA *et al.*, 1999) (Figura 4).

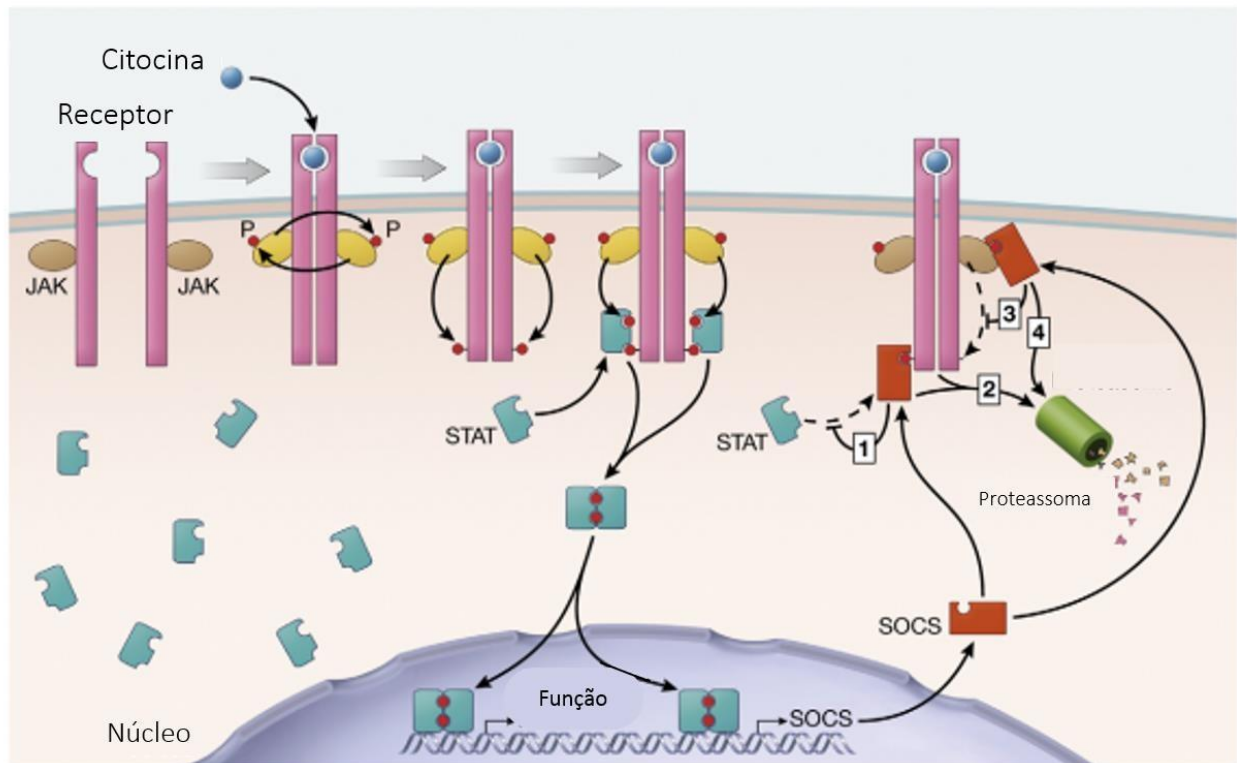


Figura 4. Mecanismo de ação da família SOCS como inibidores da sinalização celular. As citocinas geram o sinal por meio da ligação a seus receptores, levando à fosforilação de JAK dando início a cascata. Em seguida, ocorre fosforilação e dimerização de STATs, que translocam para o núcleo iniciando a transcrição gênica. Além de ativar genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e função, STATs também ativam a transcrição de SOCS. Esses então podem atuar inibindo a sinalização de citocinas de quatro maneiras: (1) bloqueando o recrutamento de STAT para o receptor de citocina; (2) marcando o receptor para degradação no proteassoma; (3) ligando-se a JAKs, inibindo diretamente sua atividade cinásica; (4) marcando JAKs para degradação no proteassoma. Adaptado de Palmer & Restifo (2009).

As proteínas SOCS são potentes inibidores de vários mecanismos de sinalização de citocinas. Entretanto, também participam de um mecanismo de supressão independente de estímulo por citocinas. Esse mecanismo envolve a regulação cruzada entre as proteínas SOCS. SOCS2, SOCS6 e SOCS7 têm a capacidade de interagir com a região SOCS box de todos os membros da família. Essa regulação cruzada permite que proteínas SOCS que são induzidas mais tardiamente (como SOCS2) regulem negativamente as que são induzidas primeiro (como CIS, SOCS1 e SOCS3), retomando a capacidade da célula de ser

novamente sensível ao estímulo de citocinas (TANNAHILL *et al.*, 2005; PIESSEVAUX *et al.*, 2006).

1.2.2 SOCS2

1.2.2.1 Funções biológicas de SOCS2

A proteína SOCS2 teve seu fenótipo *in vivo* primeiramente descrito por Metcalf *et al.*, em 2000. Nesse trabalho, o autor mostrou que animais deficientes para SOCS2 possuem fenótipo de gigantismo; há aumento de cerca de 40% no peso corporal após seis semanas de vida, consequência do aumento no comprimento dos ossos e no tamanho de muitos órgãos. Tal fenótipo é justificado pela regulação negativa que SOCS2 exerce no hormônio de crescimento. Para que esse fenótipo ocorra, é essencial a presença e ativação de STAT5, fato observado nos hepatócitos de animais deficientes para SOCS2. Há uma prolongada fosforilação de STAT5a e STAT5b em resposta ao hormônio do crescimento, e a ausência de STAT5 faz com que os animais não apresentem mais o fenótipo de gigantismo (GREENHALGH *et al.*, 2002a). Além de STAT5, o hormônio de crescimento também regula outros mensageiros intracelulares como STAT3, ERK 1/2 e Akt (ZERRAD-SAADI *et al.*, 2011).

Outras características de animais deficientes para SOCS2 são aumento nos níveis de IGF-1 (insulin-like growth factor-1), segundo mensageiro do hormônio de crescimento, e diminuição nos níveis de proteínas urinárias e espessamento da pele, devido ao acúmulo de colágeno (METCALF *et al.*, 2000). Além do hormônio do crescimento e IGF-1, SOCS2 também regula a sinalização de outras citocinas que ativam STAT5, como o fator de crescimento epidermal (GOLDSHMIT *et al.*, 2004), prolactina (HARRIS *et al.*, 2006), fator inibitório de leucemia (LIF - *Leukemia inhibitory factor*) (MINAMOTO *et al.*, 1997), IL-2, IL-3 (TANNAHILL *et al.*, 2005) e IL-6 (NICHOLSON *et al.*, 1999).

O nível de expressão de SOCS2 determina se ele funcionará como supressor ou ativador da cascata de sinalização de crescimento. Em baixos níveis celulares, SOCS2 inibe os eventos de sinalização gerados pelo hormônio do crescimento, prolactina e citocinas. Em altos níveis, SOCS2 pode restabelecer ou mesmo aumentar a resposta a esses fatores de crescimento (PIESSEVAUX *et al.*, 2006; PEZET *et al.*, 1999). Esse efeito dualístico é exclusivo de SOCS2. Ainda, a capacidade de SOCS2 em potencializar a resposta depende da competição, em altas concentrações, com SOCS1 e SOCS3. Como consequência há bloqueio de seus efeitos inibitórios, além de poder acelerar a degradação desses outros membros da família (TANNAHILL *et al.*, 2005; GREENHALGH *et al.*, 2002b).

SOCS2 é importante na regulação de vários processos celulares, como desenvolvimento do sistema nervoso central, sendo importante por exemplo na diferenciação dos neurônio e crescimento de neuritos (RANSOME *et al.*, 2004), controle da expressão de fatores de transcrição neurogênicos (TURNLEY *et al.*, 2002) e na regulação de receptores, como o de neurotrofina (UREN *et al.*, 2014); no metabolismo, principalmente gerando alterações como consequência da maior ação do hormônio do crescimento (RICO-BAUTISTA *et al.*, 2006); no câncer, em que a maior expressão de SOCS2 tem sido relacionada a neoplasias em mama, pulmão, fígado e ovário, como descrito por Letellier & Haan (2016). Ainda, SOCS2 é muito importante na regulação do sistema imune, em processos inflamatórios que envolvam infecção ou sejam estéreis, como descrito abaixo.

1.2.2.2 Papel de SOCS2 no sistema imune

A expressão de SOCS2 é significativa em órgãos como rim, pulmão, testículos, fígado e cérebro (DEY *et al.*, 1998; METCALF *et al.*, 2000), dentre outros. Essa proteína também possui funções importantes em células do sistema imune, como no mecanismo anti-inflamatório já bem descrito capaz de controlar respostas geradas pelo sistema imune inato. Esse mecanismo envolve a ativação do receptor de arilhidrocarbonetos (AhR, *Aryl hydrocarbon receptor*) por lipoxina e metabólitos do triptofano. Uma vez ativado, o receptor AhR transloca para o

núcleo, ativando a transcrição de genes como o de SOCS2 (MACHADO *et al.*, 2006). Em modelo de infecção por *Toxoplasma gondii*, a ativação de SOCS2 induz ubiquitinação e degradação proteossomal de TRAF6, impedindo a expressão de citocinas próinflamatórias por células dendríticas (McBERRY *et al.*, 2012).

Além da toxoplasmose, SOCS2 também possui papel em outras doenças infecciosas, como na doença de Chagas experimental. Nesta, há diminuição da inflamação e da parasitemia em animais deficientes para SOCS2 durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi* (ESPER *et al.*, 2012). SOCS2 também é importante na regulação de doenças infecciosas que afetam o sistema nervoso central (SNC). Em infecção de malária experimental por *Plasmodium berghei* ANKA, SOCS2 possui papéis diferentes durante a evolução da doença, sendo crucial na regulação da resposta imune e na produção de fatores neurotróficos, com participação também no controle do estresse oxidativo (BRANT *et al.*, 2016). Ainda, a presença de SOCS2 está relacionada a maior inflamação, que leva a encefalite em infecções pelo vírus do herpes simples tipo 1 (DA CUNHA SOUSA *et al.*, 2016). Porém, o resultado é o oposto no modelo de meningoencefalite causada pelo vírus do herpes bovino 5; há menor inflamação cerebral na presença de SOCS2 (APARECIDA SILVA BARBOSA *et al.*, 2016). Além de regular o sistema imune e a produção de fatores neurotróficos, a presença ou ausência de SOCS2 também é capaz de provocar diferentes alterações comportamentais em animais (BRANT *et al.*, 2016; APARECIDA SILVA BARBOSA *et al.*, 2016).

Além de inflamações geradas por agentes infecciosos, Letellier & Haan (2016) descreveram que SOCS2 também está envolvido na regulação de outros processos inflamatórios como osteoartrite, lúpus eritmatoso sistêmico, artrite reumatoide, psoríase, dermatite alérgica de contato e diabetes tipo 2.

Alguns processos inflamatórios estéreis que ocorrem no fígado têm descrito a importância da regulação exercida por SOCS2. A ausência dessa proteína diminui a esteatose hepática induzida por dieta rica em gordura, porém há

aumento na resistência à insulina e na resposta inflamatória (maior expressão de IL-6, IFN- γ e iNOS), além de os animais deficientes para SOCS2 apresentaram aumento na fosforilação e ativação de p-NF κ B no fígado, fato que se intensificou quando os animais receberam a dieta (ZADJALI *et al.*, 2012). Masuzaki e cols., em 2015, mostraram que SOCS2 é induzido logo após lesão hepática (hepatectomia parcial), com o objetivo de diminuir a liberação do hormônio do crescimento, o que causa redução na proliferação dos hepatócitos para dar tempo de o fígado primeiramente reestabelecer suas demandas metabólicas. Após esse processo, SOCS2 diminui a produção do IGF-1, mecanismo que, por sua vez, aumenta os níveis de GH. Tal fato leva ao aumento na proliferação dos hepatócitos, evoluindo para a regeneração do órgão.

Como descrito anteriormente, a inflamação estéril causada no fígado pelo paracetamol, em casos de superdosagem ou mesmo quando esse fármaco é administrado em doses terapêuticas, é uma das maiores causas de falência hepática. O papel da família SOCS no controle dessa injúria foi estudado apenas para o membro SOCS3. Nesse estudo, verificou-se que a superexpressão de SOCS3 em células T aumenta a lesão induzida por APAP por maior ativação de STAT1 e inibição de STAT3 nos hepatócitos, possivelmente devido a níveis elevados de IFN- γ e TNF α (NUMATA *et al.*, 2007).

Recentemente, tem surgido um interesse crescente em entender os mecanismos imunológicos envolvidos na lesão hepática causada por APAP, principalmente devido as limitadas alternativas terapêuticas existentes. O benefício do tratamento farmacológico com NAC diminui com o passar do tempo após a superdosagem. Além disso, em tempos tardios, onde a resposta inflamatória é mais relevante, a única opção de tratamento é o transplante de fígado, com uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 70% para os primeiros cinco anos (LARSEN & WENDON, 2014). Considerando a falta de potenciais doadores e os altos custos de um transplante hepático, há a necessidade de alternativas de tratamento para esse tipo de intoxicação. Ainda, a expressão de SOCS2 é crítica para manter a função de alguns tipos celulares, fato bem descrito para os

cardiomiócitos, onde a ausência dessa proteína favorece o desenvolvimento de disfunção cardíaca durante infecção por *T. cruzi* (ÉSPER *et al.*, 2012). Sendo assim, esse trabalho pretende avaliar o potencial de SOCS2 em modular a geração de estresse oxidativo e a resposta imune em direção a um melhor progresso clínico na lesão causada por APAP no fígado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar funcionalmente o papel da proteína SOCS2 na inflamação estéril induzida por paracetamol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A- Verificar a expressão de SOCS2 durante a inflamação causada pela superdosagem de paracetamol;

B- Avaliar se SOCS2 influencia na sobrevivência e no comportamento dos animais após a superdosagem por paracetamol;

C- Avaliar os efeitos da sobredose do paracetamol na geração de necrose hepática em animais deficientes para SOCS2;

D- Verificar o papel de SOCS2 no metabolismo hepático do paracetamol e o perfil inflamatório causado pelo fármaco;

E- Estudar se SOCS2 regula a via de sinalização intracelular das MAPK e NF- κ B em hepatócitos primários tratados com paracetamol;

F- Verificar a possível inter-relação da expressão de SOCS2 com a geração de estresse oxidativo, *in vitro* e *in vivo*, e indução da lesão causada por APAP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos da linhagem C57BL/6 (wild-type – WT), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG), e camundongos nocautes para SOCS2 (SOCS2 -/-), ambos entre 8 e 10 semanas, foram utilizados nesse estudo. Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), com exceção da noite anterior aos experimentos, onde foram mantidos em jejum até o início do mesmo. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 331/2015).

3.2 INDUÇÃO DO MODELO DE TOXICIDADE E TRATAMENTO COM CATALASE

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram tratados via oral por gavagem com 600 mg/Kg de paracetamol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvido em salina estéril aquecida. Os controles receberam apenas salina estéril aquecida. Nos experimentos para avaliar a letalidade e as alterações de comportamento relacionados ao APAP, os animais foram observados durante 48 e 4 horas após o tratamento, respectivamente. Para os outros testes realizados nesse trabalho, após 2, 6 e 12 horas os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg/kg, Syntec, SP, Brasil) e xilazina (15 mg/kg, Syntec, SP, Brasil) e sacrificados para coleta de sangue e fígado. Adicionalmente, 5000 U/Kg de catalase (Sigma-Aldrich) foram administrados i.p. no esquema 12h antes do tratamento com

APAP, e no momento do tratamento. Nesses experimentos, os animais foram sacrificados 2 horas após a administração de APAP.

Nos ensaios para avaliar alterações de comportamento, após a administração da sobredose de APAP os animais foram imediatamente acondicionados em gaiolas com ração e água *ad libitum*, sendo 4 animais por gaiola. Os animais foram filmados por 4 horas, e as imagens gravadas. Posteriormente, quantificou-se o número de vezes que os animais atravessaram o centro da caixa (*crossing*), como medida de alteração comportamental frente a doença. Essa característica pode indicar mudanças dentro do comportamento de ansiedade.

3.3 DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)

A determinação da atividade da ALT foi feita no soro dos animais utilizando o Kit Transaminase ALT Cinético (Bioclin, Belo Horizonte, MG), seguindo as instruções do fabricante.

3.4 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A quantidade de GSH no fígado foi determinada colorimetricamente pela reação com DTNB (Ellman's reagent). Cerca de 150mg de fígado foram homogeneizados em 150 μ L de PBS. Adicionou-se 300 μ L de TCA e, após centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi utilizado para realização do ensaio. A 40 μ L da amostra foram adicionados 240 μ L de Tris-HCl e 20 μ L de DTNB. A absorbância das amostras foi lida em 415 nm, e comparada a uma curva-padrão de GSH.

3.5 ENSAIO DE DOSAGEM DA MIELOPEROXIDASE

Para dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos, cerca de 100 mg de fígado foram macerados em homogeneizador com solução tampão (PBS - EDTA) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em NaCl 0,2% gelado. Após 30 segundos foi adicionado

NaCl 1,6% com glicose 5% gelado. O material foi rapidamente homogeneizado e submetido à nova centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em PBS com HTAB 0,5%. As amostras foram homogeneizadas e congeladas/descongeladas seguidamente três vezes em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 25 µl da cada amostra (diluído 1:5) foi adicionado à placa de 96 poços, em duplicata, onde o branco foi representado por PBS. Em seguida os poços receberam uma solução de DMSO com o substrato TMB, e a placa incubada em câmara escura por cinco minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 100 µl de H₂SO₄ e a absorbância medida em 450 nm. Os resultados foram expressos como absorbância média ± EPM.

3.6 HISTOLOGIA

Amostras de fígado dos animais sacrificados foram obtidas e processadas para avaliação histopatológica. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 10% por 24 horas e embebidas em parafina para o corte do tecido (5µM de espessura), e então coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e avaliadas em microscópio (BX53, Olympus Latin America Inc.) adaptado a uma microcâmara (Q-Color3, Olympus Latin America Inc., SP, Brasil). O escore histopatológico foi adaptado de Costa *et al.* (2012), onde avaliou-se degeneração e necrose dos hepatócitos, infiltrado inflamatório celular e hemorragia. Uma escala de escore (0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante; 5, severo) foi adicionada em cada parâmetro da análise. A pontuação total foi obtida como a soma dos valores, e os resultados foram mostrados como a média dos valores dos animais do grupo. As análises foram realizadas de forma cega por um investigador previamente treinado.

3.7 MICROSCOPIA INTRAVITAL

Para a análise intravital do fígado dos animais WT e SOCS2 -/- após tratamento com paracetamol (item 3.1), os animais foram anestesiados i.p. com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). A microscopia confocal intravital foi realizada como descrito por

Marques *et al.*, em 2015b. Os anticorpos fluorescentes Sytox Green (100 µL/animal, 50 µM, Invitrogen) e PE conjugado com anti-GR1 (4 µg/animal; 40 µg/mL, eBioscience) foram injetados por via intravenosa 10 minutos antes das imagens na objetiva de 20x em microscópio confocal (Nikon, ECLIPSE 50i). As quantificações de necrose e de neutrófilos no fígado foram realizadas utilizando o programa Volocity 6.3 (PerkinElmer).

3.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

3.8.1 Extração de RNA

O RNA total foi obtido de aproximadamente 30mg de fígado dos animais WT e SOCS2^{-/-} tratados ou não com APAP. A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). Ao final da extração, concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm. As amostras foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

3.8.2 Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA, utilizou-se o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 2000 ng de RNA para a síntese de cDNA. A reação foi submetida a 25°C por 5 minutos, 50°C por 90 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA produzido foi diluído 1:10 e armazenado a -20°C.

3.8.3 PCR quantitativo (qPCR)

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Dentre os genes testados (RPL4, GAPDH, 18S e HPRT), o GAPDH mostrou-se o melhor normalizador tanto

para os genes avaliados no fígado quanto para os avaliados em cultura de hepatócitos.

As sequências dos iniciadores para os genes avaliados estão listadas na tabela 1. O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5 μ L de SYBR® Green qPCR SuperMix (Life Technologies, Carlsbad, CA), 5 mM de cada iniciador e 2 μ L de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 10 μ L. As reações foram realizadas utilizando o sistema ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System SDS (Life Technologies). O protocolo de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5 μ L de SYBR Green SuperMix e 5 mM de cada iniciador.

