

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Pedro Elias Marques Pereira Silva

**Deposição de DNA no fígado como um novo fenômeno da
lesão hepática medicamentosa**

Belo Horizonte
Agosto de 2014

Pedro Elias Marques Pereira Silva

**Deposição de DNA no fígado como um novo fenômeno da
lesão hepática medicamentosa**

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para defesa de tese de doutoramento.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

Agosto de 2014

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunobiofotônica, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Também foram utilizados o laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia (ICB-UFMG); o laboratório de Biofotônica, localizado no Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG; e o *Integrated Imaging Facility* da Universidade de Notre Dame (EUA). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT Dengue.

“Welcome my son, welcome to the machine...”

(Pink Floyd, 1975)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Gustavo, meu amigo e orientador, por ter me dado a formação de um cientista que gosta e dá valor ao que faz. Agradeço por me mostrar que algo bem feito é fruto de esforço seguido de esforço, com um pouco mais de esforço até que 100% do nosso melhor esteja em nossas mãos. Vi um chefe de grupo e seu laboratório nascerem do nada e se transformarem em algo invejável nos dias de hoje, saiba que isso é mérito seu e o admiro muito por isso e por várias outras coisas. Almejo ter a mesma determinação e habilidade que você, e, contando com um pouco de sorte, espero que um dia nos encontremos como colegas de profissão.

Agradeço ao André, que contribuiu com o laboratório e com meu doutorado mais do que imagina. Um cientista de primeira, que consegue mudar de área e ser bom no que faz como se fosse fácil, me ensinou muito com seu jeito de pensar e trabalhar. Obrigado por toda a sua contribuição a um dos artigos mais legais que já vi.

Agradeço a Rafaela, minha namorada e colega de laboratório, por me mostrar que de fato é possível combinar relacionamento e trabalho em algo muito mais legal do que eu poderia imaginar. Obrigado por seu amor, apoio e carinho que me mantém apto e firme a sempre continuar dando um passo a frente.

Agradeço a Bruna e Dani, cuja ajuda e disponibilidade em me acompanhar tornaram tudo que eu fiz possível. Sem vocês eu talvez terminasse tudo em 2024. Obrigado por me ensinarem tanto sobre como aprender e como ensinar ciência, vocês são uma parte importante do que me tornei hoje.

Agradeço as professoras Denise e Vanessa, que me apoiaram de toda e qualquer maneira possível. Obrigado por me deixarem seguro, me mostrando várias vezes que sempre que eu precisasse vocês estariam lá pra me ajudar.

Obrigado a Maísa, Lindis, Júlia, Daniel e Adriana por toda a ajuda que me deram sempre. Agradeço também ao Albená, Denise e Alesandra, pela companhia e alegria. Sou grato a todos vocês por fazerem do laboratório um lugar tão legal e que dá gosto de ir todo dia.

Agradeço ao Rafael, Braulio, Flavão, Remo, Mauro e todo seu grupo por toda a crítica construtiva, pela força constante, mesmo quando ainda estávamos engatinhando no N3 e pela amizade de todo dia, especialmente no café.

Obrigado ao Mansur, ao Rodrigo e ao Cisalpino, que tiveram grande participação no artigo e na construção do meu doutorado. Sua ajuda foi muito importante, tanto na forma de experimentos como na forma de análise crítica e boas ideias.

Um abraço para os amigos da Biologia e do D.A., que mesmo depois do fim da graduação ou da tomada de diferentes caminhos profissionais me provou que amizade não reconhece qualquer distância física ou temporal. A presença marcante em qualquer dos eventos faz da nossa galera a melhor de todos os tempos.

Agradeço a pelada de segunda, uma demonstração infinita da nossa inabilidade em jogar futebol, mas uma verdadeira comédia e válvula de escape pra começar a semana bem. Só perco a pelada por razões médicas.

Obrigado à galera do Coreu, especialmente ao Tiona, Gut, Thiaguin e Chokito. Já é uma história que dura mais de 20 anos, certamente durará mais uns 60.

Agradeço muito a minha família, Solange, Roberto, Kiko, Rafael e Maíra. É muito reconfortante saber que sempre podemos retornar ao fim do dia a uma família que nos mantém sempre bem e seguros. Seu apoio incondicional garantiu que eu pudesse me dedicar completamente à busca do meu sucesso, portanto, saibam que ele é de vocês também.

Abril de 2014

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS	28
3.2 COLORAÇÃO POR FEULGEN	28
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	29
3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA	29
3.5 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.6 O MODELO DE LESÃO HEPÁTICA	30
3.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO.....	30
3.8 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E ANTICORPOS	31
3.9 AQUISIÇÃO DE IMAGEM NÃO INVASIVA	31
3.10 MICROSCOPIA INTRAVITAL CONFOCAL	31
3.11 CAMUNDONGOS TRATADOS COM ANTIBIÓTICOS	32
3.12 PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE DE RNA 16S.....	32
3.13 EXTRAÇÃO DE DNA DE FÍGADO DE CAMUNDONGO	33
3.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DNASE DO SORO DE CAMUNDONGO.....	33
3.15 NEUTRÓFILOS DE MEDULA ÓSSEA.....	34
3.16 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	34
3.17 CITOMETRIA DE FLUXO DE LEUCÓCITOS HEPÁTICOS	35
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS	36