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (threshold cycle) e na eficiência de amplificação. O Ct obtido para o gene de interesse foi normalizado subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH) para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de Δ Ct, calculou-se o $\Delta\Delta$ Ct, que corresponde ao Δ Ct amostra – Δ Ct do calibrador. Nesse estudo, o calibrador utilizado foi o tecido ou célula que não recebeu o tratamento com APAP. A relação da expressão gênica entre a amostra e o calibrador foi calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ Ct (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram obtidos no software SDS 7500 versão 2.0.4 e analisados no Prism 5.0.

Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

Tabela 1 - Sequência dos genes amplificados na PCR quantitativa.

Gene	Iniciadores	Sequência
TNF-α	Senso	5'ACGGCATGGATCTCAAAGAC3'
	Antisenso	5'AGATAGCAAATCGGCTGACG3'
INF-γ	Senso	5'CCACAGCCCAGAGAGTGACCAGC3'
	Antisenso	5'AGGCCCTCTTGTTCCCGAGGTTA3'
IL-6	Senso	5'TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG3'
	Antisenso	5'TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA3'
IL-10	Senso	5'GCTCTTACTGACTGGCATGAG3'
	Antisenso	5'CGCAGCTCTAGGAGCATGTG3'
IL-12a	Senso	5'GCTGGACCCTTGCATCTGGCG3'
	Antisenso	5'GGTGGCCAAAAAGAGGAGGTAGCG3'
TGF-β	Senso	5' GAGGTCACCCGCGTGCTA3'
	Antisenso	5'TGTGTGAGATGTCTTTGGTTTTCTC3'
CCL2	Senso	5'AGGAAGATCTCAGTGCAGAG3'
	Antisenso	5'AGTCTTCGGAGTTTGCCTTTG3'
CXCL1	Senso	5'TGTCCCAAGTAACGGAGAAA3'
	Antisenso	5'TGTCAGAAGCCAGCGTTCAC3'
GAPDH	Senso	5'ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA3'
	Antisenso	5'CGGCCAAATCCGTTACACCGA3'

3.9 CULTURA CELULAR

Hepatócitos primários de camundongos WT e SOCS 2^{-/-} foram isolados para cultura com APAP. A veia porta dos animais foi canulada, e o fígado foi perfundido com uma solução contendo colagenase de *Clostridium histolyticum* (4 mg/ml; Sigma-Aldrich).

Após digestão inicial, o fígado foi retirado e, em uma placa de Petri com meio William's (Sigma-Aldrich) o órgão foi levemente desfeito com uma pinça. Após duas filtrações em malhas de nylon, a suspensão celular foi centrifugada a 420 rpm por 2 minutos, e os hepatócitos obtidos no sedimento. A concentração celular foi ajustada para 4×10^5 células/mL em placa de 24 poços tratada com colágeno tipo I (40 µg/mL). As células foram incubadas por 1 hora em estufa 37°C/5%CO₂ para aderir a placa. Após esse tempo, o APAP foi adicionado na concentração de 5 mM, dissolvido em 1% DMSO.

Como controle, utilizou-se meio William's com 1% de DMSO. As culturas permaneceram em estufa 37°C/5%CO₂ por 15, 30, 45 e 90 minutos para os ensaios de western blot, e 2, 6 e 12 horas para os ensaios de viabilidade celular. Conforme descrito no item abaixo, outros estímulos também foram utilizados para testar a viabilidade celular dos hepatócitos.

3.9.1 Análise de viabilidade celular

Além do APAP na concentração de 5mM e 40mM, outros estímulos foram utilizados para avaliar se há diferença na sensibilidade dos hepatócitos provenientes dos animais WT e SOCS2^{-/-}. Foram utilizadas as citocinas TNF-α (R&D Systems; 100ng/mL), IFN-γ (R&D Systems; 100U/mL) e IL-6 (R&D Systems; 100ng/mL), sozinhas ou em combinação entre elas e com APAP. Também foi testada a sensibilidade dos hepatócitos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma-Aldrich) na concentração de 250 mM. Ainda, utilizou-se a catalase (60U/mL) e apocinina

(Acetovanillone, Sigma-Aldrich; 250 μ M), sozinhas ou em combinação, em cultura com APAP 5mM.

Para verificar a viabilidade celular dos hepatócitos primários, a medida da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi realizada nos sobrenadantes coletados após 2, 6 e 12 horas, utilizando o kit cinético de LDH (Bioclin, Brasil), conforme as recomendações do fabricante. Os dados foram expressos como razão em relação ao controle não tratado.

3.9.2 Avaliação da geração de estresse oxidativo

Hepatócitos primários isolados de animais WT e SOCS2^{-/-} foram tratados com 5mM de APAP, e incubados com as seguintes sondas: 25 μ M de 2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA; Invitrogen), 25 μ M de dihydrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Carlsbad, CA) e 10 μ M de 4,5diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Sigma-Aldrich) para identificação de ROS, peroxinitrito e óxido nítrico (NO), respectivamente. As sondas H2DCF-DA e DAF-2AD foram adicionadas ao sobrenadante 30 minutos antes do tempo final da cultura, e a sonda DHR 123 foi adicionada 1 hora antes. Após os tempos finais de 2, 12 e 24 horas, as amostras foram quantificadas por fluorimetria. Os dados foram normalizados em relação ao controle (hepatócitos não tratados) e expressos como unidades arbitrárias de fluorescência.

3.9.3 Expressão de MAPK em hepatócitos primários

Após os períodos de incubação com 5 mM de APAP (15, 30, 45 e 90 minutos), hepatócitos primários de animais WT e SOCS 2^{-/-} foram armazenados para posterior verificação da fosforilação de proteínas da via das MAPKs por western blot (descrita no item 3.10).

3.9.4 Imunofluorescência

Hepatócitos foram cultivados em placas de 24 poços com lamínulas de cultura tratadas com colágeno tipo I, conforme descrito no item 3.9. Após 0, 15, 30, 45 e 90 minutos de tratamento com 5mM de APAP, as lamínulas foram retiradas e os hepatócitos fixados com acetona gelada. Após a fixação, as células foram permeabilizadas com solução de Perm-Wash (BD Bioscience, San Jose, CA) em PBS acrescido de 1% de albumina bovina (PBS-BSA 1%, Sigma). A incubação com o anticorpo primário p-NFKb (1:100; Cell Signalling) ocorreu durante 30 minutos, seguido pelo corante nuclear iodeto de propídeo (PI, 30 μ M; Sigma-Aldrich), também durante 30 minutos. As imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal (Nikon, ECLIPSE 50i). O perfil de fluorescência foi avaliado no programa Volocity 6.3.

3.9.5 ELISA

Os sobrenadantes das culturas de hepatócito foram coletados após 0, 2, 6, 12 e 24 horas de incubação com 5mM de APAP, e armazenados a -20°C até o dia do ensaio. O ensaio foi realizado para detectar os níveis das citocinas TNF- α e IL-6, e da quimicina CXCL-1, utilizando kit específico de anticorpos (R&D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, resumidamente descrito abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (TC-Platte 96 well, SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Germany). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, e a sensibilização ocorreu durante 18 horas à 4° C. O bloqueio foi realizado utilizando PBS-BSA1%, por duas horas. Após o bloqueio, 50 μ l das amostras de sobrenadante foram adicionadas às placas, e incubadas por 18 horas. O anticorpo de detecção, conjugado à biotina, foi adicionado e incubado por mais duas horas, à temperatura ambiente, seguido de incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem- 1:4000). A revelação da reação foi feita com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma), seguida da

medida de absorvância no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para comprimento de onda de 450 nm.

3.10 WESTERN BLOT

3.10.1 Extração e dosagem de proteínas

A técnica de western blot foi utilizada para verificar a expressão de proteínas em dois tipos de amostras: fígado (cerca de 40 µg) e hepatócitos primários (6×10^5 células). As proteínas foram extraídas utilizando uma solução de lise constituída de NaCl 5M, NaF 1M, DTT 1M, NaVO₃ 1M, PMSF 100mM, leupeptina 2,1 mg/mL, aprotinina 1,7 mg/mL, e 50% do volume final de tampão de lise 2x (1% de Triton X100, 10% de Tris-HCl 1M, 20% de glicerol e 0,04% de EDTA 0,5M). A proporção utilizada foi de 1 mL da solução de lise para cada 40 µg de fígado, e 150 µL de solução de lise para 6×10^5 hepatócitos.

Após adição da solução de lise, as células sofreram lise mecânica em homogeneizador, e foram posteriormente incubadas por 15 minutos no gelo. Após esse tempo, foram centrifugadas a 7900 g, 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Uma alíquota foi separada para dosagem das proteínas.

A técnica de Bradford foi utilizada para dosagem das proteínas. O reagente de Bradford (BioRad, Hercules, CA) foi diluído na proporção de 4 partes do reagente para 1 parte de água mili-Q, e 200 µL foram adicionados a 2 µL de amostra em uma placa de 96 poços. A absorvância foi determinada a 595 nm, e a concentração de cada amostra é determinada comparando-se a uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) que varia de 2 a 0,125 mg/mL de proteína.

3.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A quantidade de proteína aplicada no gel variou conforme o tipo de amostra: 40 µg para hepatócitos e 80 µg para fígado. As amostras foram misturadas a um tampão

desnaturante e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Posteriormente foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e submetidas a eletroforese a 60V por cerca de duas horas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento TransBlot (BioRad), a 25 volts e 1 ampere, por trinta minutos. Uma vez com as proteínas, a membrana foi incubada com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-Tween 1% para bloquear possíveis ligações inespecíficas entre o anticorpo e a proteína. Após uma hora, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween 1%, e o anticorpo primário foi diluído em TBS-Tween 1% + 1% BSA na concentração determinada pelo fabricante. A membrana foi incubada com o anticorpo primário por toda a noite. Os anticorpos primários utilizados foram:

SOCS2, P-JNK, P-ERK, P-p38, P-IK β , GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) e β -actina (Sigma-Aldrich). No outro dia, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween 1%, e o anticorpo secundário, também diluído em TBS-Tween 1% + 1% BSA na concentração determinada pelo fabricante, foi adicionado à membrana e incubado por duas horas. Após mais três lavagens com TBS-Tween 1%, a membrana foi revelada utilizando-se o reagente quimioluminescente ECL Western Blot Detection Kit (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) no equipamento ChemiDoc™ MP (BioRad). As análises foram realizadas no programa ImageJ. Todas as membranas foram também incubadas com uma proteína constitutiva, para normalização dos resultados. Nesse estudo, as proteínas β -actina ou GAPDH foram utilizadas como normalizadores. Portanto, todos os resultados foram expostos como uma razão da expressão da proteína de interesse em relação a β -actina ou GAPDH.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste foi one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). O nível

de significância foi definido como $p < 0.05$. Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DE SOCS2 NO FÍGADO DURANTE A INFLAMAÇÃO CAUSADA PELA SOBREDOSE DE PARACETAMOL

Primeiramente, foi importante determinar como a expressão de SOCS2 varia ao longo da cinética de tratamento com 600 mg/kg de peso de paracetamol no fígado do animal WT. Por meio de dosagem semi-quantitativa, verificou-se que a expressão de SOCS2 começa a diminuir 2 horas após o tratamento, permanecendo abaixo dos níveis basais 6 e 12 horas após a administração de APAP (figura 5).

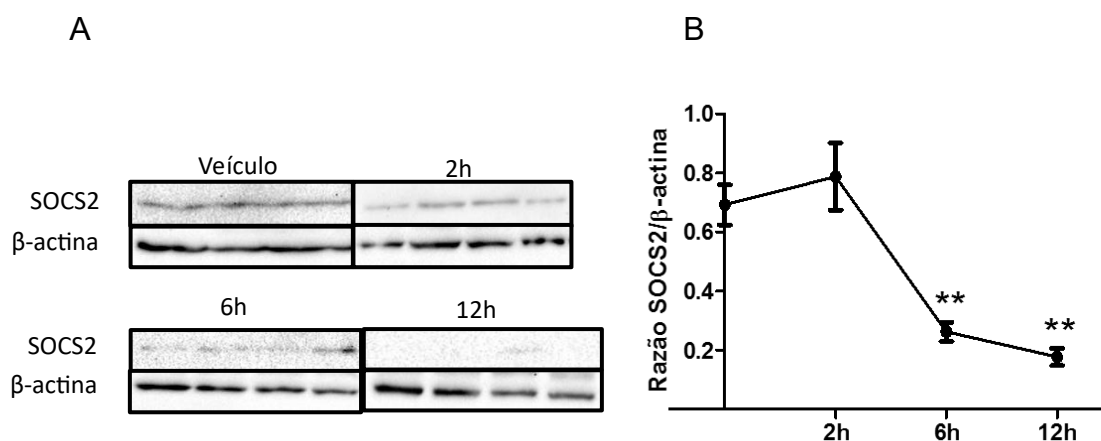


Figura 5 – Expressão de SOCS2 no fígado de animal WT após tratamento com overdose de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP, e após 2, 6 e 12 horas foram eutanasiados para coleta do fígado. Posteriormente foi realizado western blot dos fígados utilizando anticorpos específicos para SOCS2 e β -actina (controle endógeno e normalizador). O gráfico representa o resultado da razão entre a expressão da proteína analisada pela expressão do controle endógeno. A. Western blot representativo de dois experimentos independentes (n=4 por grupo). B. Densitometria média dos mesmos dois experimentos de western blot. Os dados representam média \pm EPM. ** $p < 0,01$, ambos vs controle e 2h (significância estatística realizada por one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey).

4.2 AVALIAÇÃO DA LETALIDADE E PERFIL COMPORTAMENTAL APÓS INDUÇÃO DA TOXICIDADE

Para avaliar se a ausência de SOCS2 leva a maior letalidade em intoxicação por paracetamol, camundongos WT e SOCS2^{-/-} foram tratados com uma sobredose do fármaco (600 mg/kg), e observados durante 48 horas. As análises mostraram que cerca de 33% dos animais controles morrem nas primeiras 24 horas após a administração do fármaco, enquanto esse número chega a 50% dos animais isentos de SOCS2. Após esse período, os animais SOCS2^{-/-} continuam morrendo em maior proporção, alcançando o dobro de morte (83%) em relação ao controle (41,6%) (Figura 6).

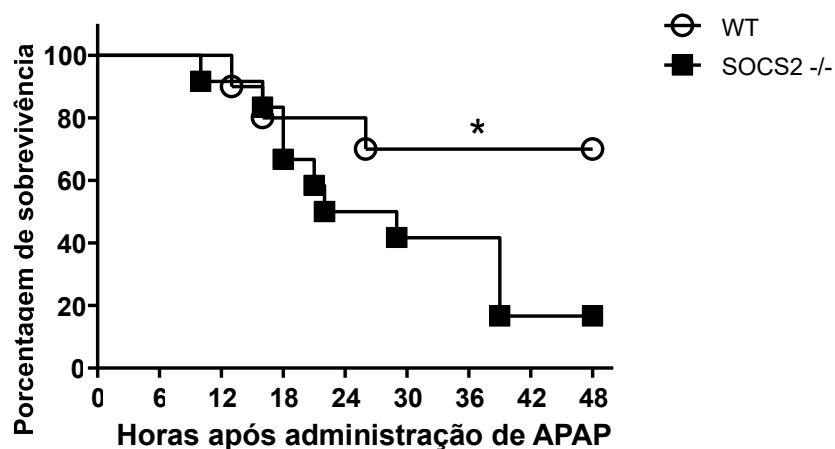


Figura 6 – Deficiência de SOCS2 leva à maior letalidade em camundongos após tratamento com sobredose de APAP (600 mg/Kg). Os animais WT (n=12) e SOCS2^{-/-} (n=12) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP, e posteriormente observados por 48 horas para avaliação da letalidade. O gráfico representa os resultados de dois experimentos independentes (n total = 12 por grupo). *p<0,05 (significância estatística realizada pelo teste de Log-rank).

Como descrito na introdução, o APAP atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizado no SNC. Além disso, a literatura relaciona fenômenos inflamatórios ao surgimento de alterações comportamentais. É o chamado *sickness behaviour*, que envolve várias alterações do comportamento, como a ansiedade, que também estão

presentes no processo de depressão (MAES *et al.*, 2012). Com essas informações, o próximo passo foi investigar se há uma associação entre alterações de comportamento devido à ausência da proteína SOCS2 durante o processo de intoxicação por APAP. Para isso, observou-se os animais durante 4 horas após a superdosagem, em uma arena com água e ração *ad libitum*. A quantidade de vezes que os animais atravessam o centro da caixa (*crossing*) foi o parâmetro utilizado. Quanto menos eles cruzam o centro, maior é a alteração comportamental dentro do parâmetro ansiedade (Figura 7A). Os resultados mostraram que, basalmente, os animais se comportam de forma semelhante (Figura 7B, linhas pontilhadas). Porém, após a administração de uma sobredose de APAP, os animais SOCS2^{-/-} se locomovem menos atravessando o centro quando comparados aos animais WT, o que sugere maior alteração relacionada a maior ansiedade nesses animais (Figura 7B).

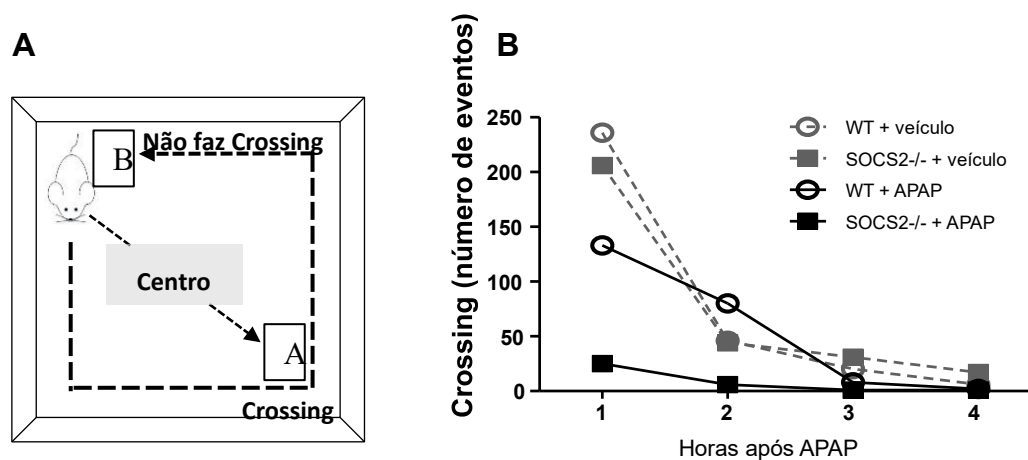


Figura 7 – Avaliação do comportamento dos animais WT e SOCS2^{-/-} após tratamento com APAP (600 mg/Kg). A. Esquema representativo do experimento, no qual foram acomodados quatro animais por gaiola. Os animais foram filmados por 4 horas e o vídeo foi avaliado posteriormente. A quantidade de vezes que eles atravessaram o centro da caixa (caminho “A”) foi contabilizado manualmente. O caminho percorrido pelo animal como em “B” não foi avaliado. B. O gráfico representa os resultados de dois experimentos independentes (n=12 por grupo), no qual os animais foram avaliados durante 4 horas.

4.3 EFEITOS DA SOBREDOSE DE PARACETAMOL NO FÍGADO DE ANIMAIS DEFICIENTES DE SOCS2

De acordo com a literatura, após administração de doses tóxicas de APAP ocorre extensiva necrose no fígado. Para avaliar se a maior letalidade dos animais deficientes para SOCS2 pode ser relacionada a maior geração de necrose hepática, três parâmetros foram utilizados para medir esse tipo de morte celular: análise do nível sérico da transaminase hepática ALT, histologia e microscopia confocal intravital do fígado. A dosagem de ALT revelou um aumento dessa enzima no soro dos animais de ambos os grupos, porém o aumento foi significativamente maior nos animais deficientes para SOCS2 em relação aos WT. Após 2 horas, o grupo SOCS2^{-/-} liberou três vezes mais ALT no soro. Após 6 horas, a diferença entre os grupos se igualou, e tornou-se novamente maior no grupo deficiente para SOCS2 após 12 horas, em que a liberação foi 1,6 vezes maior (Figura 8).

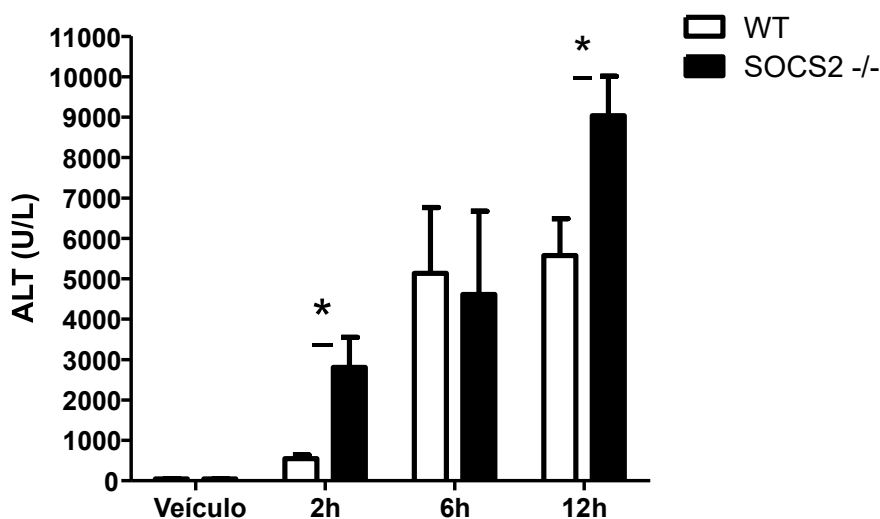
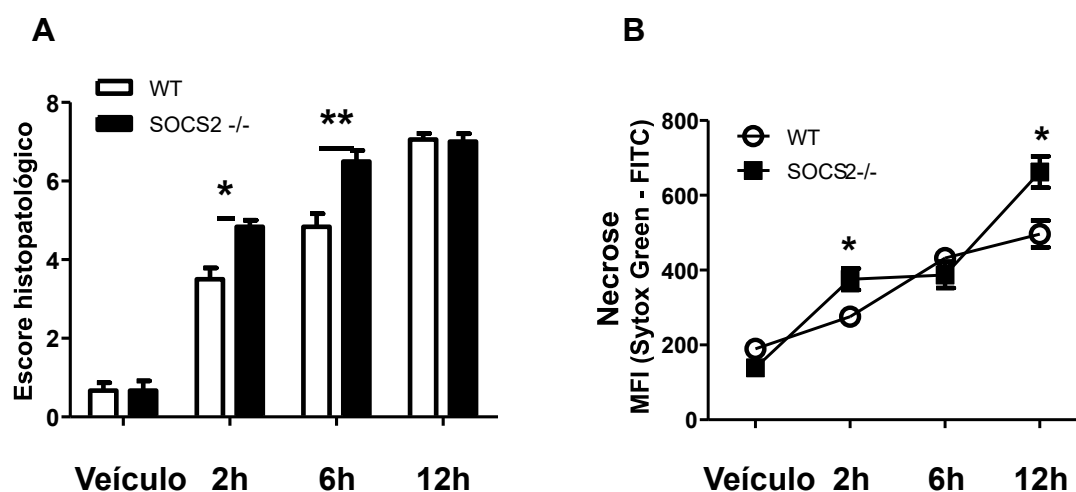


Figura 8 – Deficiência de SOCS2 leva a maior liberação de ALT no soro após tratamento com 600 mg/Kg de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados por via oral com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O soro foi coletado para avaliação da transaminase hepática ALT. O gráfico é representativo de três experimento independentes (n=4 por grupo). Os dados foram expressos como a média ± EPM. *p<0,05 (significância estatística realizada por teste T de *student*).

A histologia do fígado mostra que o tratamento com APAP induz lesões bem características de necrose em torno da área centrolobular. No animal *SOCS^{-/-}*, a área de necrose e o escore histopatológico são maiores quando comparados com o animal WT, tanto 2 horas quanto 6 horas após o tratamento (Figuras 9A e 9C). Utilizando-se a técnica de microscopia confocal intravital, na qual pode-se observar a necrose no fígado do animal ainda vivo, essa diferença é ainda mais evidente. Os animais deficientes para *SOCS2* possuem maior grau de necrose 2 e 12 horas após o tratamento com APAP (Figuras 9B e 9D). Essa quantificação foi realizada pela intensidade de fluorescência do marcador de necrose verde *Sytox Green*. Portanto, está claro que a deficiência de *SOCS2* aumenta a necrose nos hepatócitos durante a sobredose de APAP. Como essa célula é a responsável por metabolizar esse fármaco, é a primeira a sofrer os efeitos da superdosagem que culminam na morte do hepatócito.



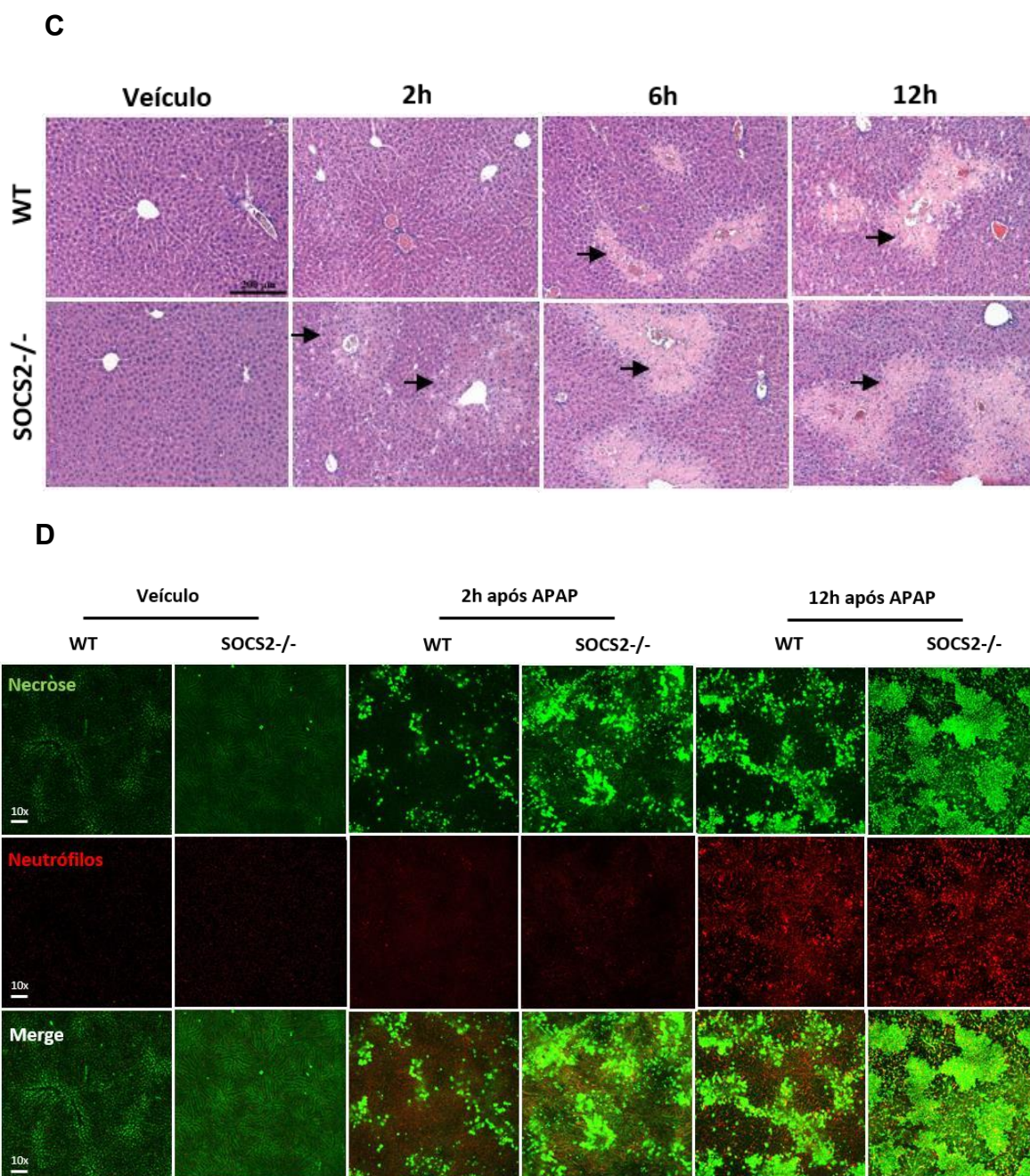


Figura 9 – Maior lesão hepática ocorre na ausência de SOCS2 após 2 e 12 horas da intoxicação com 600mg/Kg de paracetamol. A. Escore histopatológico calculado com base nos seguintes parâmetros avaliados na histologia do fígado: necrose, degeneração, hemorragia e infiltrado inflamatório. Os valores utilizados para avaliação foram: 0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante; 5, severo. B. Quantificação da fluorescência do marcador de necrose Sytox Green (verde); intensidade média de fluorescência (MFI). C. Histologia hepática com coloração H&E (aumento de 20x). As setas indicam as áreas de

necrose cetrolubular. D. Microscopia confocal intravital em que a necrose foi marcada por Sytox Green e neutrófilos por GR1-PE (vermelho) (aumento de 60x). Ambas as técnicas foram realizadas no fígado de animais WT e SOCS2^{-/-} após 2, 6 e 12 horas de tratamento com 600 mg/Kg de APAP. Imagens representativas de três experimentos independentes (n=3 por grupo). Os dados foram expressos como a média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01 (significância estatística realizada por teste T de *student*).

4.4 INFLUÊNCIA DO METABOLISMO HEPÁTICO DO APAP NA FORMAÇÃO DA LESÃO

Visto que os hepatócitos metabolizam o APAP e sofrem necrose, a maior lesão hepática encontrada nos animais deficientes para SOCS2 pode ser devido ao fato desse grupo metabolizar mais o fármaco, gerando assim maiores quantidades do metabólito tóxico NAPQI. Como durante o metabolismo do APAP o NAPQI é detoxificado pela glutathiona reduzida (GSH), avaliou-se a depleção dessa enzima. Encontramos que os dois grupos de animais depletam igualmente a GSH. Como pode ser visto na figura 10A, ambos depletam GSH ao mesmo nível até duas horas após a administração de APAP. Os níveis dessa enzima são restaurados aos valores iniciais no animal WT e no SOCS2^{-/-} com 12 horas.

Uma outra forma de avaliar o metabolismo hepático é por meio da viabilidade dos hepatócitos frente a exposição a uma dose tóxica de paracetamol. Sendo assim, para corroborar o fato de que o metabolismo não influencia a maior necrose encontrada nos animais SOCS2^{-/-}, utilizamos o teste de viabilidade celular com duas doses de APAP: uma utilizada em todas as análises *in vitro* (5mM), e outra muito maior (40mM) para assegurar a diferença encontrada. Não houve diferença na viabilidade dos hepatócitos entre os dois grupos de animais nas duas doses testadas *in vitro* (Figuras 10B e 10C), comprovando que o hepatócito deficiente para SOCS2 metaboliza o APAP da mesma forma que o hepatócito do animal WT. Como não encontramos diferenças no metabolismo nos parâmetros avaliados, a outra hipótese é de que

possa haver alterações no processo inflamatório envolvido na lesão causada por APAP nos animais deficientes para SOCS2.

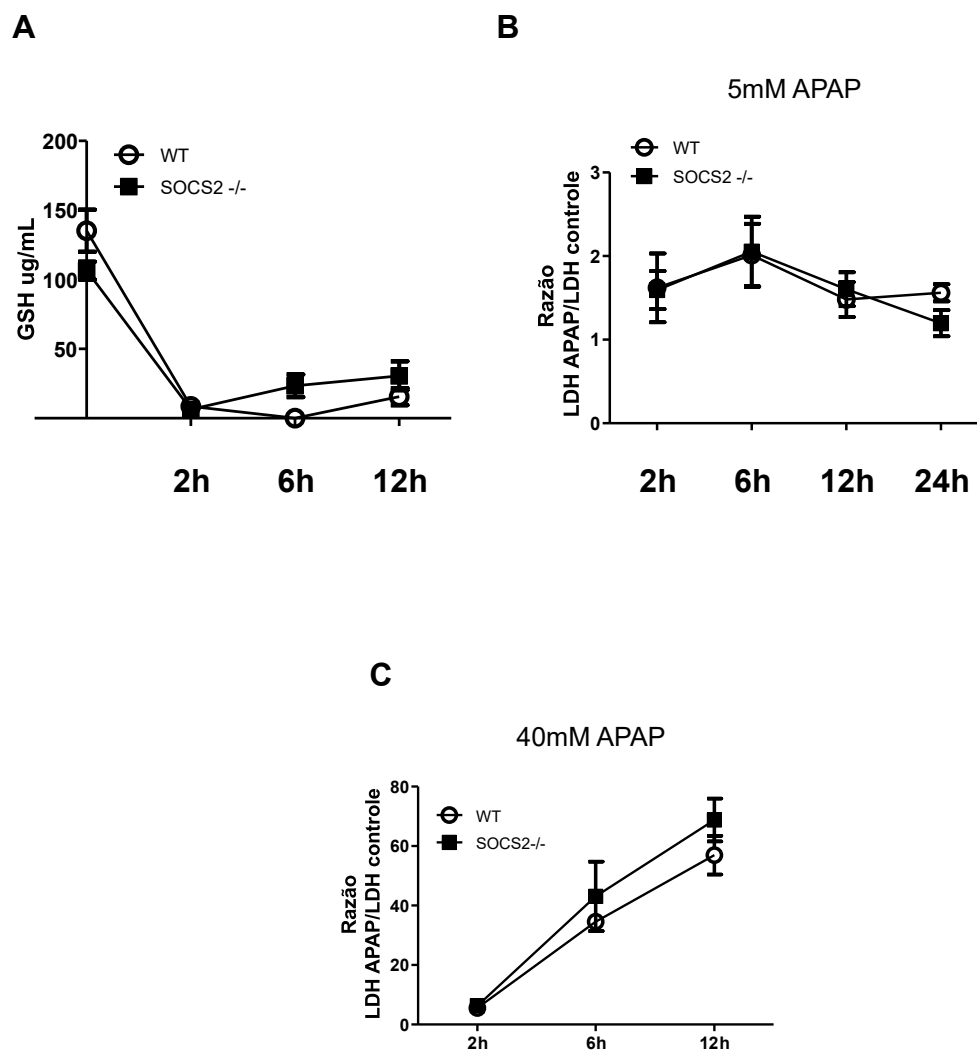
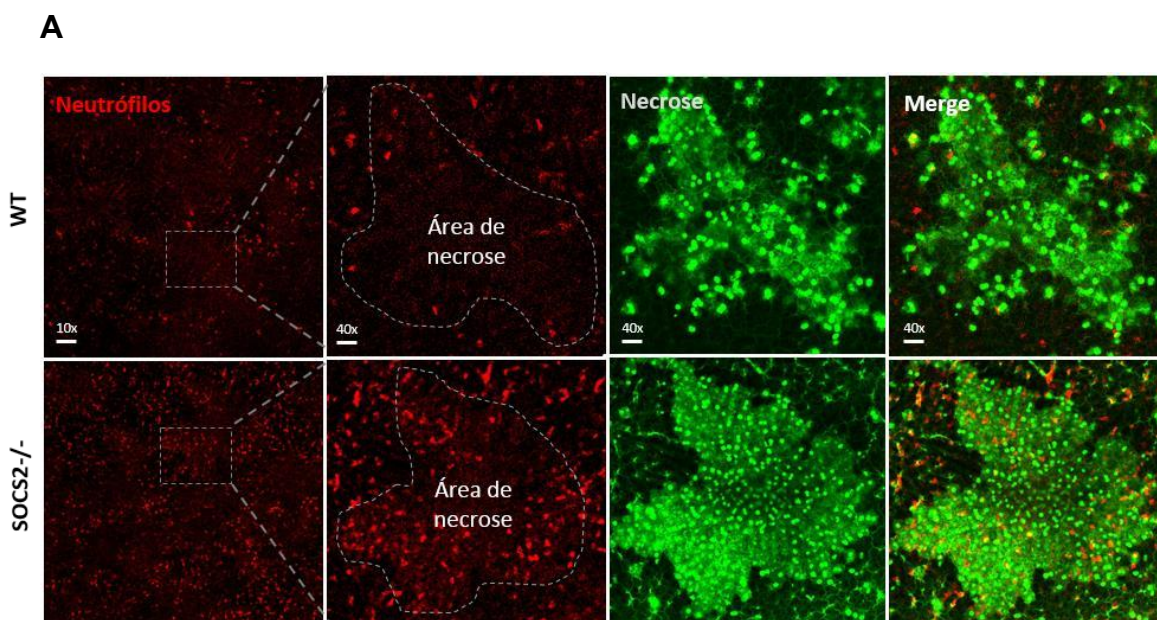


Figura 10. Maior necrose encontrada nos animais deficientes para SOCS2 não está relacionada ao maior metabolismo do APAP. A. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O fígado foi coletado para medida da GSH utilizando reação colorimétrica com DNTB. B e C. Liberação da enzima LDH foi utilizada como medida de morte celular em culturas de hepatócitos primários (2x10⁵ células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-}, tratados com 5mM de APAP (B) e 40mM de APAP (C). A razão é sempre em relação aos hepatócitos tratados apenas com veículo (controle - meio William's + 1% DMSO). Os gráficos são representativos

de 3 experimentos independentes (GSH: n=4 por grupo); os ensaios de viabilidade celular foram realizados em triplicata experimental.

4.5 RECRUTAMENTO CELULAR DURANTE A LESÃO POR APAP

O recrutamento de células como os neutrófilos faz parte do mecanismo inflamatório que podem agravar a lesão. Sendo assim, o maior recrutamento de neutrófilos poderia explicar a maior necrose encontrada nos animais deficientes de SOCS2. Por esse motivo, avaliou-se primeiramente o recrutamento de neutrófilos por meio da marcação fluorescente Gr1-PE na microscopia intravital do fígado. Os resultados mostraram maior recrutamento de neutrófilos 12 horas após o tratamento com APAP nos animais SOCS2^{-/-} quando comparados aos animais WT, e quando observamos a localização dessas células, confirmamos que elas estão justamente dentro da área de necrose (Figura 11A). A análise quantitativa de uma amostra maior confirma que os animais deficientes para SOCS2 recrutam mais neutrófilos que os animais WT (Figura 11B). Além disso, o resultado da medida da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima mais abundante nos neutrófilos, no fígado dos animais confirma o perfil encontrado na quantificação dos neutrófilos (Figura 11C).