4.1 APAP CAUSA PERDA DE VIABILIDADE CELULAR E ACÚMULO ABERRANTE DE DNA NO CITOPLASMA DE HEPATÓCITOS	36
4.2 DNA ABERRANTE EM HEPATÓCITOS É PROPORCIONAL AO DANO INDUZIDO POR APAP E EXTRAVASA PARA O MEIO EXTRACELULAR	38
4.3 PARTE DO DNA ABERRANTE ESTÁ CONTIDA EM VESÍCULAS QUE POSSUEM PROTEÍNAS DO ENVELOPE NUCLEAR	40
4.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS INCUBADOS COM APAP NÃO CONDIZEM COM APOPTOSE.....	42
4.5 APAP CAUSA LESÃO HEPÁTICA DE MANEIRA DOSE- E TEMPO-DEPENDENTE EM CAMUNDONGOS	44
4.6 ANÁLISE POR IMAGEM NÃO-INVASIVA DE CAMUNDONGOS INTOXICADOS COM APAP INDICA GRANDE QUANTIDADE DE DNA EXPOSTO NA ÁREA DO FÍGADO	46
4.7 INTOXICAÇÃO POR APAP LEVA A DEPOSIÇÃO DE DNA NO FÍGADO.....	48
4.8 DEPOSIÇÃO DE DNA NO FÍGADO É DIRETAMENTE PROPORCIONAL AO GRAU DE LESÃO...50	
4.9 ATIVIDADE DE DNASE DO SORO DE CAMUNDONGOS NÃO É REDUZIDA DURANTE A LESÃO HEPÁTICA POR SOBREDOSE DE APAP.....	52
4.10 NEUTRÓFILOS, MAS NÃO MACRÓFAGOS, ESTÃO PRESENTES EM ZONAS RICAS EM DNA E PARTICIPAM DA LESÃO HEPÁTICA CAUSADA POR APAP	54
4.11 NEUTRÓFILOS MIGRAM ESPECIFICAMENTE PARA O INTERIOR DAS ZONAS DE NECROSE NO DECORRER DA LESÃO HEPÁTICA	56
4.12 RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO NECRÓTICO É INDEPENDENTE DE CD18 E ÁCIDO HIALURÔNICO, MAS DEPENDENTE DE CXCR2 E FPR1	58
4.13 TIOACETAMIDA, OUTRO COMPOSTO HEPATOTÓXICO, TAMBÉM É CAPAZ DE INDUZIR DNA ABERRANTE EM HEPATÓCITOS E ACÚMULO DE DNA IN VIVO	60
4.14 A NECROSE HEPÁTICA POR APAP OCORRE EM CONDIÇÃO ESTÉRIL E NÃO ESTÁ ASSOCIADA À TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	62
4.15 DEPOSIÇÃO DE DNA INTRAVASCULAR NÃO É DERIVADA DE NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs)	64
4.16 NEUTRÓFILOS APRESENTAM EXPRESSÃO ELEVADA DO RECEPTOR TLR9 EM SUA SUPERFÍCIE DURANTE A LESÃO HEPÁTICA	66

4.17 NEUTRÓFILOS DETECTAM E RESPONDEM A DNA HEPÁTICO POR MEIO DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E REDUÇÃO DE GRANULOSIDADE.....	68
4.18 ELIMINAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE DNA OU DA DETECÇÃO POR TLR9 REDUZEM SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA, O INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RESPOSTA A APAP	70
4.19 BLOQUEIO DO ACÚMULO DE DNA OU DE SEU RECONHECIMENTO POR TLR9 CAUSA REDUÇÃO SIGNIFICATIVA DA NECROSE HEPÁTICA POR APAP	72
4.20 DNA E TLR9 NÃO PARTICIPAM DA LESÃO INDUZIDA POR APAP EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS	74
4.21 CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM TLR9 DESENVOLVEM A LESÃO TÓXICA INICIAL POR APAP, MAS ELA NÃO PROGRIDE DEVIDO A SUA RESPOSTA INFLAMATÓRIA REDUZIDA	76
4.22 A EXPRESSÃO DE TLR9 EM NEUTRÓFILOS É UMA PEÇA FUNDAMENTAL NA PATOGÊNESE DA LESÃO HEPÁTICA POR APAP.....	78
5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÕES	95
7 BIBLIOGRAFIA.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – *Analysis of Variance*

APAP – *Acetaminophen*; Paracetamol

Bp – Pares de bases

BSA – Albumina sérica bovina

CEBIO – Centro de Bioterismo da UFMG

CETEA – Comitê de ética em experimentação Animal da UFMG

CLP – Ligadura e punção cecal

CLR – Receptor de Lectina tipo C

COX – Ciclooxigenase

CpG - Citidina-fosfato-guanosina

Ct – *Threshold cycle*

DAMP – Padrão molecular associado a dano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNASE – Desoxiribonuclease

DILI – *Drug-induced liver injury*; Lesão hepática induzida por medicamento

DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FHA – Falência Hepática Aguda

FIG – Figura

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFP – *Green Fluorescent Protein*; Proteína verde fluorescente

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GSH – Glutathiona reduzida

HAV – Vírus da hepatite A

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

H&E – Hematoxilina e Eosina

HMGB1 – *High-mobility group box 1*

HNase – Hialuronidase
HSC – Célula de Ito; Célula estrelada
HSP – Heat-shock protein; proteínas do choque térmico
IL- – Interleucina
IL. – Ilustração
IFN γ – Interferon gama
i.p. – Intraperitoneal
ISG – Genes estimulados por interferon
i.v. – Intravenoso
IVM – Microscopia intravital confocal
KC – Célula de Kupffer
LSEC – Célula endotelial sinusoidal do fígado
LPS – Lipopolissacarídeo
MPO – Mieloperoxidase
MTT – Sal de tetrazólio
NAC – N-acetilcisteína
NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonaimina
NET – *Neutrophil Extracellular Trap*; Armadilha extracelular de neutrófilo
NK – Célula *natural killer*; célula assassina natural
NLR – Receptor tipo NOD
NOS – Óxido nítrico sintetase
PAMP – Padrão molecular associado a patógeno
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
PGE₂ – Prostagladina E₂
PI – Iodeto de propídeo
PRR – Receptores de reconhecimento de padrões
RE – Retículo endoplasmático
RLR – Receptor tipo RIG-I
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio