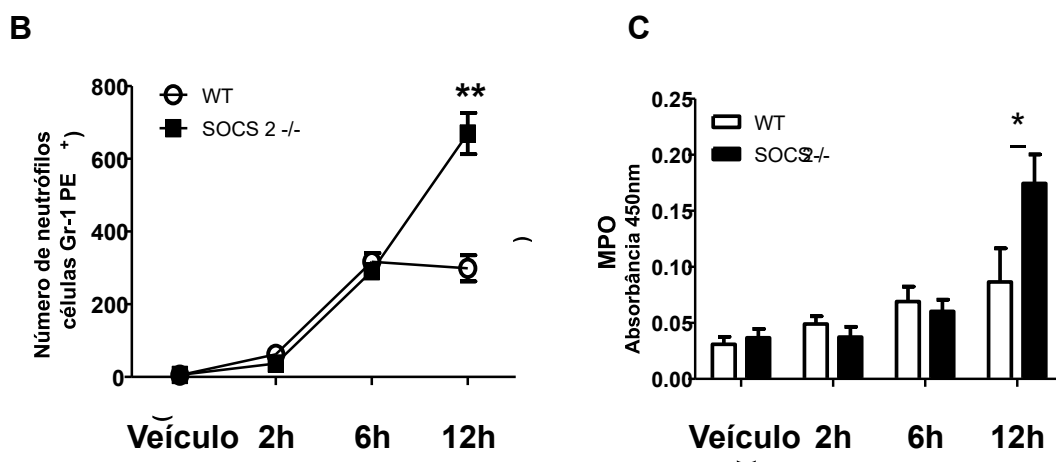
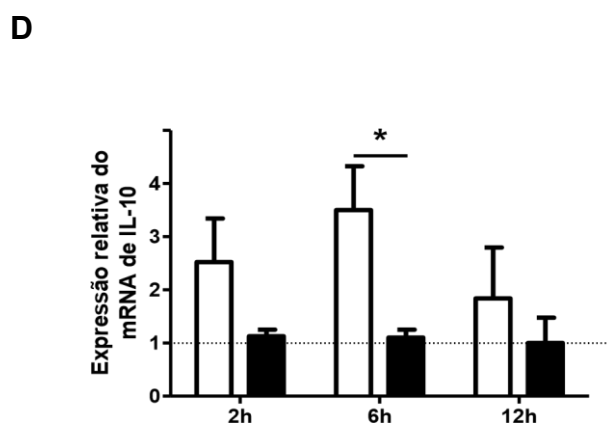
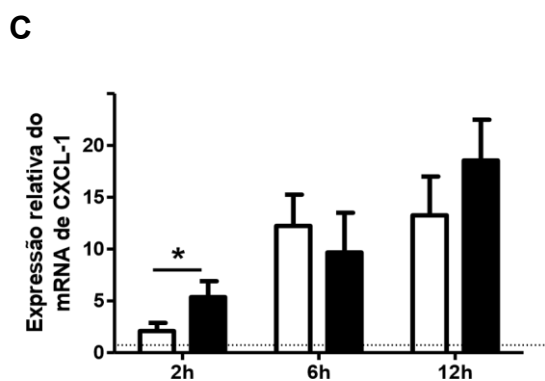
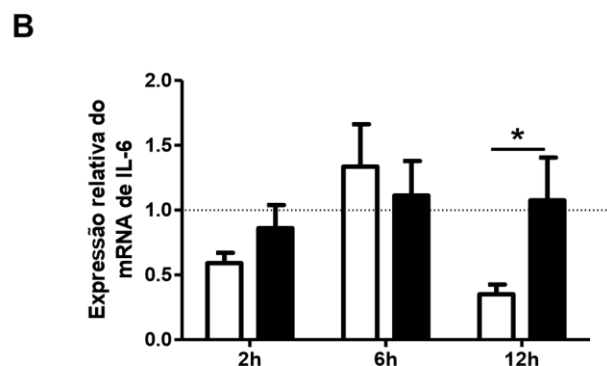
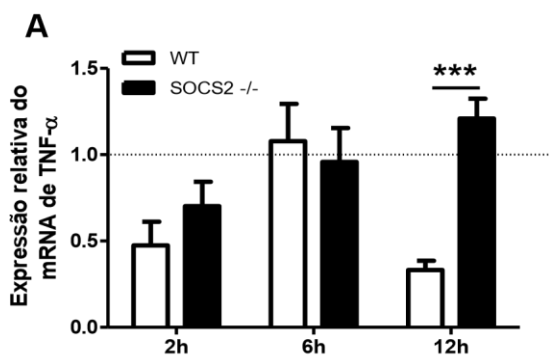


Figura 11 – Há maior infiltrado de neutrófilos na área de necrose nos animais deficientes para SOCS2 após intoxicação com APAP. As análises foram realizadas no fígado de animais WT (n=4) e SOCS2^{-/-} (n=4) após tratamento com 600 mg/Kg de APAP. A. Microscopia confocal intravital mostra os neutrófilos Gr1-PE⁺ (vermelhos) dentro da área hepática de necrose (marcada com Sytox Green – verde) 12 horas após tratamento. As figuras em *merge* representam a sobreposição das imagens de neutrófilos e necrose. Aumento de 40x. B. Quantificação dos das células Gr1-PE⁺ utilizando o programa Velocity 6.3. C. Atividade da enzima mieloperoxidase no fígado dos animais após 2, 6 e 12 horas de tratamento com 600m/Kg de APAP. Os dados representam média ± EPM. *p<0,05; ** p<0,01 (significância estatística realizada por teste T de *student*).

4.6 PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS LIBERADAS NO FÍGADO DURANTE A LESÃO POR APAP

Para estudar o papel dos mecanismos inflamatórios, a expressão de genes relacionados a citocinas e quimiocinas importantes produzidas no fígado durante a lesão causada por APAP foi avaliada nos animais WT e deficientes para SOCS2. As

citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 apresentam-se mais expressas no fígado dos animais deficientes para SOCS2 quando comparados aos animais controles, 12 horas após o tratamento (Figuras 12A e 12B). Perfil semelhante foi encontrado para a quimiocina CXCL-1, porém mais precocemente (2 horas após o tratamento) (Figura 12C). Já para a citocina anti-inflamatória IL-10 e para a citocina pró-regenerativa TGF β o perfil foi o contrário: houve menor expressão no fígado dos animais SOCS2^{-/-}, 6 e 12 horas após o tratamento, respectivamente (Figuras 12D e 12E). Para as citocinas IFN- γ e IL-12 (subunidade IL-12p35), e para a quimiocina CCL-2 não foram encontradas diferenças entre os grupos (dados não mostrados).



2

E

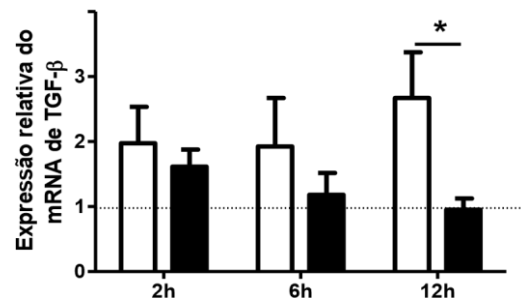


Figura 12 – Deficiência de SOCS2 leva a maior expressão hepática de genes pró-inflamatórios após sobredose de APAP. Os animais WT (n=4 por grupo) e SOCS2^{-/-} (n=4 por grupo) foram tratados com 600mg/Kg de APAP e sacrificados após 2, 6 e 12 horas. O fígado foi coletado para análise de qPCR de genes relacionados a citocinas e quimiocina. Os resultados foram normalizados com o gene endógeno GAPDH, e expressos em relação ao controle tratado com veículo (salina). Os gráficos representam média de três experimentos independentes (n=4 por grupo) ± EPM. * p<0.05; *** p<0.001 (significância estatística realizada por one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey).

4.7 EFEITOS DA AUSÊNCIA DE SOCS2 NA EXPRESSÃO DE MAPK NOS HEPATÓCITOS

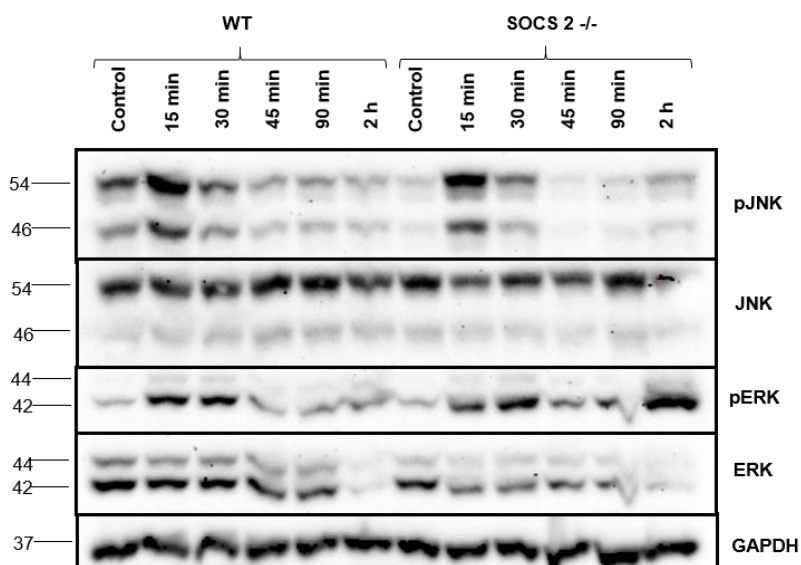
Hepatócitos primários de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* com 5 mM de APAP, durante a cinética de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Por meio de western blot, foi possível avaliar a expressão das proteínas JNK, ERK, p38 e IKB α , bem como de suas formas fosforiladas.

A fosforilação de JNK, antes do estímulo, é menor na ausência de SOCS2. Porém, alcança os mesmos níveis que no hepatócito do animal WT cerca de 15 minutos após o estímulo com APAP e, após 45 minutos, permanece abaixo dos níveis do animal WT (Figuras 13A e 13B). Na via de ERK, os animais deficientes para SOCS2 apresentam maior expressão da proteína p-ERK 30 minutos após o estímulo, e mantém esse aumento ao longo da cinética, quando comparados aos animais WT (Figura 13A e 13C). Ou seja, os animais SOCS2^{-/-} fosforilam a proteína ERK de forma mais eficiente que os animais WT.

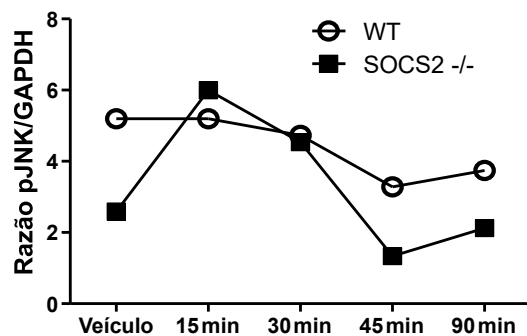
Para p38, a fosforilação é menor na presença de SOCS2 antes do estímulo, e alcança os mesmos níveis que o animal WT após a incubação com APAP (Figura 13D e 13E).

Para avaliar indiretamente a ativação de NF- κ B, foi analisada a fosforilação de seu inibidor IK β . Os resultados mostram que há menor fosforilação de IK β nos animais SOCS2^{-/-} durante todo o período da cinética (Figura 13D e 13F).

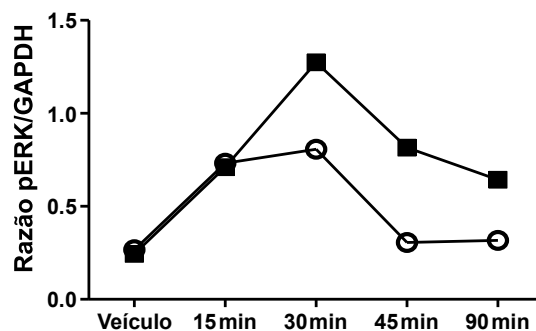
A



B



C



D

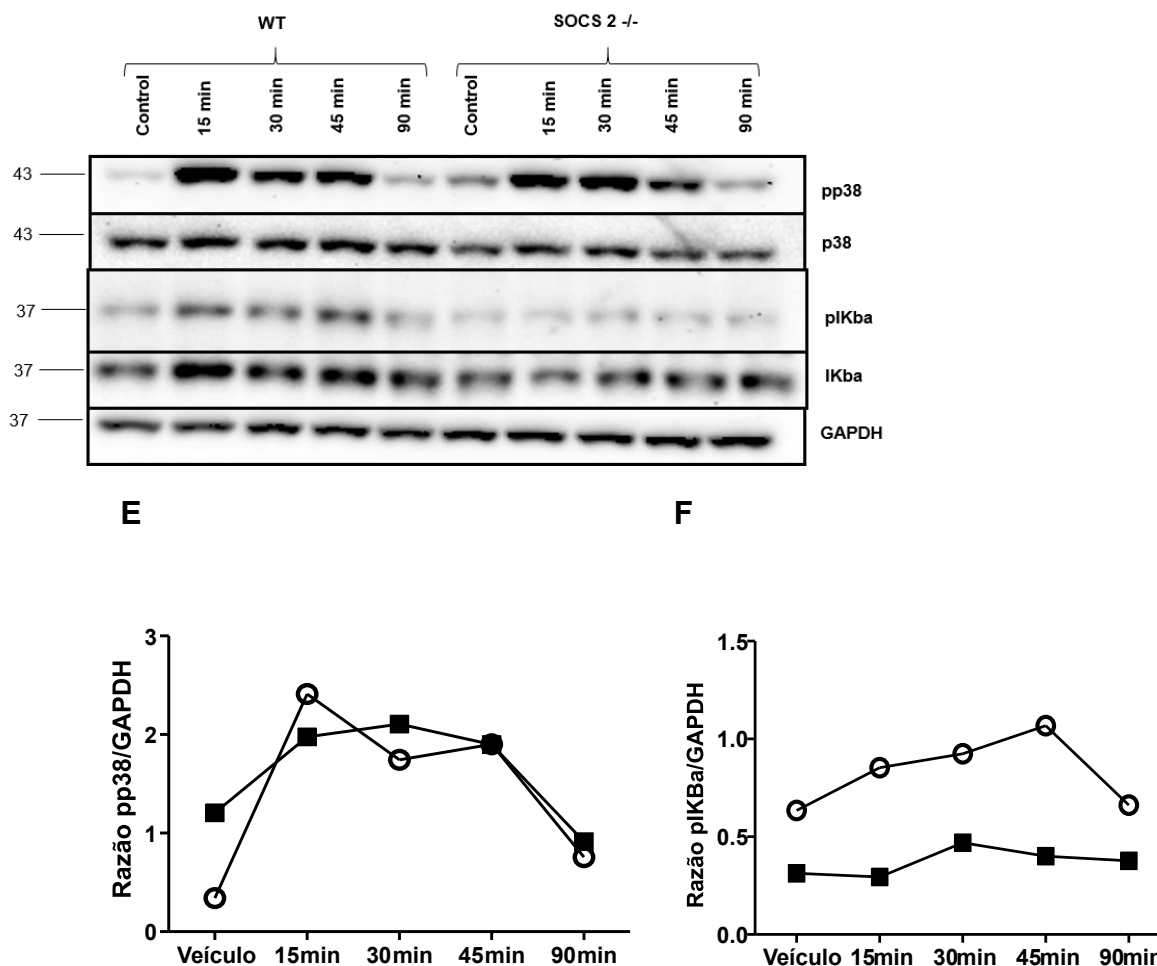
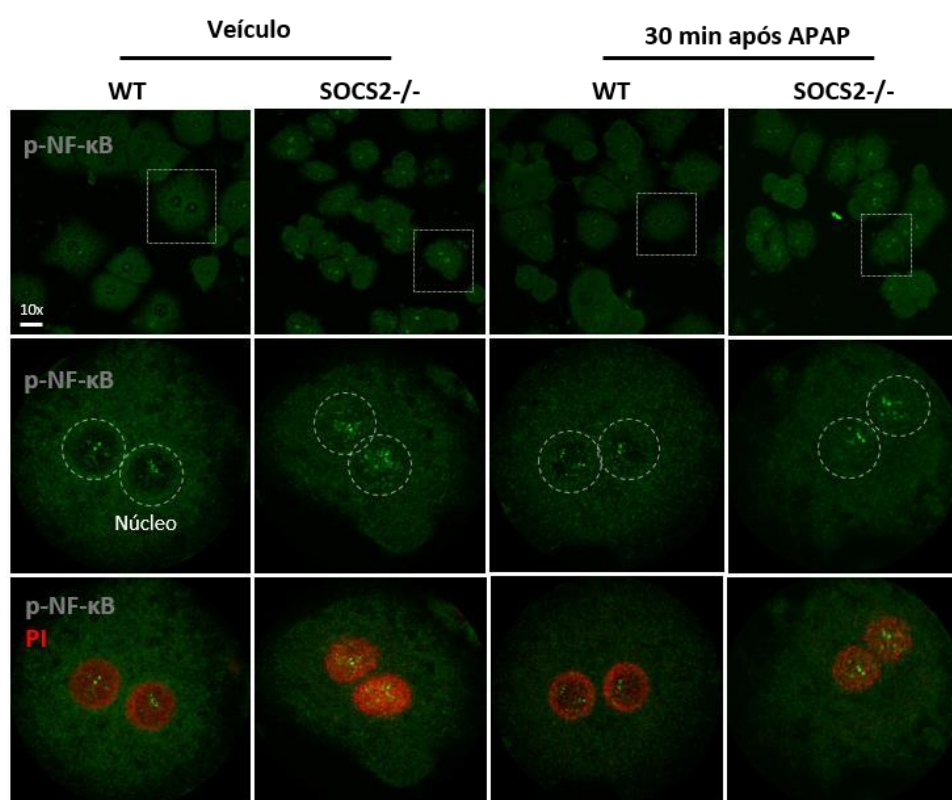


Figura 13 – Ativação *in vitro* da via das MAPK em hepatócitos primários tratados com 5 mM de APAP. Hepatócitos primários (2×10^5 células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* com 5 mM de APAP, durante a cinética de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Após cada tempo, as células foram lisadas e as proteínas coletadas para western blot. A. Western blot das proteínas JNK e pJNK (54 e 46Kda), ERK e pERK (44 e 42 KDa), e o controle endógeno GAPDH (37 KDa). B e C. Densitometrias correspondentes ao western blot da figura A. D. Western blot das proteínas p38 e pp38 (43 Kda), IKBa e p IKBa (37 KDa), e o controle endógeno GAPDH (37 KDa). E e F. Densitometrias correspondentes ao western blot da figura D. As figuras e os gráficos são representativos de três experimentos independentes.

Para confirmar a menor ativação de NF- κ B, realizou-se o ensaio de imunofluorescência, em que hepatócitos primários isolados dos dois grupos de animais foram cultivados com 5mM de APAP, e marcados com anticorpo específico para a subunidade p65, pertencente ao complexo transcricional do NF- κ B. Quando ativada (fosforilada), essa subunidade (p-p65) se transloca para o núcleo do

hepatócito, ativando a transcrição de vários genes. Assim, foi avaliada a translocação de p-p65 por meio da medida de fluorescência presente no núcleo dos hepatócitos tratados com APAP em relação ao controle não tratado. Os resultados mostram que, mesmo antes do contato com APAP, os hepatócitos de SOCS2 já apresentam maior translocação de NF- κ B, e essa maior ativação se mantém até 45 minutos após o estímulo (Figura 14).

A**B**

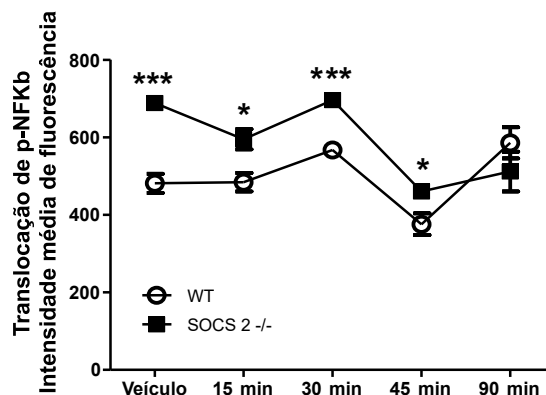


Figura 14. Translocação *in vitro* de NF- κ B é maior em hepatócitos primários deficientes para SOCS2 tanto sem estímulo quanto cultivados com 5mM de APAP. Hepatócitos primários (2×10^5 células/poço) de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* com 5 mM de APAP, durante a cinética de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Após cada tempo, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos para imunofluorescência. A. Imagens representativas dos hepatócitos marcados com FITC (verde) para a proteína NF- κ B p-p65, e com PI (vermelho) para o núcleo. A figura mostra os hepatócitos tratados apenas com o veículo e 30 minutos após a incubação com 5mM de APAP. B. Quantificação da translocação de p-p65 para o núcleo dos hepatócitos nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 90 minutos após a incubação com 5mM de APAP. A intensidade média de fluorescência foi determinada pelo programa Volocity 6.3. Os dados acima são representativos de dois experimentos independentes, feitos em triplicata experimental, e foram expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (significância estatística realizada por teste T de *student*).

4.8 PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS HEPATÓCITOS CULTIVADOS COM APAP

Para avaliar se a diferença entre a produção de citocinas e quimiocina encontrada no fígado de animais SOCS2^{-/-} é devido a diferença na produção desses mediadores pelos hepatócitos, foram realizadas dosagens dessas proteínas produzidas no sobrenadante de cultura de hepatócitos primários dos animais WT e SOCS2^{-/-} com 5mM de APAP. Os resultados demonstram que em ambos os grupos há diminuição na produção de TNF- α , IL-6 e CXCL-1 conforme a cinética evolui, mostrando que os hepatócitos não são os principais produtores desses mediadores durante a inflamação por APAP. Além disso, a diminuição na produção é igual para os dois grupos de animais (Figura 15), o que sugere que os hepatócitos de SOCS2^{-/-} não são as células responsáveis pela diferente produção encontrada *in vivo* das citocinas TNF α e IL-6, e da quimiocina CXCL-1.

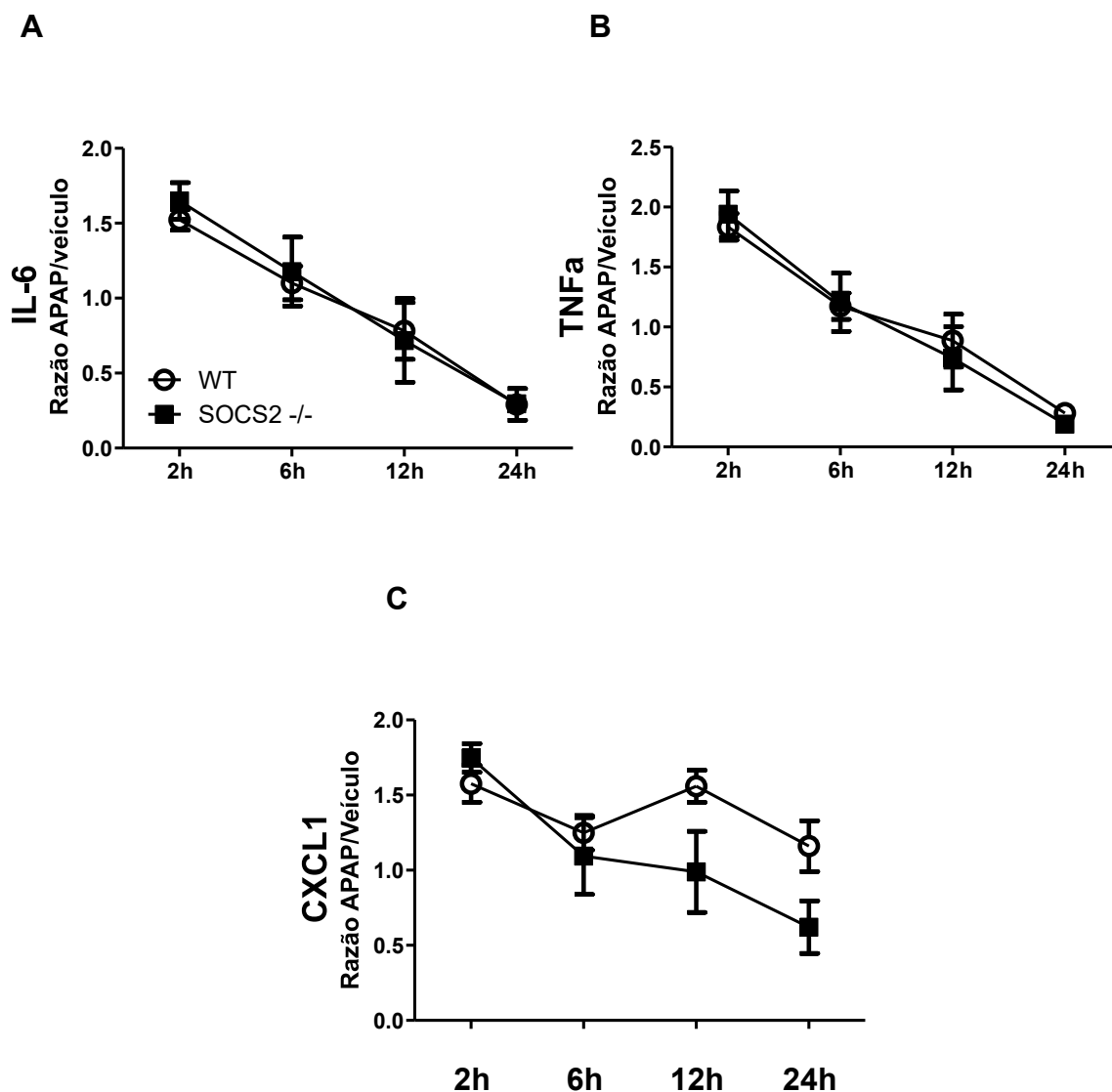


Figura 15. Hepatócitos não são os principais produtores das citocinas TNF- α , IL-6 e da quimiocina CXCL-1 na overdose por paracetamol. Hepatócitos primários de animais WT e SOCS2^{-/-} foram isolados e cultivados in vitro (2×10^5 células/poço) com 5 mM de APAP, durante a cinética de 2, 6, 12 e 24 horas. Após cada tempo, o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas por ELISA. Os resultados demonstrados nos gráficos são uma razão dos valores das proteínas em pg/mL produzidas pelas células tratadas com APAP em relação as células tratadas com veículo de cada tempo analisado. Os gráficos representam a média \pm EPM dos valores encontrados em dois experimentos independentes, realizados em triplicata experimental. A significância estatística foi realizada por teste T de *student*.

4.9 SENSIBILIDADE DOS HEPATÓCITOS FRENTE ÀS CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS

Já que os hepatócitos de *SOCS2*^{-/-} não produzem mais mediadores pró-inflamatórios quando comparados aos hepatócitos isolados de animais WT, a próxima etapa foi avaliar a sensibilidade dessas células frente a exposição a esses mediadores, presentes no ambiente inflamatório. Para isso, incubou-se hepatócitos primários de animais WT e deficientes para *SOCS2* com as citocinas TNF- α e IL-6, isoladas e em combinação. Os dados de liberação de LDH no sobrenadante mostram que os hepatócitos de *SOCS2*^{-/-} morreram mais na presença de IL-6 e de IL-6 combinado a TNF- α , 24 horas após a exposição (Figura 16), o que sugere que a ausência de *SOCS2* leva a maior indução de morte por essas citocinas. TNF- α isolado mostrou indução semelhante de morte nas células dos dois grupos de animais avaliados.

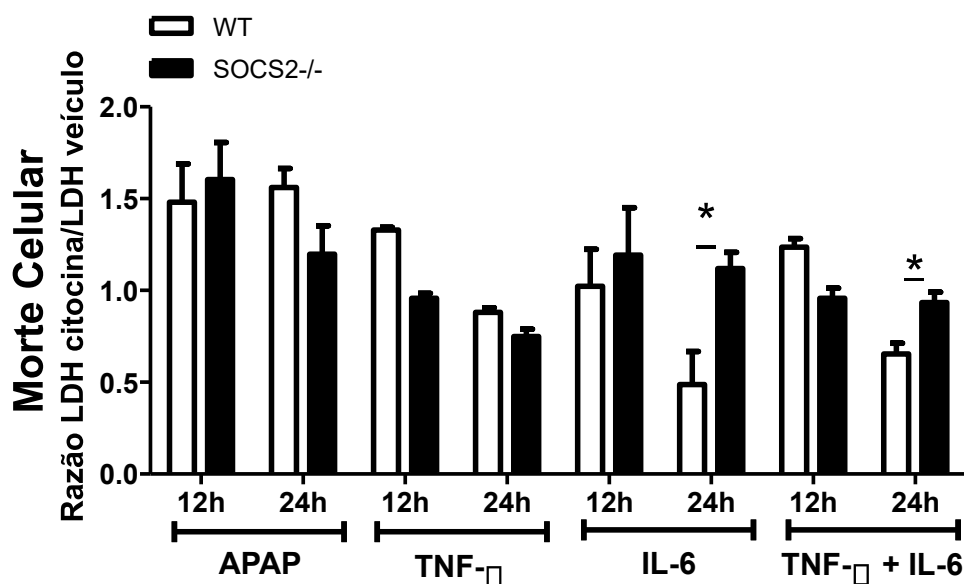


Figura 16. Deficiência de *SOCS2* leva a maior sensibilidade celular dos hepatócitos primários à citocina IL-6 isolada e em combinação com TNF- α . Hepatócitos primários de animais WT e *SOCS2*^{-/-} foram isolados e cultivados *in vitro* (2×10^5 células/poço) com APAP (5 mM), TNF- α (100ng/mL) e IL6 (100ng/mL) durante 12 e 24 horas. Após cada tempo, o sobrenadante foi coletado para a dosagem da enzima LDH. A morte celular foi representada como uma razão da liberação de LDH pelos hepatócitos na presença de citocinas/APAP em relação a liberação de LDH pelas células tratadas com veículo. O gráfico é representativo de

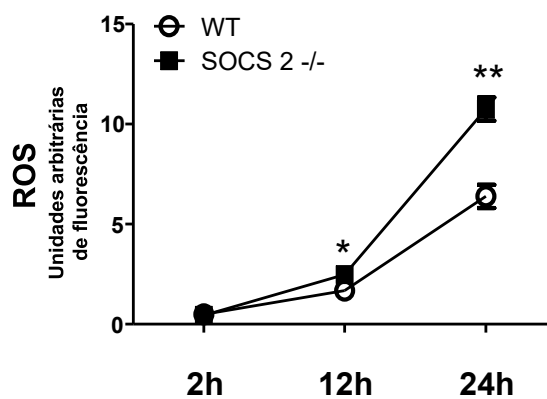
dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados estão representados como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).

4.10 PERFIL *in vitro* DE GERAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Tendo em vista a importante geração de moléculas ligadas ao estresse oxidativo na lesão por APAP, e que o início e a expansão do processo ocorrem no hepatócito - célula onde ocorre o metabolismo do fármaco -, avaliou-se *in vitro* a produção de ROS, NO e peroxinitrito nos hepatócitos primários de animais WT e SOCS2^{-/-} cultivados com 5mM de APAP. Observou-se que a produção dessas três moléculas aumenta, principalmente de peroxinitrito e ROS após 12h de incubação com APAP (Figura 17).

Porém, nota-se claramente que nos hepatócitos deficientes para SOCS2 o aumento na produção de ROS é maior que nos hepatócitos de animais WT, 12 e 24 horas após cultura com APAP (Figura 17A). Para peroxinitrito e NO, não houve diferença significativa entre os dois grupos de animais (Figuras 17B e 17C).

A



B

C

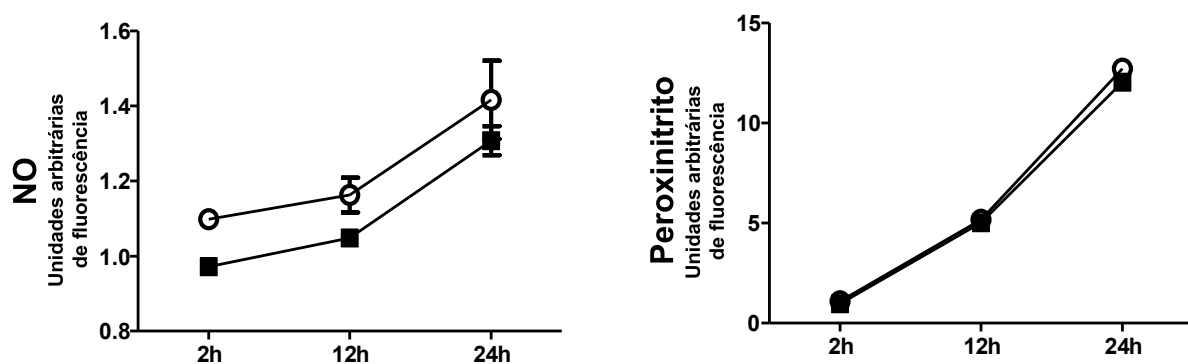


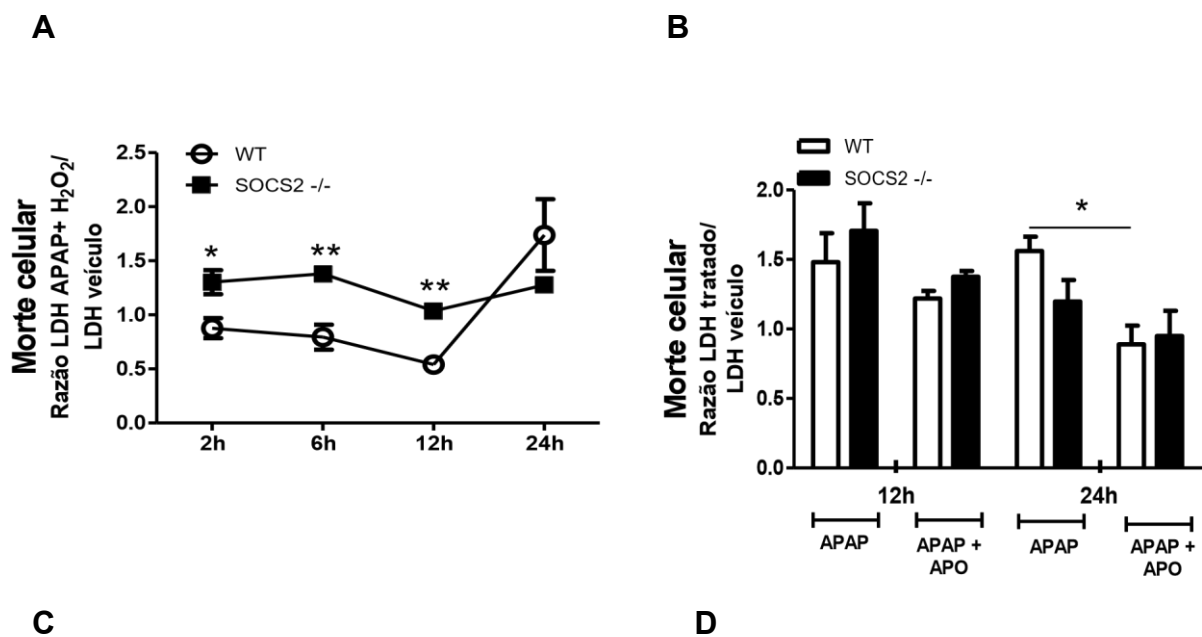
Figura 17. Produção de ROS está acentuada em hepatócitos que não expressam SOCS2 após incubação com 5mM de APAP. Os experimentos foram realizados por meio da cultura de hepatócitos primários isolados de animais WT e SOCS2^{-/-}, que foram então incubados (2×10^5 células/poço) com 5mM de APAP. As sondas para ROS (H2DCF-DA, 25 μ M), NO (DAF-2DA, 10 μ M) e peroxinitrito (DHR123, 25 μ M) foram adicionadas em tempos específicos antes da leitura de fluorescência. Os resultados foram normalizados em relação ao controle tratado com veículo em cada tempo. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes com triplicata experimental, e mostram a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).

4.11 SENSIBILIDADE DOS HEPATÓCITOS À PRODUÇÃO DE ROS E EFEITOS DO TRATAMENTO PARA SUA DEGRADAÇÃO

A própria célula produtora de ROS sofre os efeitos gerados por esta, na qual há danos à estrutura celular podendo levar a morte. Sendo assim, foi avaliado se os hepatócitos dos animais deficientes para SOCS2, além de produzirem mais ROS, são também mais sensíveis a essa molécula. Os dados de morte celular (medidos pela liberação de LDH no sobrenadante de cultura) mostram que hepatócitos primários que não expressam SOCS2 são mais vulneráveis a morte em contato com APAP e peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio formada a partir do superóxido, quando comparados aos hepatócitos dos animais WT (Figura 18A).

Uma vez formado, o peróxido de hidrogênio é degradado por enzimas antioxidantes presentes na célula, como a catalase e a apocinina. Com essa informação, o questionamento seguinte foi se, *in vitro*, a adição dessas enzimas à cultura de hepatócitos primários com APAP diminuiria a morte celular de forma semelhante nos

dois grupos de animais. Para apocinina, os resultados mostraram que houve redução na morte celular apenas nos hepatócitos dos animais selvagens, 24 horas após a adição de APAP (Figura 18B). Já a catalase reduziu a morte celular de forma mais acentuada nos hepatócitos de animais deficientes para SOCS2, 12 horas após a incubação com APAP (Figura 18C). As duas enzimas juntas não mostraram sinergismo na ação, mantendo apenas a ação da apocinina (Figura 18D).



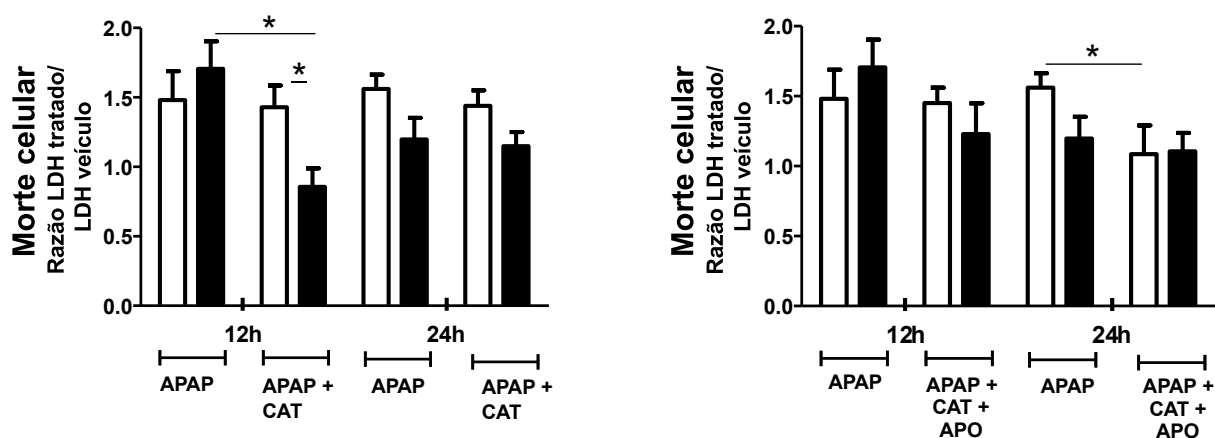
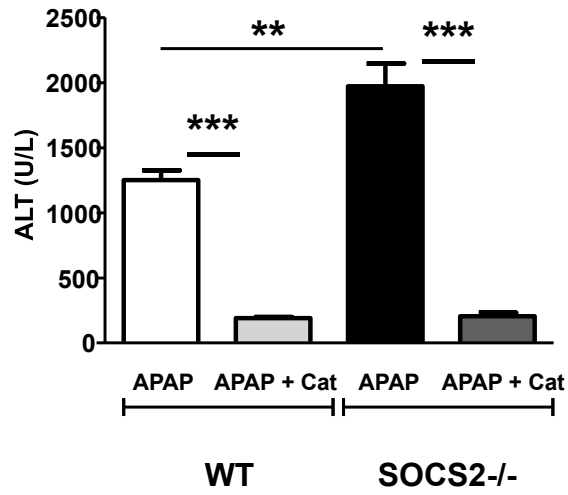


Figura 18. Efeitos da produção de ROS na morte dos hepatócitos tratados com APAP e ação das enzimas antioxidantes apocinina e catalase. A. Morte celular dos hepatócitos primários (2×10^5 células/poço) isolados de animais WT e *SOCS^{-/-}*, que foram cultivados com 5mM de APAP e 250 mM de H_2O_2 . A viabilidade foi avaliada pela liberação da enzima LDH no sobrenadante das culturas, e o resultado normalizado em relação ao controle (tratado com veículo). B. Efeitos do tratamento com 250 µM de apocinina (APO) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. D. Efeitos do tratamento com 60U/mL de catalase (CAT) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. C. Efeitos do tratamento com 250 µM de apocinina e 60U/mL de catalase (CAT + APO) na redução da morte celular dos hepatócitos tratados com 5mM de APAP, 12 e 24 horas. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes, realizados com triplicata experimental. Os dados representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).

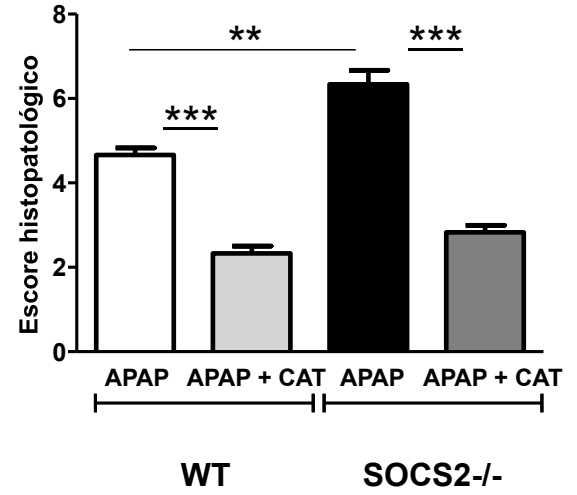
4.12 EFEITOS DO TRATAMENTO *in vivo* COM CATALASE

Como a catalase demonstrou ter importante papel *in vitro* na redução da morte celular gerada em consequência da ação do APAP, avaliou-se *in vivo* se a administração dessa enzima provoca alterações na lesão hepática gerada 2 horas após a superdosagem por APAP. Os dados de dosagem sérica de ALT mostram que há uma maior liberação dessa enzima 2 horas após a administração de APAP nos animais *SOCS2^{-/-}*, conforme já havia sido descrito na figura 4. Após a terapia com catalase, houve redução na liberação de ALT nos dois grupos de animais, sendo que nos animais que não expressam *SOCS2* essa diminuição alcançou os mesmos níveis do animal WT (Figura 19A). A histologia realizada no fígado desses animais corrobora o resultado, com importante redução no escore histopatológico em ambos os grupos (Figura 19B) e diminuição da necrose em torno da área centrolobular (Figura 19C).