STP - Staurosporina

TAA – *Thioacetamide*; Tioacetamida

TLR – Receptor tipo-toll

TLR9^{-/-} – Célula ou animal deficiente em TLR9

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

WT – *Wild-type*; Tipo selvagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Localização e interações entre populações celulares do lóbulo hepático.....	19
Ilustração 2 – Mediadores e receptores envolvidos no recrutamento de neutrófilos para a lesão hepática estéril.....	23
Ilustração 3 – Liberação de produtos mitocondriais e quimiocinas pelo fígado necrótico promove amplificação do dano hepático local e inflamação remota nos pulmões.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A toxicidade por APAP causa acúmulo de DNA no citoplasma de hepatócitos	37
Figura 2 – Acúmulo de DNA aberrante induzido por APAP é dose-dependente e culmina na liberação de DNA para o meio extracelular	39
Figura 3 – DNA aberrante pode ser encontrado em vesículas contendo proteínas nucleares.....	41
Figura 4 – O indutor de apoptose staurosporina promove um perfil morfológico e de distribuição de DNA distinto de APAP	43
Figura 5 – A toxicidade por APAP envolve grave necrose hepática e mortalidade	45
Figura 6 – Imagem de fluorescência não-invasiva indicando grande quantidade de DNA livre no fígado de camundongos tratados com APAP	47
Figura 7 – A lesão hepática causada por APAP é acompanhada de intensa deposição de DNA no fígado.....	49
Figura 8 – Presença de DNA intravascular correlaciona diretamente com o dano hepático	51
Figura 9 – Não há redução da atividade de DNASE sérica durante a lesão hepática por APAP...53	
Figura 10 – Necrose hepática aguda por APAP envolve neutrófilos, mas não envolve células de Kupffer	55
Figura 11 – Neutrófilos são ativamente recrutados para o interior das zonas de necrose durante a lesão hepática, onde desenvolvem um comportamento de patrulhamento	57
Figura 12 – CXCR2 e FPR1 são necessários para a migração de neutrófilos e desenvolvimento de zonas de necrose induzidos por APAP.....	59
Figura 13 – Acúmulo de DNA aberrante em hepatócitos e camundongos não é restrito a toxicidade por APAP.....	61
Figura 14 – A lesão hepática induzida por APAP ocorre em condição estéril	63
Figura 15 – Deposição de DNA no fígado é negativa para elastase de neutrófilo.....	65
Figura 16 – Neutrófilos hepáticos expressam TLR9 em sua superfície durante a necrose por APAP.....	67
Figura 17 – Detecção de DNA hepático por neutrófilos é dependente de TLR9 e leva ao aumento de expressão de genes pró-inflamatórios e redução da granulocidade.....	69
Figura 18 – Eliminação de depósitos de DNA ou bloqueio de sua detecção via TLR9 reduzem significativamente a lesão hepática e inflamação induzida por APAP	71

Figura 19 – Cortes histológicos de fígado corados por H&E, evidenciando os efeitos protetores do bloqueio da detecção de DNA ou de sua eliminação durante a lesão hepática por APAP	73
Figura 20 – DNA e TLR9 não participam do dano causado por APAP em hepatócitos primários isolados.....	75
Figura 21 – A ausência de TLR9 bloqueia a progressão da lesão hepática por APAP.....	77
Figura 22 – A amplificação da lesão hepática após intoxicação por APAP é causada por neutrófilos expressando TLR9 funcional	79

RESUMO

A lesão hepática por medicamentos (DILI) é um problema crescente de saúde pública. Ela pode evoluir para falência hepática aguda (FHA), um transtorno associado a alta mortalidade e com poucas opções de tratamento. Durante a DILI, a morte necrótica de hepatócitos leva à liberação de moléculas intracelulares capazes de causar um intenso processo inflamatório (DAMPs), podendo amplificar a lesão tecidual causada inicialmente pelo medicamento. Dentre estas moléculas, o potencial citotóxico do DNA já está associado a várias doenças inflamatórias e autoimunes, entretanto, a dinâmica de sua liberação e acúmulo em tecidos lesados, e os mecanismos de seu reconhecimento por leucócitos são pouco conhecidos. Neste trabalho, nós demonstramos que durante a intoxicação por diferentes agentes hepatotóxicos, paracetamol (APAP) e tioacetamida (TAA), ocorre acúmulo de DNA aberrante no citoplasma de hepatócitos, que culmina na liberação de DNA para o meio e extracelular morte destas células. Ao avaliarmos a lesão hepática por estes agentes *in vivo*, encontramos um enorme acúmulo de DNA no fígado, principalmente em zonas de necrose e na forma de depósitos intravasculares. Em paralelo ao DNA depositado, observamos um grande infiltrado de neutrófilos no fígado, que se direcionavam especificamente para o interior das zonas de necrose e exerciam um patrulhamento intenso destas áreas. Enquanto neutrófilos se movimentavam ativamente dentro da necrose, macrófagos se mantinham imóveis e restritos à área viável do fígado. Observamos que neutrófilos aumentam a expressão de TLR9 durante a lesão hepática, e usam este receptor para reconhecer e responder à deposição de DNA por meio do aumento de expressão de NF- κ B e CXCR2. A eliminação dos depósitos de DNA no fígado pelo pós-tratamento com DNASE1 ou bloqueio do reconhecimento por TLR9 reduziram significativamente a lesão hepática, o infiltrado de neutrófilos e a inflamação tecidual. A expressão de TLR9 em neutrófilos é essencial para seu papel danoso, pois a transferência de neutrófilos selvagens para camundongos deficientes em TLR9 reverte completamente o fenótipo protegido da lesão por APAP. Em conjunto, nossos dados demonstram um novo fenômeno envolvendo a deposição de DNA no fígado durante a lesão hepática, e sugerem que o controle do reconhecimento de DNA pelo sistema imune é uma estratégia promissora para o tratamento de DILI e FHA.

ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is an important cause of acute liver failure (FHA), but with limited therapeutic options. During DILI, oncotic necrosis with concomitant release and recognition of intracellular content amplifies liver inflammation and injury. Amongst these molecules, DNA has been widely shown to trigger inflammatory and autoimmune diseases; however, the mechanisms involved in DNA release from damaged hepatocytes, whether it accumulates into the necrotic liver, and the impact of its recognition by the immune system remains elusive. Here we showed that treatment with two different hepatotoxic compounds (acetaminophen and thioacetamide) caused DNA release to the hepatocyte cytoplasm, which occurred in parallel with cell death *in vitro*. Administration of these compounds *in vivo* caused massive DNA deposition within the liver necrotic areas, together with a widespread intravascular DNA coating. Using confocal intravital microscopy, we revealed that liver injury due to hepatotoxic overdose led to a directional migration of neutrophils to DNA-rich areas, where they exhibited an active patrolling behavior. DNA removal by intravenous DNASE1 injection or blockage of TLR9-mediated sensing significantly reduced systemic inflammation, liver neutrophil recruitment and hepatotoxicity. Analysis of liver leukocytes by flow cytometry revealed that emigrated neutrophils upregulated TLR9 expression in the plasma membrane during liver necrosis, and these cells sensed and reacted to extracellular DNA by up-regulating NF- κ B and CXCR2 expression. Interestingly, adoptive transfer of wild-type neutrophils to TLR9^{-/-} mice reversed the hepatoprotective phenotype otherwise observed in TLR9 absence. We concluded that hepatic DNA accumulation is a novel feature of DILI pathogenesis and blockage of DNA recognition by the innate immune system may consist in a promising therapeutic venue for DILI and FHA.

1 INTRODUÇÃO

O fígado é o maior órgão interno do corpo, se localiza na cavidade abdominal logo abaixo do diafragma e corresponde a até 2.5% da massa corporal total (VOLLMAR & MENGER, 2009). O fígado é irrigado por um grande volume de sangue, do qual 80% é derivado da veia porta, sendo pouco oxigenado e rico em nutrientes absorvidos no intestino. O restante é sangue oxigenado fornecido pela artéria hepática. Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, em baixa pressão e tensão de oxigênio, através de uma enorme rede de vasos capilares de parede fina, chamados sinusóides (JENNE & KUBES, 2013). O fígado é dividido microscopicamente em inúmeras seções poliédricas chamadas lóbulos hepáticos, onde se localiza o hepatócito, a célula do parênquima hepático. Os hepatócitos se organizam em cordões entremeados pelos sinusóides, e se estendem da periferia do lóbulo (onde se localizam os espaços porta) até o vaso central nomeado veia centrolobular. Os espaços porta contêm ramos da artéria hepática, veia porta e ducto biliar, fazendo com que o fluxo sanguíneo dentro do lóbulo hepático parta desta estrutura e siga em direção à veia centrolobular e vasos subsequentes, chegando até a veia hepática e deixando o órgão (VOLLMAR & MENGER, 2009).

A organização morfológica e os tipos celulares presentes no fígado permitem que ele realize inúmeras atividades. Os hepatócitos, células de origem epitelial que compõem cerca de 80% do fígado, realizam a maioria das funções sintéticas e secretoras atribuídas ao órgão, que inclui o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos; secreção de bile e hormônios; produção de albumina, fatores de coagulação e proteínas de fase aguda; armazenamento energético e controle glicêmico, dentre outras. O hepatócito também é especialmente conhecido pela notável capacidade de detoxificar compostos endógenos e exógenos, como amônia, hormônios esteroides, medicamentos, contaminantes ambientais, álcool e drogas (ROSSAINT & ZARBOCK, 2013). Funções metabólicas e secretoras tão variadas requerem que o hepatócito seja uma célula muito ativa em termos energéticos e de transcrição gênica. Portanto, traços característicos do hepatócito são possuir uma enorme quantidade de mitocôndrias no citoplasma, e, por razões ainda pouco entendidas, conter múltiplas cópias do genoma acumuladas em seus núcleos (DUNCAN, 2013).

Os hepatócitos são separados do fluxo sanguíneo nos sinusóides por células endoteliais sinusoidais (LSEC), um tipo celular bastante diferenciado do endotélio convencional. As LSECs

são finas, não possuem lâmina basal e contêm grande número de aberturas nomeadas fenestras. A morfologia e fenestras das LSECs permitem que os hepatócitos abaixo mantenham um contato íntimo, mas ainda seletivo, com os leucócitos e moléculas carregadas vagarosamente pelo sangue dentro do lúmen sinusoidal (HICKEY & WESTHORPE, 2013). Outra particularidade do fígado é seu macrófago tecidual, conhecido como célula de Kupffer (KC). Esses macrófagos encontram-se dentro dos sinusóides, sobre as LSECs, o que os deixa completamente expostos ao conteúdo sanguíneo, e permite que fagocitem material direto da microcirculação hepática. KCs em conjunto com LSECs formam o maior sistema reticulo-endotelial do corpo, que basicamente tem a função de capturar antígenos, microrganismos e células senescentes, e eliminá-los do sangue (JENNE & KUBES, 2013). Esta função de filtro impede que grandes quantidades de lipopolissacarídeo (LPS), restos celulares e microrganismos da microbiota atinjam a circulação sistêmica, prevenindo a disseminação de patógenos em condições homeostáticas e patológicas (BALMER *et al.*, 2014).

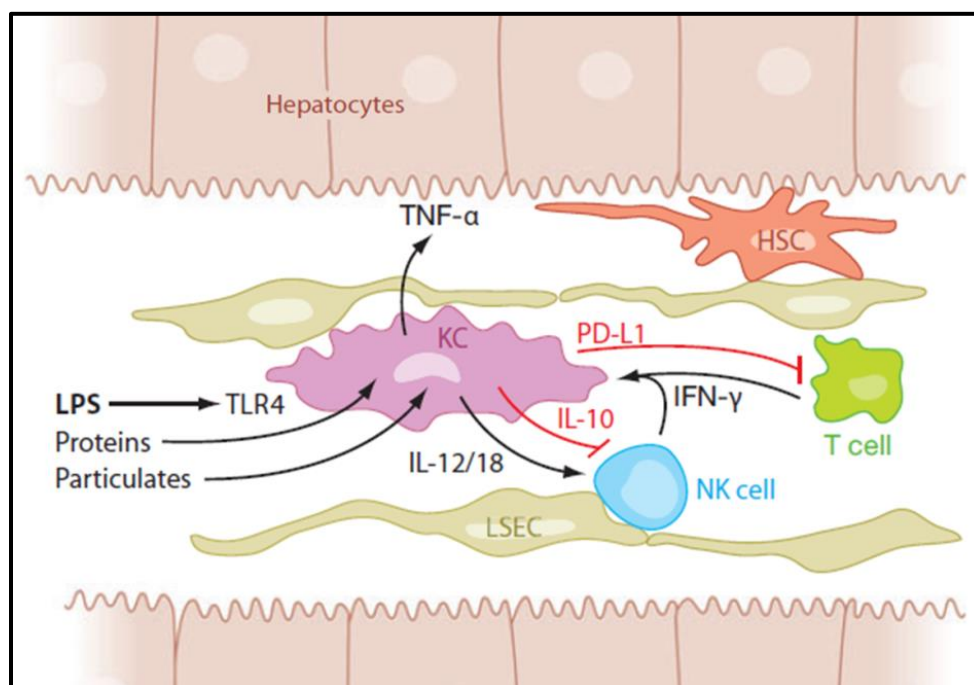


Ilustração 1 – Localização e interações entre populações celulares do lóbulo hepático

Cordões de hepatócitos são delimitados por capilares sinusóides, revestidos pelas células endoteliais sinusoidais (LSEC). No lúmen sinusoidal encontram-se as células de Kupffer (KC), capturando moléculas e microrganismos do fluxo sanguíneo lento, e modulando a atividade dos vários linfócitos presentes também no lúmen, como células NK e células T. Entre o endotélio e hepatócitos, no espaço de Disse, está a célula de Ito (HSC), o miofibroblasto hepático. Adaptado de (CRISPE, 2009).