A



B



C

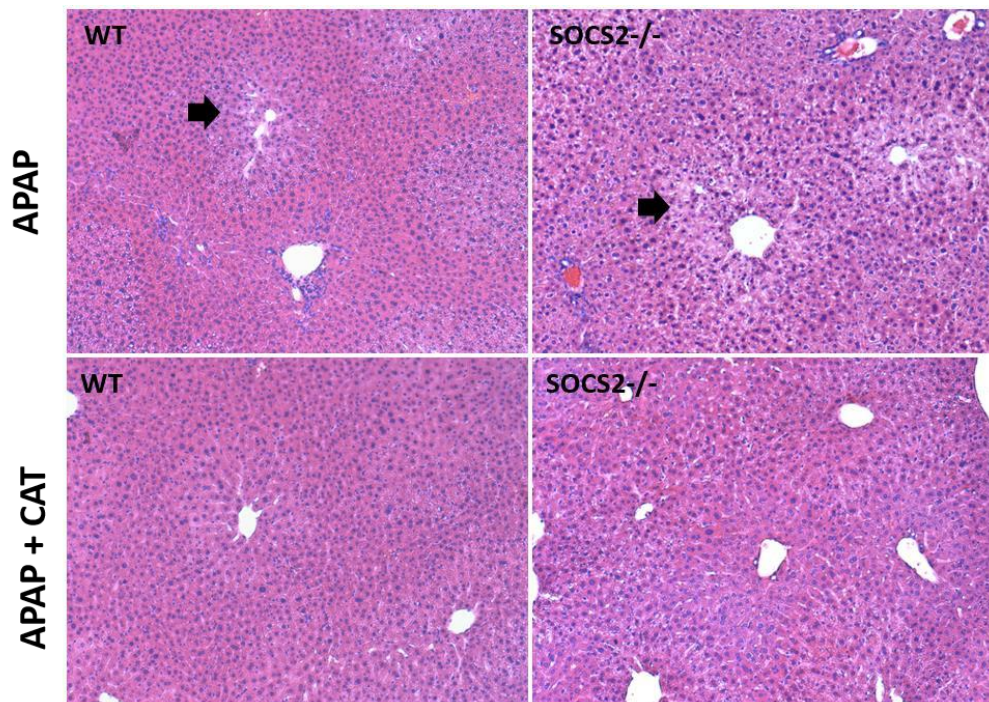


Figura 19. Tratamento com catalase reduz a lesão hepática nos animais SOCS2^{-/-} em magnitude maior que no animal WT, alcançando o mesmo nível desses animais. Os animais WT (n=4) e SOCS2^{-/-} (n=4) foram tratados com 5000U/Kg i.p. de catalase (CAT) 12 horas antes do tratamento com APAP. No momento da administração de 600mg/Kg de APAP, os animais receberam a mesma dose de catalase dada anteriormente. Após duas horas, os animais foram sacrificados e o soro e fígado coletados para análise. A. Medida da liberação de ALT no soro dos animais WT e SOCS2^{-/-} após tratamentos com APAP e APAP com tratamentos com catalase. B. Escore histopatológico do fígado desses animais avaliou: necrose, degeneração, hemorragia e infiltrado inflamatório. Os valores utilizados para avaliação foram: 0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante; 5, severo. C. Imagens representativas da histologia hepática. As setas indicam as áreas de necrose centrolobular. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes, realizados com n=4 por grupo. Os dados representam a média \pm EPM. **p<0,01; ***p<0,001 (significância estatística foi realizada por teste T de *student*).

5 DISCUSSÃO

Desde a década de 80, o paracetamol tem sido o principal fármaco de escolha para o tratamento de dor e febre, sendo consumido regularmente por 79% da população dos EUA. Por estar presente em várias formulações, isolado ou em combinação com outros fármacos, há uma preocupação cada vez maior com a excessiva automedicação, que favorece o aparecimento de casos de intoxicação. Além disso, há fatores que predis põem casos de intoxicação mesmo quando o fármaco é administrado em doses terapêuticas, como o uso de álcool e subnutrição. Ainda, alguns indivíduos com susceptibilidade aumentada podem desenvolver hepatotoxicidade mesmo em baixas doses, como descrito por Larson em 2007. Os riscos para ter essas reações idiossincráticas envolvem determinantes genéticos e podem ser fármaco-específicas (URBAN *et al.*, 2012), além de ter crítico envolvimento de mecanismos imunes (UETRECHT *et al.*, 2013).

Assim, é importante saber como moléculas chave no nosso organismo podem influenciar na resposta a intoxicação por APAP. SOCS2 foi o alvo estudado nesse trabalho, devido à grande importância na regulação em processos inflamatórios que envolvem infecções (ESPER *et al.*, 2012; BRANT *et al.*, 2016; APARECIDA SILVA BARBOSA *et al.*, 2016; DA CUNHA SOUSA *et al.*, 2016), e em processo estéreis que ocorrem no fígado, como na inflamação gerada por dieta rica em gordura (ZADJALI *et al.*, 2012) e após hepatectomia parcial (MASUZAKI *et al.*, 2015).

Atualmente, a lesão hepática induzida por APAP tem sido o modelo mais popular e clinicamente relevante para testar fármacos fitoterápicos e outras intervenções protetoras para o fígado. O modelo *in vivo* de inflamação hepática estéril por APAP envolveu a administração por via oral de 600mg/Kg desse fármaco em animais WT e SOCS2^{-/-}. A dose utilizada é 7,5 vezes maior que a dose máxima recomendada pelo FDA para um adulto de 50Kg (80mg/Kg). Segundo o estudo

realizado por Budnitz (2011), 39% das internações por intoxicação ao paracetamol são de ingestões de até 10 comprimidos (aproximadamente 5000mg). Ainda, 13,7% das internações ocorrem por ingestão de mais de 50 comprimidos (considerando que o comprimido possui 500mg, seriam 25g, o que corresponderia a 500mg/Kg em um adulto de 50Kg). Portanto, a dose de 600mg/Kg utilizada no nosso estudo é factível de causar intoxicação, e corresponde a eventos que ocorrem em humanos.

Nosso primeiro passo foi investigar como a intoxicação por APAP modula a expressão de SOCS2 no fígado de animais C57/BL6. Os resultados mostraram que, após 2 horas de intoxicação, a expressão de SOCS2 diminui e se mantém inferior ao basal até 12 horas após. Logo, o aumento da inflamação estéril estimula a diminuição da expressão de SOCS2. Esse resultado é o oposto ao descrito por Reylli (2001), que encontrou maior expressão de RNA mensageiro de SOCS2 no fígado de animais 6 horas após administração de APAP. A discordância com os nossos resultados pode ser justificada pelo fato de que os membros da família SOCS possuem marcante regulação pós-transcricional, como a inter-regulação que ocorre entre eles. Esse fato, aliás, é mais um fator que colabora para explicar a menor expressão de SOCS2. Essa proteína atua como regulador negativo de outros membros da família, como SOCS1 e 3, e, portanto, é mais expresso em fases tardias. SOCS3 já é descrito como importante indutor de maior lesão hepática causada por APAP, principalmente por aumentar a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (NUMATA *et al.*, 2007).

Com esses dados, tornou-se importante avaliar então se realmente a expressão de SOCS2 funciona como um mecanismo protetor para o fígado durante a lesão por APAP. A letalidade ao APAP foi avaliada nos animais intoxicados com esse fármaco, durante 48 horas. Os resultados mostraram que 83% dos animais deficientes para SOCS2 morreram nas 48 horas analisadas após a administração do APAP, contra 41,6% dos animais controles. Isso demonstra então que a presença de SOCS2 colabora para a sobrevivência dos animais nesse modelo.

Um importante resultado do experimento de letalidade foi a quantidade de animais que morrem nas primeiras 24 horas. Cerca de 33% dos animais controles morreram, enquanto esse número chega a 50% dos animais isentos de SOCS2. Esse fato foi relevante para justificar o tempo da cinética escolhido para o nosso trabalho, que foi de no máximo 12 horas após a administração do fármaco. Dessa forma, a amostra de animais seria mais homogênea antes do tempo que determinasse porque alguns animais sobrevivem e outros não.

Mediante essa escolha e a maior letalidade encontrada nos animais SOCS2^{-/-}, foi necessário avaliar a extensão e o grau de necrose que acometeram o fígado desses animais. Como a necrose libera enzimas hepáticas na circulação sanguínea, a medida de uma transaminase geralmente associada a dano hepático, a ALT, foi realizada. Os resultados mostraram que há aumento da concentração de ALT no soro de ambos os animais, indicando progressão da lesão hepática até 12 horas após a intoxicação. O aumento foi maior nos animais deficientes para SOCS2 2 horas após a administração. Com 6h, essa diferença se iguala, e torna-se novamente maior nesses animais 12 horas após a intoxicação. Percebe-se então que, nos animais SOCS2^{-/-}, parece haver um mecanismo inicial diferencial que gera uma necrose mais grave, e um outro que ocorre mais tardiamente, fazendo esses animais ficarem mais inflamados e gerar consequentemente maior letalidade, como nossos resultados demonstraram.

Os resultados de marcação de necrose na microscopia confocal intravital também mostram maior necrose nos animais deficientes para SOCS2, com marcação específica realizada por um corante de DNA extracelular (Sytox Green), corroborando os resultados de ALT. Já a histologia mostrou um perfil um pouco diferente: maior necrose nos animais SOCS2^{-/-} 2 e 6 horas após o APAP. A histologia é uma técnica que avalia não só necrose, mas também degeneração, infiltrado celular e hemorragia, e, além disso, é semiquantitativa. Esses fatores podem então justificar as diferenças encontradas dentro do tempo da cinética. Apesar disso, a histologia confirmou que o tipo de lesão gerada pelo APAP é a mesma nos dois grupos de animais: necrose em torno da área centrolobular, nos

hepatócitos pericentrais. O trabalho publicado por Zellmer (2009) mostra que SOCS2 possui expressão heterogênea nos hepatócitos, sendo mais expresso nos hepatócitos das áreas pericentrais. Portanto, a falta dessa proteína na região em que ocorre a morte celular parece ser determinante para influenciar o grau e a extensão da necrose.

Os mecanismos de morte celular gerados pela intoxicação ao APAP iniciam-se com a formação, durante o metabolismo do fármaco, do metabólito NAPQI. Esse é gerado pela ação das enzimas do complexo CYP450, principalmente CYP2E1 e CYP1A2, tanto em animais quanto em humanos (ZAHER *et al.*, 1998; RAUCY *et al.*, 1989). Sendo assim, uma hipótese para a maior necrose que ocorre no fígado de animais SOCS2^{-/-} seria a maior metabolização do APAP nesses animais, e como consequência aumentaria a cascata de necrose pela maior produção de NAPQI. Como o NAPQI é detoxificado pela glutathiona, a depleção dessa enzima foi utilizada como medida da metabolização de APAP. Os resultados mostraram que ambos os animais depletam GSH ao mesmo nível, que chega a quase nulo após 2 horas. Além disso, os ensaios *in vitro* de cultura de hepatócitos mostram que, com a dose de 5mM, as células dos dois grupos de animais morreram igual. Como a morte foi muito baixa em relação ao controle de células (1,5 a 2 vezes), nós avaliamos uma dose maior de APAP. Com 40mM de APAP, as células chegaram a morrer 60 vezes mais que as células do controle, tanto nos animais WT quanto nos SOCS2^{-/-}. Assim, parece não haver maior metabolismo do APAP em hepatócitos que não expressam SOCS2.

Outra possível causa para maior necrose encontrada no fígado dos animais SOCS2^{-/-} seria a amplificação desse processo devido a maior ativação do sistema imune. A necrose leva a liberação de moléculas intracelulares que podem ativar a resposta imune com recrutamento celular e produção de mediadores inflamatórios. A microscopia confocal intravital mostra, pela marcação de neutrófilos GR1-PE+, o recrutamento dessas células para o fígado de ambos os animais. O papel dos neutrófilos na inflamação por APAP já foi muito bem demonstrado primeiramente por Marques (2012), em que os neutrófilos são

recrutados para a área de inflamação em resposta a quimiocinas e produtos mitocondriais, amplificando a lesão hepática. Em 2014, Marques demonstrou que esses neutrófilos expressam TLR9 e, conseqüentemente, reconhecem DNA extracelular. Nossos resultados mostraram que há um aumento considerável de neutrófilos nos dois grupos analisados, porém nos animais SOCS2^{-/-} houve um maior recrutamento de neutrófilos 12 horas após a administração de APAP. Ainda, esses neutrófilos estão presentes dentro da área de necrose, rica em DNA, corroborando o comportamento encontrado por Marques em 2015b, em que os neutrófilos “rondam” a área de necrose (*patrolling behaviour*): uma vez encontrada a necrose, os neutrófilos permanecem nessas áreas com abundante DNA extracelular. Além desse fator, nossos resultados demonstraram haver maior expressão de quimiocina CXCL-1 nos animais SOCS2^{-/-}. Marques (2012) demonstrou a importância de quimiocinas ligantes de receptor CXCR-2 no recrutamento de neutrófilos nesse modelo. Logo, a maior necrose encontrada nos animais SOCS2^{-/-} e a maior expressão de CXCL-1 justificam o maior recrutamento de neutrófilos para essa área.

Além de CXCL-1, há maior expressão gênica de IL-6 e TNF- α nos animais SOCS2^{-/-} quando comparados aos animais WT. Ainda, nossos resultados mostraram que no modelo de intoxicação por APAP os hepatócitos parecem não ser os principais produtores dessas citocinas. Como descrito por Heymann & Tacke (2016), além dos hepatócitos, outras células como as células de Kupffer, células endoteliais dos sinusóides e as células de Ito (células estreladas) são importantes produtores de TNF α e IL-6.

Como os animais utilizados nesse estudo são isentos de SOCS2 em todos os tipos celulares, podemos gerar a hipótese de que a falta dessa proteína em outros tipos celulares pode ser responsável pela diferente expressão no fígado. No modelo de lesão hepática por APAP, as células de Kupffer iniciam a lesão secretando os fatores pró-inflamatórios e CCL2, podendo ser a fonte diferencial de produção apenas de TNF- α nos animais SOCS2^{-/-}. Logo, SOCS2 pode então ser importante para regular a produção de TNF- α nessas células, já que não

encontramos expressão diferenciada de CCL2. Outra citocina produzida por células de Kupffer é IL-10. Os animais SOCS2^{-/-} possuem menor expressão desta, que possui papel antiinflamatório na remoção de material de morte celular. Ainda, a citocina TGF- β possui papel pró-regenerativo importante, e também se mostrou menos expressa no fígado nos animais SOCS2^{-/-}.

A citocina IL-6 possui papel pró-inflamatório e está mais expressa no fígado de animais deficientes para SOCS2. Seus níveis elevados no fígado estão associados a doenças agudas e crônicas (STREETZ *et al.*, 2003). IL-6 se liga diretamente ao receptor na membrana dos hepatócitos, ativando a expressão de proteínas pelas vias JAK-STAT3, ERK/MAPK e NF κ B (TACKE *et al.*, 2009). Igualmente, o hormônio de crescimento também regula STAT3, ERK 1/2 e Akt (participa da vida de ativação de NF- κ B) (ZERRAD-SAADI *et al.*, 2011). Logo, como o hormônio do crescimento e IL-6 estão mais expressos na ausência de SOCS2, esses dois fatores podem estar contribuindo para a maior ativação de ERK e de NF- κ B encontradas nesse grupo de animais. Como consequência, há alteração em processos de proliferação celular, sobrevivência e de comportamento. De fato, nossos resultados de alteração de comportamento demonstraram que a deficiência de SOCS2 durante o tratamento com APAP resulta em maior facilidade para desenvolvimento de alterações comportamentais tipo “*sickness behaviour*” (alteração de comportamento gerada por doenças inflamatórias). Já está bem descrito na literatura que citocinas próinflamatórias como TNF- α e IL-6 podem mediar essas mudanças. Ainda, IL-6 isolada ou em combinação com TNF- α é capaz de induzir a morte de hepatócitos *in vitro* em maior extensão na ausência de SOCS2.

Os fenômenos inflamatórios descritos acima fazem parte do processo de amplificação da injúria inicial que ocorre nos hepatócitos, sendo observados principalmente entre 6 e 12 horas após a intoxicação por APAP. Contudo, ainda não observamos nenhum fator que justifique a importante diferença no grau de necrose encontrada antes desse período, que faz com que a necrose evolua de forma mais rápida nos animais deficientes para SOCS2 em até 2 horas após a

intoxicação. Sendo assim, tornou-se necessário entender como o hepatócito de SOCS2 reage a alguns estímulos produzidos durante a injúria causada por APAP. Para isso, testes *in vitro* foram realizados utilizando hepatócitos primários dos dois grupos de animais. De acordo com a literatura, o modelo de cultura primária de hepatócitos é o que tem obtido mais sucesso, e reproduz a maior parte dos aspectos patológicos e fisiológicos que ocorrem *in vivo* (GODOY *et al.*, 2013; MAES *et al.*, 2016). A dose de 5mM de APAP foi escolhida baseada em testes prévios realizados pelo nosso grupo, que demonstraram que essa dose foi escolhida pois melhor reproduziu a expressão de SOCS2 encontrada *in vivo*. Além disso, o trabalho publicado por Miyakawa (2015) demonstra que ocorre um mecanismo alternativo de morte celular nos hepatócitos, independente da ativação de CYP, quando são utilizadas concentrações acima de 5mM de APAP.

Vários estudos indicam a importância da sinalização pela via das MAPK na lesão causada por APAP. JNK é um dos membros da superfamília das MAPK, e sua ativação está associada a produção de estresse oxidativo na intoxicação por APAP. Ainda, a inibição da ativação (fosforilação) de JNK leva a redução na permeabilização mitocondrial e na liberação de citocromo c (LATCHOUMYCADANE *et al.*, 2007). Outro trabalho mostra o envolvimento de JNK2 na proliferação de hepatócitos e reparo tecidual, possuindo essa isoforma então um papel oposto, o de proteção (BOURDI *et al.*, 2008). Provavelmente a menor ativação de JNK nos estágios mais tardios da cinética nos animais SOCS2^{-/-} poderia estar relacionada a um atraso da regeneração nesses animais, porém como avaliamos JNK na sua totalidade (pJNK1/2) não conseguimos diferenciar os dois papéis relacionados a essa MAPK.

Já para ERK, a maior ativação nos animais SOCS2^{-/-} pode estar relacionada a maior ativação da inflamação e do estresse oxidativo, como descrito por Yu & Kim (2015). Ainda, há a ativação de ERK no fígado após a administração de APAP, e a administração de um fitoterápico que reduz a necrose também reduz a expressão de p-ERK no fígado dos animais (WANG *et al.*, 2010).

A menor ativação de IKB α nos animais SOCS2^{-/-} parece ir de encontro a maior expressão de NF- κ B (subunidade p65, também chamada RelA) encontrada nesses animais. Como já bem descrito, na via canônica de ativação do NF- κ B a fosforilação de IKB α marca essa mesma proteína para degradação no proteassoma, e assim libera a ativação e entrada de NF- κ B no núcleo da célula. Ou seja, quanto maior a fosforilação de IKB α , maior a ativação de NF- κ B. O fato de que os hepatócitos dos animais SOCS2^{-/-} apresentem maior ativação de NF- κ B basalmente levanta a hipótese de que a baixa ativação de IKB α encontrada é devido a esta proteína já ter sido degradada no proteassoma antes do estímulo. Ainda, apesar de a ativação de IKB α ser a mais estudada e relacionada a ativação de NF- κ B, devemos levar em consideração que há outras isoformas de IKB, como IKB β e IKB ϵ . Um outro modelo hepático também demonstrou que os animais SOCS2^{-/-} possui aumento da expressão de NF- κ B basalmente, corroborando nossos resultados (ZADJALI *et al.*, 2012).

Na maior parte dos casos, NF- κ B controla a expressão de genes alvos relacionados a sobrevivência celular, porém há algumas exceções em que essa proteína pode contribuir para a morte celular (PERKINS & GILMORE, 2006). Além disso, já se sabe que ROS consegue modular a resposta de NF- κ B, e que os alvos deste podem atenuar a resposta a ROS promovendo a sobrevivência. No nosso modelo, a maior expressão de NF- κ B está relacionada a maior produção de ROS nos hepatócitos deficientes para SOCS2. ROS pode interagir com NF- κ B em vários estágios da sua sinalização. No nosso estudo, ROS pode estar estimulando a sinalização por NF- κ B das seguintes formas: 1- ativando as IKK, e conseqüentemente toda a via abaixo delas; 2-ativando a fosforilação alternativa que pode ocorrer em IKB α , que pode resultar na degradação ou não dessa molécula; 3- fosforilando p65, o que leva a maior translocação de NF- κ B e ligação deste ao DNA. Esta última ajuda a justificar que mesmo tendo menor fosforilação de IKB α , NF- κ B continua ativado no animal SOCS2^{-/-}.