O fígado também é rico em outras populações celulares como linfócitos T, *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT)(CRISPE, 2009). Assim como as KCs, estes linfócitos residem no lúmen sinusoidal, e estão associados à indução eficaz de tolerância imunológica e respostas anti-microbianas e anti-tumorais no fígado. Por exemplo, a apresentação de antígenos hepática em meio a altas concentrações de IL-10 e PGE₂ promove simultaneamente a inibição de linfócitos T citotóxicos e a proliferação de linfócitos T_{reg} (THOMSON & KNOLLE, 2010). Por outro lado, células NKT participam do controle de infecções por meio do patrulhamento ativo dos sinusóides, reconhecendo antígenos lipídicos apresentados por KCs e produzindo grandes quantidades de interferon gama (IFN γ)(GEISSMANN *et al*, 2005; LEE *et al*, 2010). O fígado também contém seu próprio miofibroblasto, chamado de célula de Ito ou célula estrelada, que se localiza no espaço de Disse, uma área microscópica entre as LSECs e os hepatócitos. A célula de Ito circunda os sinusóides com seus prolongamentos, onde regula o fluxo sanguíneo pela sua função contrátil (SAIMAN *et al*, 2013). As células de Ito armazenam vitamina A, apresentam antígenos durante infecções e secretam matriz extracelular, o que lhe confere um papel central no desenvolvimento de fibrose hepática (STEWART *et al*, 2014). Em suma, com suas diversas populações celulares, cada uma ocupando um nicho específico, o fígado pode ser considerado um órgão onde funções metabólicas e imunológicas indispensáveis ao organismo convergem entre si, como demonstrado na ilustração 1 (IL. 1).

Dessa maneira, as doenças que atingem o fígado tem grande importância médica e frequentemente colocam a vida de indivíduos em risco (BERNAL *et al*, 2010; SCHUPPAN & KIM, 2013). A falência hepática aguda (FHA), por exemplo, é uma doença caracterizada por lesão hepática rápida e grave, que leva a perda de função do fígado e a sintomas como encefalopatia, coagulopatia, descontrole metabólico, sepse, e falência múltipla de órgãos (BERNAL & WENDON, 2013). A FHA é geralmente desencadeada por lesão hepática induzida por infecções virais ou por medicamentos. Os vírus das hepatites A, B e E são os principais causadores de falência hepática em países em desenvolvimento, enquanto que a hepatite medicamentosa prevalece em países desenvolvidos (BERNAL *et al*, 2010). A incidência de lesão hepática por medicamentos (DILI) tem aumentado por todo o mundo, principalmente devido a melhores condições de saneamento básico e vacinação, mas também pelo crescente acesso da população a fármacos. Além disso, substâncias de classes tão diversas quanto antibióticos, antiepiléticos e anti-inflamatórios podem levar ao quadro de DILI, o que lhe confere um caráter

generalista e imprevisível. Destes, o paracetamol (APAP) é o protagonista do problema, sendo responsável sozinho por metade dos casos de FHA nos EUA e Reino Unido (BERNAL & WENDON, 2013). DILI atualmente é um problema grave não só por levar a FHA, mas também por causar a retirada de medicamentos do mercado, o que significa um grande prejuízo para agências governamentais e empresas farmacêuticas (VINKEN *et al*, 2013), além de reduzir o número de medicamentos disponíveis para doenças em geral.

Infelizmente, tratamentos para FHA são bastante escassos. Se a doença ainda estiver em um estágio inicial, intervenções a fim de limitar o dano tecidual podem ser realizadas junto à unidade de tratamento intensivo. N-acetilcisteína (NAC) é a terapia estabelecida para os casos de DILI, especialmente na intoxicação por APAP, no qual NAC é eficaz se aplicada dentro das primeiras 24 horas (SAITO *et al*, 2010). Além disso, é comum o tratamento com glicocorticóides em hepatites autoimunes (ICHAH *et al*, 2007), ou antivirais como lamivudina e aciclovir nos casos de hepatite infecciosa (KUMAR *et al*, 2007). Mesmo nestas condições, a sobrevivência dos pacientes frequentemente depende de um transplante hepático de emergência. Quando o transplante está disponível e é bem sucedido, ainda assim 20% dos pacientes não sobrevivem 1 ano após o procedimento (WIGG *et al*, 2005). Vale ressaltar que FHA é um transtorno raro, ocorrendo em cerca de 1 a 20 indivíduos a cada 100.000 habitantes. Entretanto, a altíssima mortalidade e custos financeiros associados à doença, bem como a ocorrência em indivíduos de qualquer faixa etária (SUK & KIM, 2012; BJORNSSON *et al*, 2013) a tornam um crescente problema de saúde pública.

Levando em conta o fardo econômico e médico representado por DILI e FHA, é de grande interesse que novas terapias sejam desenvolvidas, o que poderá reduzir a necessidade de hospitalização intensiva e de transplantes de fígado, e por consequência, a taxa de mortalidade. Ainda nesta linha, há uma grande lacuna no que se refere a tratamentos tardios para DILI, pois nessa etapa NAC oferece pouca eficácia terapêutica, levando pacientes a progredirem para FHA e necessitarem de transplante hepático para sobreviver (BERNAL *et al*, 2010). Desse modo, a investigação dos mecanismos da lesão hepática medicamentosa com a utilização de modelos experimentais pode oferecer uma direção valiosa no desenvolvimento de novas terapias. A DILI pode ser estudada experimentalmente em camundongos através da administração de uma sobredose de APAP (HINSON *et al*, 2010). Assim como em humanos, neste modelo o animal sofre lesão hepática extensa, desencadeada pelo excesso do metabólito de APAP chamado de N-

acetil-para-benzoquinonaimina (NAPQI), uma molécula extremamente reativa gerada por oxidação pelo citocromo P450. Em excesso, o metabólito NAPQI elimina os estoques celulares de glutatona (GSH) e se liga covalentemente a biomoléculas, desestabilizando mitocôndrias, membranas, citoesqueleto, os sistemas enzimáticos do hepatócito, e induzindo fragmentação de DNA e instabilidade genômica (RAY *et al*, 1993; HINSON *et al*, 2010). Esses eventos culminam na necrose de hepatócitos e perda da função hepática, o que pode levar à FHA e frequentemente à morte.

Enquanto que os processos bioquímicos envolvidos na toxicidade direta por APAP já são bem conhecidos, a relação entre DILI e o sistema imune começou a ser explorada recentemente. É interessante notar que mesmo na ausência de microrganismos no seu desenvolvimento, a lesão hepática medicamentosa possui um componente inflamatório bastante pronunciado. Trabalhos publicados nos últimos anos relataram que linfócitos NK e NKT (LIU, Z. X. *et al*, 2004; MASSON *et al*, 2008), neutrófilos (LIU, Z. X. *et al*, 2006) e até eosinófilos (PROCTOR *et al*, 2013) participam do desenvolvimento de DILI, pois animais que não possuíam estas células desenvolveram lesão hepática significativamente menor do que aquela observada em animais normais. Além de leucócitos, mediadores solúveis do sistema imune como uma variedade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (BLAZKA *et al*, 1995; HINSON *et al*, 2010) e o sistema do complemento (SINGHAL *et al*, 2012) tem sido associados à patogênese de DILI. Todos estes fatores, dentre outros, compõem um intenso processo inflamatório no fígado lesado, que pode levar ao agravamento do dano tecidual (ROCK *et al*, 2010).

À medida que o processo inflamatório se desenvolve, vários leucócitos são recrutados para o fígado, mas em casos de inflamação aguda como na necrose hepática, neutrófilos são os primeiros a serem recrutados e migram em grande número (MCDONALD *et al*, 2010; MARQUES *et al*, 2012). Várias moléculas capazes de causar a migração de neutrófilos já são conhecidas, como as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (homólogos murinos da CXCL8 humana), o fator do complemento C5a e leucotrieno B4 (ZLOTNIK *et al*, 2006; BORREGAARD, 2010). Entretanto, os mediadores envolvidos no recrutamento de neutrófilos para zonas de necrose hepática foram descritos recentemente em detalhe. Ao adentrarem o fígado, neutrófilos migram pelos sinusóides sob o estímulo de um gradiente das quimiocinas CXCL1 e CXCL2, as quais são reconhecidas pelo receptor CXCR2 expresso constitutivamente em neutrófilos. Mas, ao atingirem a borda da necrose hepática eles passam a utilizar o receptor FPR1, que é ativado por peptídeos

formilados oriundos de mitocôndrias dos hepatócitos mortos, e promove a migração dos neutrófilos para o interior da zona de necrose (MCDONALD *et al*, 2010) (IL. 2). Uma vez que neutrófilos cheguem ao sítio alvo, eles podem executar funções efetoras como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), desgranulação (liberação de peptídeos e enzimas granulares) ou formação de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) (BRINKMANN *et al*, 2004), promovendo a amplificação da lesão tecidual como já descrito em outras doenças de caráter inflamatório, como gota, artrite e infarto (CHEN & NUNEZ, 2010; ROCK *et al*, 2010).

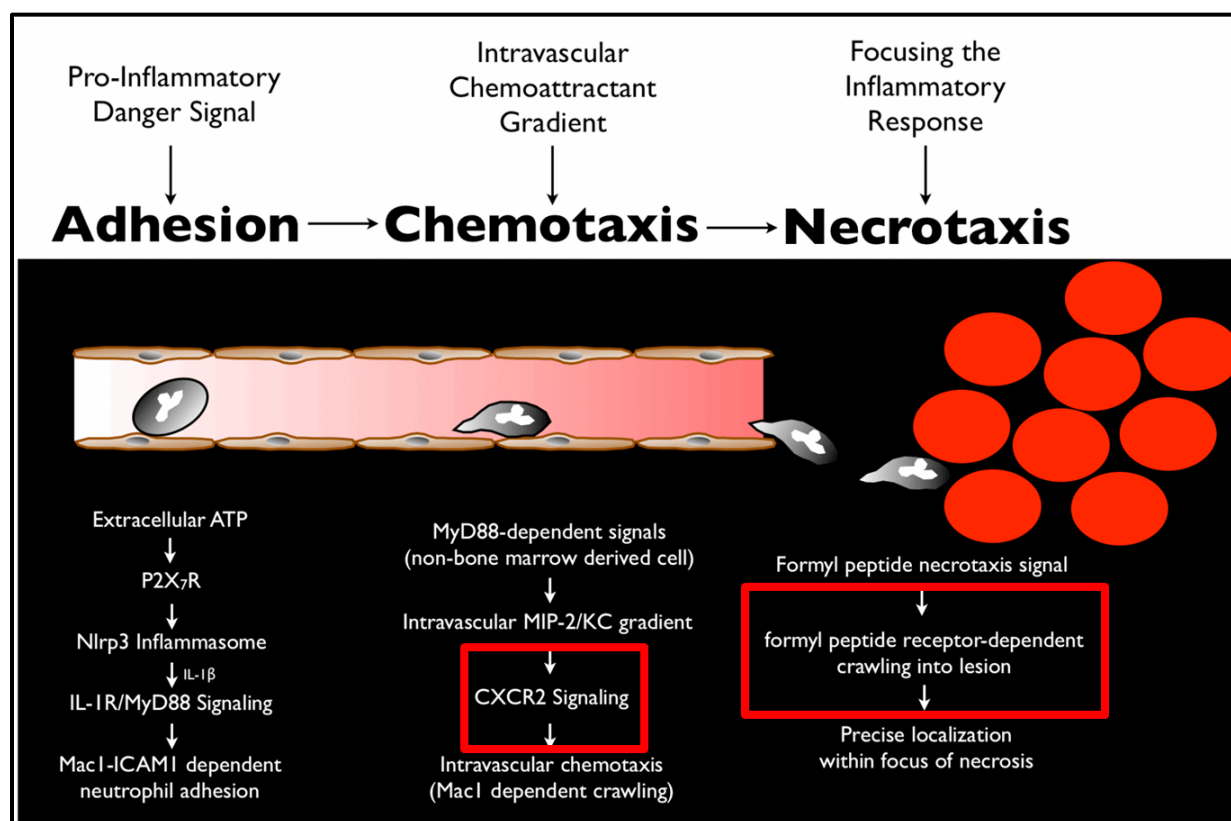


Ilustração 2 – Mediadores e receptores envolvidos no recrutamento de neutrófilos para a lesão hepática estéril

Neutrófilos adentram o fígado e interagem com o endotélio sinusoidal já estimulado pela liberação local de mediadores pró-inflamatórios. A quimiotaxia de neutrófilos procede com o reconhecimento pelo receptor CXCR2 de um gradiente intravascular de quimiocinas. Na periferia da zona necrótica, neutrófilos passam a priorizar a sinalização pelo receptor FPR1, que ativado por peptídeos formilados mitocondriais liberados pelos hepatócitos mortos, encaminha neutrófilos para o interior da necrose. Adaptado de (MCDONALD *et al*, 2010).