O aumento na produção de ROS em ambos os animais acompanha o metabolismo do APAP. O principal alvo do metabólito tóxico gerado nos

microssomos hepáticos, o NAPQI, são as proteínas mitocondriais. A ligação do NAPQI a essas proteínas leva a, principalmente, parada na síntese de ATP, prejudicando a cadeia transportadora de elétrons, o que leva a produção de superóxido, e conseqüentemente de ROS e/ou peroxinitrito. Portanto, a principal fonte de estresse oxidativo nesse modelo é mitocondrial. Corroborando esse fato, animais deficientes para o sistema da NADPH oxidase (gp91fox^{-/-}) não apresentam diminuição do estresse oxidativo e nem da lesão hepática gerada após APAP. Nosso trabalho avaliou a produção de estresse oxidativo pela NADPH oxidase por meio da administração da apocinina, também demonstrando que esse sistema parece ter pouca relevância no nosso modelo experimental. Ter como alvo o estresse gerado na mitocôndria parece ser um bom caminho para estudar novos alvos terapêuticos para esse tipo de intoxicação. O NAC é o antídoto atualmente utilizado, pois detoxifica ROS restabelecendo a GSH hepática. Porém, obviamente ele deve ser administrado ainda na fase de metabolismo do fármaco, cerca de 8 horas após a intoxicação, para prevenir o início da lesão.

Sendo assim, tornou-se importante avaliar a contribuição das enzimas antioxidantes para a diminuição da produção de ROS e da lesão que ocorrem diferencialmente na ausência de SOCS2. A contribuição de NF- κ B para os níveis de ROS é principalmente aumentando a expressão de enzimas antioxidantes. Porém, esse efeito parece ser contrário para a catalase; o trabalho publicado por Schreiber (2006) sugere que essa enzima parece ser menos expressa quando há ativação canônica de NF- κ B. Como nos animais SOCS2^{-/-} há maior ativação de NF- κ B, investigamos se a adição dessa enzima ao sistema causa diminuição no estresse oxidativo e conseqüentemente na morte celular dos hepatócitos na presença de APAP. O resultado foi positivo para os hepatócitos tanto dos animais WT quando dos deficientes para SOCS2. *In vivo*, a diminuição na necrose em ambos os animais que receberam catalase antes e após a sobredose de APAP também reflete esse fato. Os animais deficientes para SOCS2 reduziram a necrose ao mesmo nível que os animais WT, mostrando que a maior necrose

gerada em contrapartida a maior produção de estresse oxidativo, 2 horas após a intoxicação com APAP, pode ser revertida pela ação da catalase. O trabalho publicado por Jamaluddin (2007), demonstra que o tratamento antioxidante reduz a fosforilação de p65 no resíduo Ser276, necessário para sua atividade. Dessa forma, o tratamento com catalase, além de degradar diretamente o ROS, pode estar reduzindo a atividade de NFκB, fatores esses que contribuem para a menor morte celular encontrada *in vitro* e *in vivo*. A redução nos níveis de ALT dos animais SOCS2⁻ causada pela catalase, ainda que não tenha alcançado o valor normal, pode não ter importância clínica. De acordo com Watkins (2006), elevações assintomáticas de ALT são algumas vezes detectadas em pacientes que fazem uso crônico de APAP, dentro da dose máxima diária de 4g que é recomendada. Essas elevações são normalmente 3 vezes maiores que o limite normal, e ocasionalmente podem ser maiores. A importância clínica dessas elevações durante o uso terapêutico é incerta.

Nosso trabalho mostra o fenótipo claro que existe na ausência de SOCS2 em modelo de inflamação hepática gerada por sobredose de paracetamol. A maior letalidade e o comportamento diferenciado de ansiedade nesses animais é devido a maior injúria que ocorre no fígado, devido a maior necrose dos hepatócitos. Durante esse processo, há maior ativação da quinase ERK e de NF-κB, que podem aumentar a produção de estresse oxidativo no hepatócito. De fato, na ausência de SOCS2 a maior ativação dessas proteínas pode estar relacionada a maior produção de ROS, que aumenta a injúria inicial (até 2 horas após o tratamento). A administração de catalase altera esse perfil, restabelecendo os níveis para próximo dos animais WT. Ainda, a maior produção de fatores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF-α, menor produção de IL-10 e TGF-β, e maior recrutamento de neutrófilos podem amplificar a lesão, que ocorre 12 horas após a intoxicação por APAP. A figura 20 resume o mecanismo proposto pelo nosso trabalho.

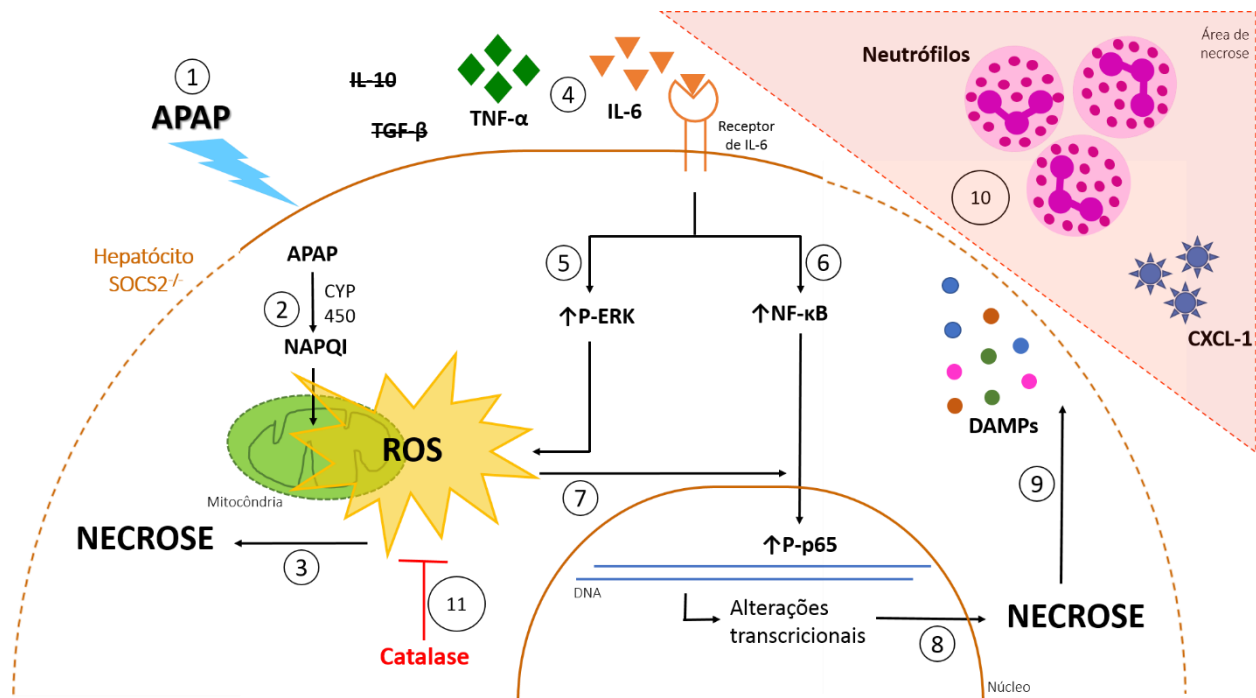


Figura 20. Mecanismo proposto para maior lesão hepática gerada na ausência de SOCS2 após a superdosagem de paracetamol. Passo 1: Dose de 500 mg/Kg de APAP foi administrada *in vivo*, e *in vitro* os experimentos foram realizados utilizando 5mM de APAP. Passo 2: a toxicidade no hepatócito inicia-se após a fase de metabolismo, onde o fármaco, nos hepatócitos, é metabolizado pelo complexo do citocromo P450 (CYP 450), gerando o metabólito tóxico NAPQI. No hepatócito deficiente para SOCS2, a geração excessiva de NAPQI resulta na ligação dessa molécula a proteínas principalmente mitocondriais, gerando diferencialmente mais ROS. Passo 3: O hepatócito deficiente para SOCS2 é mais sensível ao ROS, sofrendo então mais necrose. Passo 4: Outras células hepáticas são as responsáveis pela maior produção de IL-6 e TNF- α na ausência de SOCS2. Ainda, há menor expressão de IL-10 e TGF- β quando comparados aos animais WT. Como já bem descrito na literatura, os hepatócitos possuem receptor para IL-6. A sinalização de IL-6 pode estar ativando duas respostas detectadas na ausência de SOCS2. Passo 5: Maior ativação da ERK, que por sua vez pode estar contribuindo para o aumento de ROS. Passo 6: Maior ativação de NF- κ B, com maior translocação nuclear dessa proteína. Passo 7: ROS também pode controlar a ativação de NF- κ B, fazendo com que aumente a translocação nuclear dessa proteína. Passo 8: As alterações transcricionais geradas pela maior ativação de NF- κ B podem levar a maior necrose do hepatócito. Passo 9: Os DAMPs liberados pela necrose do hepatócito podem recrutar outros tipos celulares. Passo 10: Há maior recrutamento de neutrófilos para a zona de necrose, devido a maior expressão de CXCL-1 por algum leucócito ou outra célula hepática. Passo 11: A administração de catalase reverte os efeitos de necrose gerados pelo ROS.

6 CONCLUSÕES

Nosso trabalho demonstra um papel claramente protetor que a proteína SOCS2 possui durante a inflamação hepática causada pela sobredose de paracetamol. A proteína SOCS2 é importante no prolongamento da sobrevivência do animal durante a lesão por APAP, controlando no fígado o grau de necrose, o recrutamento de neutrófilos para essa área, a produção de fatores pró-inflamatórios como TNF- α e IL6 e de antiinflamatórios como IL-10 e TGF- β . Nos hepatócitos, SOCS2 é importante para evitar a produção excessiva de ROS, e também a ativação de ERK e NF- κ B. Ainda, a catalase parece ser responsável por controlar os efeitos protetores gerados pelo SOCS2.

7 REFERÊNCIAS

- ANTONIADES, C. G.; QUAGLIA, A.; TAAMS, L. S.; MITRY, R. R.; HUSSAIN, M.; ABELES, R.; POSSAMAI, L. A.; BRUCE, M.; MCPHAIL, M.; STARLING, C.; WAGNER, B.; BARNARDO, A.; POMPLUN, S.; AUZINGER, G.; BERNAL, W.; HEATON, N.; VERGANI, D.; HURSZ, M. R.; WENDON, J. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. **Hepatology**, v. 56, n. 2, p. 735-46, 2012.
- APARECIDA SILVA BARBOSA, A.; FREITAS VERSIANI, A.; FONSECA DA CUNHA SOUSA, L.; SILVA DE MIRANDA, A.; GASPARINI, M. R.; BRANT, F.; SILVA, D. G.; LUISA QUINTINO-DE-CARVALHO, I.; MARIANETTI SORIANI, F.; GUIMARÃES DA FONSECA, F.; CÉSAR VASCONCELOS, A.; DA SILVA BARCELOS, L.; MARTINS TEIXEIRA, M.; LÚCIO TEIXEIRA, A.; MACHADO, F. S.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; RACHID, M. A. Role of the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) during meningoencephalitis caused by Bovine herpesvirus 5 (BoHV-5). **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 47, p. 26-31, 2016.
- BABON, J. J.; MCMANUS, E. J.; YAO, S.; DESOUSA, D. P.; MIELKE, L. A.; SPRIGG, N. S.; WILLSON, T. A.; HILTON, D. J.; NICOLA, N. A.; BACA, M.; NICHOLSON, S. E.; NORTON, R. S. The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. **Mol. Cell**, v. 22, n. 2, p. 205–216, 2006.
- BEAVER W. T. Mild analgesics. A review of their clinical pharmacology. **Am J Med Sci**, v. 250, n. 5, p. 577-604, 1965.
- BENTLEY, E.; MACKIE, I.C. Trends in prescriptions of paracetamol for children. **BMJ**, v. 311, n. 7001, p. 362, 1995.
- BOURDI, M.; MASUBUCHI, Y.; REILLY, T. P.; AMOUZADEH, H. R.; MARTIN, J. L.; GEORGE, J. W.; SHAH, A. G.; POHL, L. R. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 289-98, 2002.
- BOURDI, M.; KORRAPATI, M. C.; CHAKRABORTY, M.; YEE, S. B.; POHL, L. R. Protective role of c-Jun N-terminal kinase 2 in acetaminophen-induced liver injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 1, p. 6–10, 2008.
- BRANT, F.; MIRANDA, A. S.; ESPER, L.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; CISALPINO, D.; DE SOUZA, D. G.; RACHID, M. A.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L.; MACHADO, F. S. Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. **Brain Behav Immun.**, v. 54, p. 73-85, 2016.

BUDNITZ, D. S.; LOVEGROVE, M. C.; CROSBY, A. E. Emergency department visits for overdoses of acetaminophen-containing products. **Am J Prev Med**, v. 40, n. 6, p. 585-92, 2011.

CAHOVA, M.; PALENICKOVA, E.; DANKOVA, H.; STICOVA, E.; BURIAN, M.; DRAHOTA, Z.; CERVINKOVA, Z.; KUCERA, O.; GLADKOVA, C.; STOPKA, P.; KRIZOVA, J.; PAPACKOVA, Z.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVA, L. Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 309, p. G100-G111, 2015.

COHEN, S. D.; PUMFORD, N. R.; KHAIRALLAH, E. A.; BOEKELHEIDE, K.; POHL, L. R.; AMOUZADEH, H. R.; HINSON, J. A. Selective protein covalent binding and target organ toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 143, p. 1-12, 1997.

COLGAN, M. T.; MINTZ, A. A. The comparative antipyretic effect N-acetyl-paminophenol and acetylsalicylic acid. **J Pediatr**, v. 50, p. 552-555, 1957.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADAO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; ÁVILA, T. V.; BONFIM, M. R.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M. A.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; DE PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN-gamma in host resistance to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1663, 2012.

COURAD, J.P.; BESSE, D.; DELCHAMBRE, C.; HANOUN, N.; HAMON, M.; ESCHALIER, A.; CAUSSADE, F.; CLOAREC A. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. **Life Sci.**, v. 69, p. 1455-1464, 2001.

DA CUNHA SOUSA, L. F.; RACHID, M. A.; LIMA, G. K.; DE MIRANDA, A. S.; DE CARVALHO VILELA, M.; LACERDA QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D. H.; CAMPOS, M. A.; KROON, E. G.; MACHADO, F. S.; TEIXEIRA, A. L. Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) contributes to encephalitis in a model of Herpes infection in mice. **Brain Res Bull.**, v. 127, p. 164-170, 2016.

DAHLIN, D. C.; MIWA, G. T.; LU, A. Y.; NELSON, S. D. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 1327-31, 1984.

DEFENDI, G. L. Acetaminophen toxicity in children: diagnosis, clinical assessment, and treatment of acute overingestion. **Cons Pediat**, v. 12, n. 7, p. 299-306, 2013.

DEY, B. R.; SPENCE, S. L.; NISSLEY, P.; FURLANETTO, R. W. Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 24095-24101, 1998.

DU, K.; RAMACHANDRAN, A.; WEEMHOFF, J. L.; CHAVAN, H.; XIE, Y.;

KRISHNAMURTHY, P.; JAESCHKE, H. Metformin protects against acetaminophen hepatotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant stress and dysfunction. **Toxicol Sci**, v. 154, n. 2, p. 214-226, 2016.

ESPER, L.; ROMAN-CAMPOS, D.; LARA, A.; BRANT, F.; CASTRO, L. L.; BARROSO, A.; ARAUJO, R. R.; VIEIRA, L. Q.; MUKHERJEE, S.; GOMES, E. R.; ROCHA, N. N.; RAMOS, I. P.; LISANTI, M. P.; CAMPOS, C. F.; ARANTES, R. M.; GUATIMOSIM, S.; WEISS, L. M.; CRUZ, J. S.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, M. M.; MACHADO, F. S. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **Am J Pathol**, v. 181, n. 1, p. 130-40, 2012.

FISHER, J. E.; MCKENZIE, T. J.; LILLEGARD, J. B.; YU, Y.; JUSKEWITCH, J. E.; NEDREDAL, G. I.; BRUNN, G. J.; YI, E. S.; MALHI, H.; SMYRK, T. C.; NYBERG, S. L. Role of Kupffer cells and toll-like receptor 4 in acetaminophen induced acute liver failure. **J Surg Res**, v. 180, p.147-55, 2013.

GANLEY, C.; DAL PAN, G.; RAPPAPORT, B. Acetaminophen overdose and liver injury—background and options for reducing injury. Silver Spring (MD): Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration; 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/DrugSafetyandRiskManagementAdvisoryCommittee/UCM164897.pdf>. Acesso em 17 de janeiro de 2017.

GAO, H.; ZHOU, Y.W. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. **World J Gastroenterol**, v. 11, p. 3671–3674, 2005.

GODOY, P.; HEWITT, N. J.; ALBRECHT, U.; ANDERSEN, M. E.; ANSARI, N.; BHATTACHARYA, S.; BODE, J. G.; BOLLEYN, J.; BORNER, C.; BÖTTGER, J.; BRAEUNING, A.; BUDINSKY, R. A.; BURKHARDT, B.; CAMERON, N. R.; CAMUSSI, G.; CHO, C. S.; CHOI, Y. J.; CRAIG ROWLANDS, J.; DAHMEN, U.; DAMM, G.; DIRSCH, O.; DONATO, M. T.; DONG, J.; DOOLEY, S.; DRASDO, D.; EAKINS, R.; FERREIRA, K. S.; FONSATO, V.; FRACZEK, J.; GEBHARDT, R.; GIBSON, A.; GLANEMANN, M.; GOLDRING, C. E.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; GROOTHUIS, G. M.; GUSTAVSSON, L.; GUYOT, C.; HALLIFAX, D.; HAMMAD, S.; HAYWARD, A.; HÄUSSINGER, D.; HELLERBRAND, C.; HEWITT, P.; HOEHME, S.; HOLZHÜTTER, H. G.; HOUSTON, J. B.; HRACH, J.; ITO, K.; JAESCHKE, H.; KEITEL, V.; KELM, J. M.; KEVIN PARK, B.; KORDES, C.; KULLAK-UBLICK, G. A.; LECLUYSE, E. L.; LU, P.; LUEBKE-WHEELER, J.; LUTZ, A.; MALTMAN, D. J.; MATZ-SOJA, M.; MCMULLEN, P.; MERFORT, I.; MESSNER, S.; MEYER, C.; MWINYI, J.; NAISBITT, D. J.; NUSSLER, A. K.; OLING, P.; PAMPALONI, F.; PI, J.; PLUTA, L.; PRZYBORSKI, S. A.; RAMACHANDRAN, A.; ROGIERS, V.; ROWE, C.; SCHELCHER, C.; SCHMICH, K.; SCHWARZ, M.; SINGH, B.; STELZER, E. H.; STIEGER, B.; STÖBER, R.; SUGIYAMA, Y.; TETTA, C.; THASLER, W. E.; VANHAECKE, T.; VINKEN, M.; WEISS, T. S.; WIDERA, A.; WOODS, C. G.; XU, J. J.; YARBOROUGH, K. M.; HENGSTLER, J. G. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating

mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. **Arch. Toxicol.**, v. 87, n. 8, p. 1315–1530, 2013.

GOLDSHMIT, Y.; WALTERS, C. E.; SCOTT, H. J.; GREENHALGH, C. J.; TURNLEY, A. M. SOCS2 induces neurite outgrowth by regulation of epidermal growth factor receptor activation. **J Biol Chem**, v. 279, v. 16, p. 16349-16355, 2004.

GRAHAM G. G.; SCOTT, K. F. Mechanism of action of paracetamol. **Am J Ther**, v. 12, p. 46–55, 2005.

GREEN, T. J.; SIVILOTTI, M. L.; LANGMANN, C.; YAREMA, M.; JUURLINK, D.; BURNS, M. J.; JOHNSON, D. W. When do the aminotransferases rise after acute acetaminophen overdose? **Clin Toxicol (Phila)**, v. 48, n. 8, p. 787–92, 2010.

GREENHALGH, C. J.; BERTOLINO, P.; ASA, S. L.; METCALF, D.; CORBIN, J. E.; ADAMS, T. E.; DAVEY, H. W.; NICOLA, N. A.; HILTON, D. J.; ALEXANDER, W. S. Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). **Mol. Endocrinol.**, v. 16, n. 6, p. 1394–1406, 2002a.

GREENHALGH, C. J.; METCALF, D.; THAUS, A. L.; CORBIN, J. E.; UREN, R.; MORGAN, P. O.; FABRI, L. J.; ZHANG, J. G.; MARTIN, H. M.; WILLSON, T. A.; BILLESTRUP, N.; NICOLA, N. A.; BACA, M.; ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J. Biol. Chem*, v. 277, n. 43, p. 40181–40184, 2002b.