A indução do processo inflamatório durante a DILI ganhou muita atenção com a descoberta de uma nova classe de moléculas denominadas DAMPs: padrões moleculares

associados a dano. DAMPs são moléculas endógenas de natureza química e tamanho variados, podendo ser liberados por virtualmente qualquer tipo celular quando encontrado sob estresse ou em processo de morte (CHEN & NUNEZ, 2010). Com a instabilidade de organelas e da membrana plasmática, os constituintes internos são expostos ao meio extracelular onde estimulam uma série de receptores nas células vizinhas, sejam elas do parênquima ou leucócitos residentes, promovendo a ativação do sistema imune (GREEN, 2011). Alguns dos exemplos mais conhecidos de DAMPs são proteínas nucleares como histonas e *high-motility group box 1* (HMGB1); proteínas citoplasmáticas como actina e proteínas do choque térmico (HSP); intermediários do metabolismo de purinas como ácido úrico e ATP; componentes da matriz extracelular como o ácido hialurônico; e até os próprios peptídeos formilados mitocondriais citados acima (ROCK *et al*, 2010). Dentre estes, DNA de origem nuclear ou mitocondrial é um dos DAMPs mais bem descritos, pois atua como potente indutor de inflamação e está envolvido em uma série de doenças autoimunes e inflamatórias, como lúpus sistêmico eritematoso (BARRAT *et al*, 2005; PALUDAN & BOWIE, 2013).

O reconhecimento destas moléculas é feito por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Originalmente, PRRs foram descritos como detectores de padrões moleculares típicos de microrganismos (PAMPs), mas à medida que a participação dos mesmos PRRs foi demonstrada em doenças de etiologia estéril, como a DILI, percebeu-se eles podem ser ativados tanto por PAMPs quanto por DAMPs. Isto explicaria porque a resposta inflamatória a microrganismos ou à lesão estéril é tão similar, envolvendo inclusive os mesmos leucócitos, citocinas, e até os mesmos mecanismos efetores (ROCK *et al*, 2010). Existem várias classes de PRRs, dentre elas podemos dar destaque a: Receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG-I (RLR) e receptores de lectina tipo C (CLR) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Considerando estas informações, a determinação dos DAMPs relevantes para a lesão hepática e de estratégias para bloquear sua atividade ou reconhecimento pelo sistema imune poderiam por si só representar novos alvos terapêuticos para DILI e FHA. Como a lesão hepática por APAP é um modelo de lesão estéril bem estabelecido, ele tem sido usado como plataforma para o estudo e descoberta de novos DAMPs por vários grupos de pesquisa (ANTOINE *et al*, 2010; CAI *et al*, 2014). Um exemplo é a proteína citoplasmática ciclofilina A, conhecida por interagir com fármacos da classe das ciclosporinas, mas agora descrita como um novo DAMP usando o modelo de DILI por APAP (DEAR *et al*, 2011). Além disso, camundongos deficientes

em componentes da via de sinalização de NLRP3, um receptor de padrões da classe NLR, tem uma taxa de mortalidade significativamente menor quando desafiados com sobredose de APAP (IMAEDA *et al*, 2009). Quando o receptor NLRP3 é ativado, ele reúne um complexo proteico chamado inflamassoma, que inicia a produção das citocinas interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18, potentes indutores do processo inflamatório. De modo similar, vários TLRs estão associados à patogênese de DILI por promoverem a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF α (fator de necrose tumoral alfa), a produção de ROS, e a maior sobrevivência de leucócitos (GEERING *et al*, 2013). Recentemente foi demonstrado que o reconhecimento de proteínas citoplasmáticas S100 (MOLES *et al*, 2014) ou histonas (XU *et al*, 2011) pelo receptor TLR2 estimula a inflamação e lesão hepática durante a intoxicação por APAP. Do mesmo modo, a ligação de HMGB1 ou histonas ao receptor TLR4 exacerba a lesão hepática e mortalidade associada à DILI (WANG *et al*, 2013).

Neste contexto, a participação do receptor TLR9 também foi explorada por alguns grupos, que observaram que a ativação de TLR9 por DNA nuclear ou mitocondrial é determinante para a severidade de DILI. Em 2009, Imaeda e colaboradores avaliaram o papel de TLR9 e do inflamassoma NLRP3 na lesão hepática por APAP, e observaram que camundongos deficientes em TLR9 ou nos componentes do complexo NLRP3 tinham menor expressão de citocinas pró-inflamatórias e maior porcentagem de sobrevivência após o desafio com APAP. De maneira similar, foi subsequentemente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (MARQUES *et al*, 2012) e outros (MCGILL *et al*, 2012) que durante a lesão hepática por APAP uma grande quantidade de DNA mitocondrial é liberada pelo fígado necrótico. Nós expandimos estes dados demonstrando que o reconhecimento de DNA por TLR9 é essencial para a produção dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF α , CXCL1 e CXCL2, e também para o recrutamento de neutrófilos para o fígado. Além disso, observamos que a liberação de DNA mitocondrial, dentre outros DAMPs, é tão intensa que chega a causar inflamação remota em outros órgãos, como os pulmões, ressaltando o potente papel do DNA como ativador da resposta inflamatória (IL. 3).

O grande conteúdo de DNA do hepatócito e dados de vários grupos de pesquisa indicando seu papel pró-inflamatório sugerem que o extravasamento de DNA durante a necrose hepática pode ser um fenômeno fundamental na indução de inflamação e agravamento da DILI. Entretanto, pouco se sabe sobre como acontece a liberação do DNA de fato durante a lesão hepática *in vivo*. Para isso, a técnica de microscopia intravital (IVM) permitiria a avaliação de

fenômenos celulares e imunológicos em tempo real e nas condições fisiológicas originais. Ainda nesta linha, as populações celulares capazes de detectar o DNA liberado e que são diretamente afetadas pelo seu extravasamento permanecem indeterminadas. Uma vez que células como hepatócitos, KCs ou mesmo neutrófilos recrutados sejam capazes de reconhecer o DNA liberado, o receptor utilizado para o seu reconhecimento e as consequências ao fenótipo celular incluindo morfologia, movimentação, alterações na transcrição gênica e indução de mecanismos efetores ainda não são bem conhecidas. Em suma, definindo precisamente os mecanismos de liberação, reconhecimento de DNA e os leucócitos envolvidos na indução de inflamação hepática, poderemos determinar novos alvos terapêuticos para a DILI e FHA.