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, p. 553–561, 2006.

HANAWA, N.; SHINOHARA, M.; SABERI, B.; GAARDE, W. A.; HAN, D.; KAPLOWITZ, N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. **J Biol Chem**, v. 283, p. 13565–13577, 2008.

HARRIS, J.; STANFORD, P. M.; SUTHERLAND, K.; OAKES, S. R.; NAYLOR, M. J.; ROBERTSON, F. G.; BLAZEK, K. D.; KAZLAUSKAS, M.; HILTON, H. N.; WITTLIN, S.; ALEXANDER, W. S.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E.; ORMANDY, C. J. Socs2 and Elf5 mediate prolactin-induced mammary gland development. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 5, p. 1177-1187, 2006.

HEYMANN, F.; TACKE, F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 13, n. 2, p. 88-110, 2016.

HILTON, D. J.; RICHARDSON, R. T.; ALEXANDER, W. S.; VINEY, E. M.; WILLSON, T. A.; SPRIGG, N. S.; STARR, R.; NICHOLSON, S. E.; METCALF, D.; NICOLA, N. A. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n.1, p. 114–119, 1998.

- HINSON, J. A.; PIKE, S. L.; PUMFORD, N. R.; MAYEUX, P. R. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. **Chem Res Toxicol**, v. 11, p. 604–607, 1998.
- HOGESTATT, E. D.; JONSSON, B. A. G.; ERMUND, A. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **J Biol Chem**, v. 280, n. 36, p. 31405–31412, 2005.
- HOLT, M. P.; CHENG, L.; JU, C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. **J Leukoc Biol**, v. 84, p. 1410-21, 2008.
- JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 227-228, 2011.
- JAMALUDDIN, M.; WANG, S.; BOLDOGH, I.; TIAN, B.; BRASIER, A. R. TNF α -induced NF- κ B/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. **Cellular signaling**, v. 19, n. 7, p. 1419-1433, 2007.
- JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Hinson. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 12, p. 1499-1506, 2003.
- JU, C.; REILLY, T. P.; BOURDI, M.; RADONOVICH, M. F.; BRADY, J. N.; GEORGE, J. W.; POHL, L. R. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. **Chem Res Toxicol**, v. 15, p. 1504-13, 2002.
- KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, p. 21–48, 2008.
- KNIGHT, T. R.; KURTZ, A.; BAJT, M. L.; HINSON, J. A.; JAESCHKE, H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. **Toxicol Sci**, v. 62, p. 212–220, 2001.
- KNIGHT, T. R.; HO, Y. S.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, p. 468–475, 2002.
- KUBES, P.; MEHAL, W. Z. Sterile inflammation in the liver. **Gastroenterology**, v. 143, p. 1158-72, 2012.
- KUSHNAREVA, Y.; MURPHY, A. N.; ANDREYEV, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation/reduction state. **Biochem J**, v. 368, p. 545–553, 2002.
- LARSEN, F. S.; WENDON, J. Understanding paracetamol induced liver failure.

Intensive Care Med, v. 40, p. 888-90, 2014.

LARSON, A. M. Acetaminophen hepatotoxicity. **Clin Liver Dis**, v. 11, n. 3, p. 525– 48, 2007.

LATCHOUMYCANDANE, C.; GOH, C. W.; ONG, M. M.; BOELSTERLI, U. A. Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 412-21, 2007.

LAUTERBURG, B. H.; CORCORAN, G. B.; MITCHELL, J. R. Mechanism of action of Nacetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. **J Clin Invest**, v. 71, n. 4, p. 980–91, 1983.

LEE, W. M. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 6–9, 2004.

LETELLIER, E.; HAAN, S. SOCS2: physiological and pathological functions. **Front Biosci**, v. 1, p. 8:189-204, 2016.

LINOSSI, E. M.; BABON, J. J.; HILTON, D. J.; NICHOLSON, S. E. Suppression of cytokine signaling: the SOCS perspective. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 3, p. 241-8, 2013.

LIU, P.; VONDERFECHT, S. L.; FISHER, M. A.; MCGUIRE, G. M.; JAESCHKE, H. Priming of phagocytes for reactive oxygen production during hepatic ischemiareperfusion potentiates the susceptibility for endotoxin-induced liver injury. **Circ Shock**, v.43, p. 9–17, 1994.

LIVAK, K. J. E SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, Dec 2001.

LOTEM J.; SACHS, L. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia. **Oncogene**, v. 21, n. 21, p. 3284–3294, 2002.

MACHADO, F. S.; JOHNDROW, J. E.; ESPER, L.; DIAS, A.; BAFICA, A.; SERHAN, C. N.; ALIBERTI, J. Antiinflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 330–334, 2006.

MAES, M.; VINKEN, M.; JAESCHKE, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 290, p. 86–97, 2016.

MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; NOGUEIRA, L. L.; SORIANI, F. M.; LIMA, B. H.; LOPES, G. A.; RUSSO, R. C.; AVILA, T. V.; MELGAÇO, J. G.; OLIVEIRA, A. G.; PINTO, M. A.; LIMA, C. X.; DE PAULA, A. M.; CARA, D. C.; LEITE, M. F.; TEIXEIRA, M. M.; MENEZES G. B. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1971-82, 2012.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A. G.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A.; GOMIDES, L. F.; SARAIVA, A. M.; PIRES, D. A.; NOVAES, J. T.; PATRICIO, D. O.; CISALPINO, D.; MENEZES-GARCIA, Z.; LEEVY, W. M.; CHAPMAN, S. E.; MAHECHA, G.; MARQUES, R. E.; GUABIRABA, R.; MARTINS, V. P.; SOUZA, D. G.; MANSUR, D. S.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, M. F.; MENEZES, G. B. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 348-6, 2015a.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A. G.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A.; GOMIDES, L. F.; SARAIVA, A. M.; PIRES, D. A.; NOVAES, J. T.; PATRICIO, D. O.; CISALPINO, D.; MARQUES, P. E.; ANTUNES, M. M.; DAVID, B. A.; PEREIRA, R.V.; TEIXEIRA, M. M.; MENEZES, G. B. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. **Nature Protocols**, v.10, n.2, p. 258-268, 2015b.

MARTIN-MURPHY B. V.; HOLT, M. P.; JU C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. **Toxicol Lett**, v. 192, p. 387–394, 2010.

MASUZAKI, R.; ZHAO, S.; VALERIUS, M. T.; TSUGAWA, D.; OYA, Y.; RAY, K. C.; KARP, S. J. SOCS2 Balances Metabolic and Restorative Requirements during Liver Regeneration. **J Biol Chem.**, v. 291, n. 7, p. 3346-58, 2016.

MCBERRY, C.; GONZALEZ, R. M.; SHRYOCK, N.; DIAS, A.; ALIBERTI, J. SOCS2induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38384, 2012.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B.; HIROTA, S. A.; SLABA, I.; WATERHOUSE, C. C.; BECK, P. L.; MURUVE, D. A.; KUBES, P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, p. 362-366, 2010.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharm Res**, v. 30, p. 2174–2187, 2013.

METCALF, D.; GREENHALGH, C. J.; VINEY, E.; WILLSON, T. A.; STARR, R.; NICOLA, N. A.; HILTON, D. J.; ALEXANDER, W. S. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. **Nature**, v. 405, p. 1069–1073, 2000.

MEYERS, L. L.; BEIERSCHMITT, W. P.; KHAIRALLAH, E. A.; COHEN, S. D. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 93, p. 378–387, 1988.

MINAMOTO, S.; IKEGAME, K.; UENO, K.; NARAZAKI, M.; NAKA, T.; YAMAMOTO, H.; MATSUMOTO, T.; SAITO, H.; HOSOE, S.; KISHIMOTO, T. Cloning and functional analysis of new members of STAT Induced STAT Inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI3. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 237, n. 1, p. 79-83, 1997.

MITCHELL, J. R.; JOLLOW, D. J.; POTTER, W. Z.; GILLETTE, J. R.; BRODIE, B. B. Acetaminophen induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 187, p. 211–217, 1973.

MIYAKAWA, K.; ALBEE, R.; LETZIG, L. G.; LEHNER, A. F.; SCOTT, M. A.; BUCHWEITZ, J. P.; JAMES, L. P.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. A Cytochrome P450 Independent Mechanism of Acetaminophen-Induced Injury in Cultured Mouse Hepatocytes. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 354, n. 2, p. 230-7, 2015.

NEGRE-SALVAYRE, A.; AUGÉ, N.; AYALA, V.; BASAGA, H.; BOADA, J.; BRENKE, R.; CHAPPLE, S.; COHEN, G.; FEHER, J.; GRUNE, T.; LENGYEL, G.; MANN, G. E.; PAMPLONA, R.; POLI, G.; PORTERO-OTIN, M.; RIAHI, Y.; SALVAYRE, R.; SASSON, S.; SERRANO, J.; SHAMNI, O.; SIEMS, W.; SIOW, R. C.; WISWEDEL, I.; ZARKOVIC, K.; ZARKOVIC, N. Pathological aspects of lipid peroxidation. **Free Radic Res**, v. 44, p. 1125–1171, 2010.

NICHOLSON, S. E.; WILLSON, T. A.; FARLEY, A.; STARR, R.; ZHANG, J. G.; BACA, M.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; NICOLA, N. A. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. **EMBO J**, v. 18, n. 2, p. 375-385, 1999.

NUMATA, K.; KUBO, M.; WATANABE, H.; TAKAGI, K.; MIZUTA, H.; OKADA, S.; KUNKEL, S. L.; ITO, T.; MATSUKAWA, A. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-3 in T cells exacerbates acetaminophen-induced hepatotoxicity. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3777-85, 2007.

O'SULLIVAN, L. A.; LIONGUE, C.; LEWIS, R. S.; STEPHENSON, S. E. M.; WARD, A. C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. **Mol Immunol**, v. 44, p. 2497-2506, 2007.

OTTANI, A.; LEONE, S.; SANDRINI, M.; FERRARI, A.; BERTOLINI, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 531, p. 280–281, 2006.

PALMER, D. C.; RESTIFO, N. P. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. **Trends Immunol.**, v. 30, n. 12, p. 592-602, 2009.

PANDOLFINI, C.; BONATI, M. A literature review on off-label drug use in children. **Eur. J. Pediatr.**, v. 164, p. 552-558, 2005.

PERKINS, N.D.; GILMORE, T. D. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 5, p. 759-772, 2006.

PEZET, A.; FAVRE, H.; KELLY, P. A.; EDERY, M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 35, p. 24497–24502, 1999.

PIESSEVAUX, J.; LAVENS, D.; MONTOYE, T.; WAUMAN, J.; CATTEEUW, D.; VANDEKERCKHOVE, J.; BELSHAM, D.; PEELMAN, F.; TAVERNIER, J. Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 44, p. 32953–32966, 2006.

PIESSEVAUX, J.; LAVENS, D.; PEELMAN, F.; TAVERNIER, J. The many faces of the SOCS box. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 19, n. 5-6, p. 371–381, 2008.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: Past, Present and Future. **Am J Ther**, v. 7, n. 2, p. 1437, 2000.

RANSOME, M. I.; GOLDSHMIT, Y.; BARTLETT, P. F.; WATERS, M. J.; TURNLEY, A. M. Comparative analysis of CNS populations in knockout mice with altered growth hormone responsiveness. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, n. 8, p. 2069–2079, 2004.

RAUCY, J. L.; LASKER, J. M.; LIEBER, C. S.; BLACK, M. Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. **Arch Biochem Biophys**, v. 271, p. 270–283, 1989.

REILLY, T. P.; BOURDI, M.; BRADY, J. N.; PISE-MASISON, C. A.; RADONOVICH, M. F.; GEORGE, J. W.; POHL, L. R. Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 282, n. 1, p. 321-8, 2001.

RICO-BAUTISTA, E.; FLORES-MORALES, A.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 17, n. 6, p. 431-9, 2006.

SCHMIDT, L. E.; DALHOFF, K.; POULSEN, H. E. Acute versus chronic alcohol consumption in acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 876–82, 2002.

SCHREIBER, J.; JENNER, R. G.; MURRAY, H. L.; GERBER, G. K.; GIFFORD, D. K.; YOUNG, R. A. Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 15, p. 58995904, 2006.

SHUHENDLER, A. J.; PU, K.; CUI, L.; UETRECHT, J. P.; RAO, J. Real-time imaging of oxidative and nitrosative stress in the liver of live animals for drug-toxicity testing. **Nat Biotechnol**, v. 32, p. 373–380, 2014.

SIMA, L.; FANG, W. X.; WU, X. M.; LI, F. Efficacy of oxycodone/paracetamol for patients with bone-cancer pain: a multicenter, randomized, double-blinded, placebo controlled trial. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 37, p. 27-31, 2012.

SMILKSTEIN, M. J.; KNAPP, G. L.; KULIG, K. W.; RUMACK, B. H. Efficacy of oral Nacetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). **N Engl J Med**, v. 319, n. 24, p. 1557–62, 1988.

SMILKSTEIN, M. J.; BRONSTEIN, A. C.; LINDEN, C.; AUGENSTEIN, W. L.; KULIG, K. W.; RUMACK, B. H. Acetaminophen overdose: a 48- hour intravenous N-acetylcysteine treatment protocol. **Ann Emerg Med**, v. 20, n. 10, p.1058–63, 1991.

STOCKLER, M.; VARDY, J.; PILLAI, A.; WARR, D. Acetaminophen (paracetamol) improves pain and well-being in people with advanced cancer already receiving a strong opioid regimen: a randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p. 3389-3394, 2004.

STREETZ, K. L.; TACKE, F.; LEIFELD, L.; WÜSTEFELD, T.; GRAW, A.; KLEIN, C.; KAMINO, K.; SPENGLER, U.; KREIPE, H.; KUBICKA, S.; MÜLLER, W.; MANNS, M. P.; TRAUTWEIN, C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. **Hepatology**, v. 38, n. 1, p. 218–229, 2003.

TACKE, F.; LUEDDE, T.; TRAUTWEIN, C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. **Clin Rev Allergy Immunol.**, v. 36, p. 4–12, 2009.

TACKE, F.; ZIMMERMANN, H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **J Hepatol**, v. 60, p. 1090-6, 2014.

TANNAHILL, G. M.; ELLIOTT, J.; BARRY, A. C.; HIBBERT, L.; CACALANO, N. A.; JOHNSTON, J. A. SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. **Mol. Cell Biol.**, v. 25, n. 20, p. 9115–9126, 2005.

TIRMENSTEIN, M.A.; NELSON, S. D. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a non hepatotoxic regioisomer, 39hydroxyacetanilide, in mouse liver. **J Biol Chem**, v. 264, p. 9814–9819, 1989.

TURNLEY, A. M.; FAUX, C. H.; RIETZE, R. L.; COONAN, J. R.; BARTLETT, P. F. Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling. **Nat. Neurosci**, v. 5, n.11, p. 1155–1162, 2002.

UETRECHT, J.; NAISBITT, D. J. Idiosyncratic adverse drug reactions: current concepts. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 2, p. 779–808, 2013.

URBAN, T. J.; SHEN, Y.; STOLZ, A.; CHALASANI, N.; FONTANA, R. J.; ROCHON, J.; GE, D.; SHIANN, K. V.; DALY, A. K.; LUCENA, M. I.; NELSON, M. R.; MOLOKHIA, M.; AITHAL, G. P.; FLORATOS, A.; PE'ER, I.; SERRANO, J.; BONKOVSKY, H.; DAVERN, T. J.; LEE, W. M.; NAVARRO, V. J.; TALWALKAR, J. A.; GOLDSTEIN, D. B.; WATKINS, P. B. Limited contribution of common genetic variants to risk for liver injury due to a variety of drugs. **Pharmacogenet Genomics**, v. 22, n. 11, p. 784–795, 2012.

UREN, R. T.; TURBIĆ, A.; WONG, A. W.; KLEIN, R.; MURRAY, S. S.; TURNLEY, A. M. A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. **J. Neurochem.**, v. 129, n. 4, p. 614–627, 2014.

UREN, R. T.; TURNLEY, A. M. Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 1-14, 2014.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am J Med**, v. 104, n. 3, p. 2S–8S, 1998.

WATKINS, P. B.; KAPLOWITZ, N.; SLATTERY, J. T.; COLONESE, C. R.; COLUCCI, S. V.; STEWART, P. W.; HARRIS, S. C. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 296, n. 1, p. 87-93, 2006.

WANG, A. Y.; LIAN, L. H.; JIANG, Y. Z.; WU, Y. L.; NAN, J. X. Gentiana manshurica Kitagawa prevents acetaminophen-induced acute hepatic injury in mice via inhibiting JNK/ERK MAPK pathway. **World J. Gastroenterol**, v. 16, p. 384–391, 2010.

WHITCOMB, D. C.; BLOCK, G. D. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. **JAMA**, v. 272, n. 23, p. 1845–50, 1994.

WILCOX, C. M.; CRYER, B.; TRIADAFILOPOULOS, G. Patterns of use and public perception of over-the-counter pain relievers: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J. Rheumatol.**, v. 32, p. 2218-2224, 2005.

WORMALD, S.; HILTON, D. Inhibitors of cytokine signal transduction. **J Biol Chem**, v. 279, p. 821-824, 2003.

YASUKAWA, H.; MISAWA, H.; SAKAMOTO, H.; MASUHARA, M.; SASAKI, A.; WAKIOKA, T.; OHTSUKA, S.; IMAIZUMI, T.; MATSUDA, T.; IHLE, J. N.; YOSHIMURA, A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO J**, v. 18, n. 5, p. 1309–1320, 1999.

YOU, Q.; HOLT, M.; YIN, H.; LI, G.; HU, C. J.; JU, C. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. **Biochem Pharmacol**, v. 86, p. 836-43, 2013.

YU, S. M.; KIM, S. J. The thymoquinone-induced production of reactive oxygen species promotes dedifferentiation through the ERK pathway and inflammation through the p38 and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 2, p. 325–332, 2015.

YUAN, H. D.; JIN, G. Z.; PIAO, G. C. Hepatoprotective effects of an active part from *Artemisia sacrorum* Ledeb. against acetaminophen-induced toxicity in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 127, p. 528–533, 2010.

ZADJALI, F.; SANTANA-FARRE, R.; VESTERLUND, M.; CAROW, B.; MIRECKIGARRIDO, M.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, I.; FLODSTRÖM-TULLBERG, M.; PARINI, P.; ROTTENBERG, M.; NORSTEDT, G.; FERNANDEZ-PEREZ, L.; FLORESMORALES, A. SOCS2 deletion protects against hepatic steatosis but worsens insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. **FASEB J.**, v. 26, n. 8, p. 3282-91, 2012.

ZAHER, H.; BUTERS, J. T.; WARD, J. M.; BRUNO, M. K.; LUCAS, A. M.; STERN, S. T.; COHEN, S. D.; GONZALEZ, F. J. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 152, p. 193–199, 1998.

ZELLMER, S.; SICKINGER, S.; SCHMIDT-HECK, W.; GUTHKE, R.; GEBHARDT, R. Heterogeneous expression of suppressor of cytokine signalling 2 (SOCS-2) in liver tissue. **J Anat.**, v. 215, n. 2, p. 176-83, 2009.

ZERRAD-SAAFI, A.; LAMBERT-BLOT, M.; MITCHELL, C.; BRETES, H.; COLLIN DE L'HORTET, A.; BAUD, V.; CHEREAU, F.; SOTIROPOULOS, A.; KOPCHICK, J. J.; LIAO, L.; XU, J.; GILGENKRANTZ, H.; GUIDOTTI, J. E. GH receptor plays a major role in liver regeneration through the control of EGFR and ERK1/2 activation. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2731-2741, 2011.

ZHANG, J. G.; FARLEY, A.; NICHOLSON, S. E.; WILLSON, T. A.; ZUGARO, L. M.; SIMPSON, R. J.; MORITZ, R. L.; CARY, D.; RICHARDSON, R.; HAUSMANN, G.; KILE, B. T.; KENT, S. B.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; NICOLA, N. A.; BACA, M. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 5, p. 2071–2076, 1999.

ZIGMOND, E.; SAMIA-GRINBERG, S.; PASMNIK-CHOR, M.; BRAZOWSKI, E.; SHIBOLET, O.; HALPERN, Z.; VAROL, C. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. **J Immunol**, v. 193, p. 344-53, 2014.

ZIMMERMAN H. J.; MADDREY, W. C. Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. **Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 767–73, 1995.