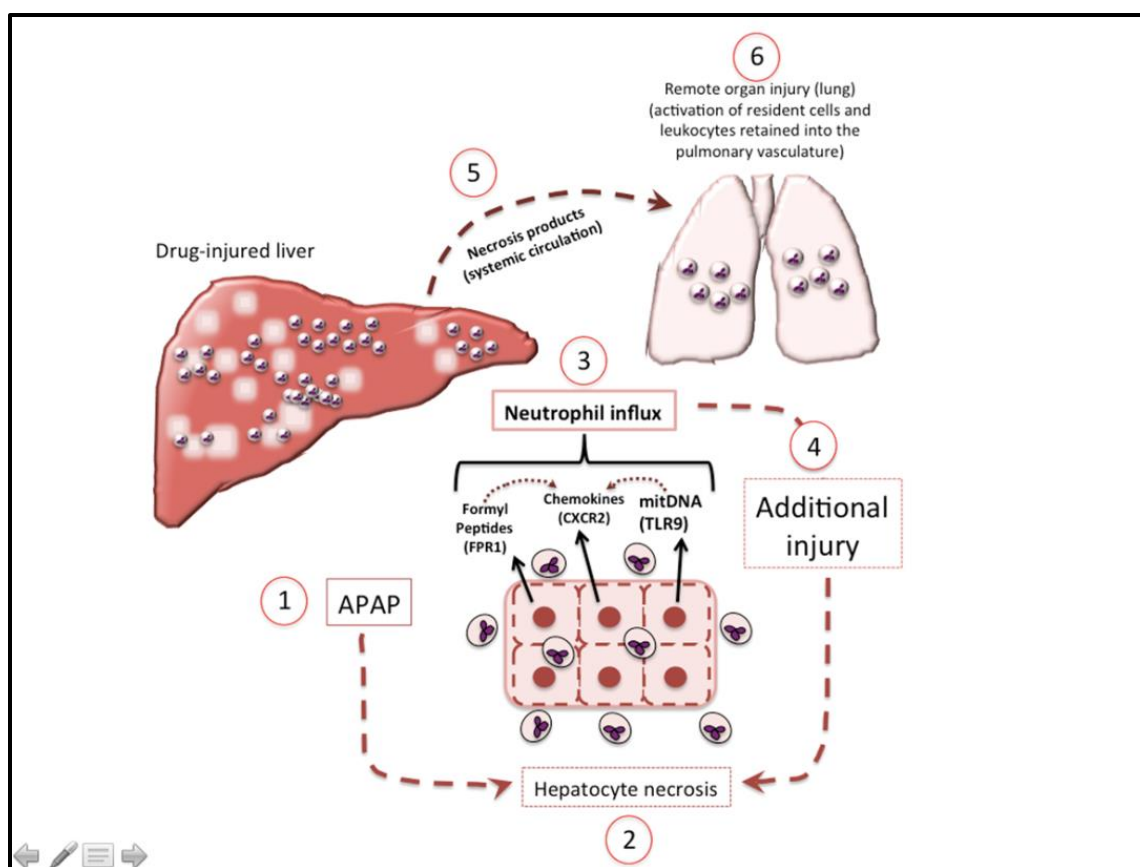


Ilustração 3 – Liberação de produtos mitocondriais e quimiocinas pelo fígado necrótico promove amplificação do dano hepático local e inflamação remota nos pulmões.

(1) A intoxicação por APAP causa (2) necrose hepática e liberação de moléculas como DNA mitocondrial, peptídeos formilados e quimiocinas pelo fígado. Isto causa um (4) intenso processo inflamatório que envolve o (3) acúmulo de neutrófilos e (4) agravamento da lesão hepática. A liberação destes mediadores pode ser grande a ponto de atingir a (5) circulação sistêmica e promover (6) inflamação remota nos pulmões. Adaptado de (MARQUES *et al*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do extravasamento de DNA durante a lesão hepática medicamentosa e seu impacto na inflamação e amplificação do dano tecidual

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a cinética da necrose celular induzida por APAP *in vitro*, usando hepatócitos primários de camundongo
2. Observar as alterações na morfologia e distribuição de DNA em hepatócitos incubados com APAP
3. Analisar a necrose e a liberação de DNA *in vivo* durante a intoxicação por APAP em camundongos
4. Determinar os leucócitos envolvidos na resposta inflamatória decorrente da necrose hepática e os mediadores que estimulam seu recrutamento ao fígado
5. Avaliar o impacto imunológico da deposição de DNA no fígado e seu reflexo na gravidade da lesão hepática induzida por medicamento

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS

A purificação de hepatócitos de camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente (CRUZ *et al*, 2010; AMARAL *et al*, 2013). Resumidamente, camundongos foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80mg/kg; Syntec) e xilazina (15mg/kg; Syntec) e submetidos a uma laparotomia para exposição do fígado e de seus vasos sanguíneos. A porção inferior da veia cava foi canulada com um cateter 16G e o fígado perfundido com as soluções-tampão Hanks A e Hanks B, contendo Colagenase tipo VII (800mg/l; Sigma-Aldrich). O fígado foi então removido e picado em meio de cultura Williams E (Sigma-Aldrich) em condição asséptica. A suspensão resultante foi filtrada duas vezes em membrana de nylon e centrifugada a 840 x g, 4°C, por 2 minutos. O *pellet* de células foi ressuspenso em meio Williams, contado em câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi checada usando o método de exclusão de azul de trypan. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade final de 5×10^5 ou em lamínulas 22mm x 22mm a densidade de 3×10^5 , ambos previamente tratados com colágeno tipo-I (Sigma-Aldrich).

Os hepatócitos foram incubados por 30 minutos a 37°C antes do início dos experimentos. Os tratamentos incluíram: Paracetamol (APAP; Sigma-Aldrich) na concentração de 20 ou 40mM; Staurosporina (Calbiochem) a 10µM por 6 horas; Tioacetamida (TAA, Sigma-Aldrich) a 70mM por 4h. Poly I:C (Invivogen) a 100µg/ml por 4 horas. Amostras de RNA total de hepatócitos foram coletadas usando o reagente TRIzol (Ambion). A viabilidade dos hepatócitos foi verificada através do ensaio de metabolismo de MTT (Sigma-Aldrich). A quantificação de DNA no meio de cultura foi feita em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

3.2 COLORAÇÃO POR FEULGEN

Os hepatócitos foram fixados com paraformaldeído a 4% e o DNA foi hidrolisado em solução de HCl 1N por 30 minutos a 65°C. Em seguida, as células foram coradas com o reagente de Schiff por 30 minutos, lavadas em solução de bisulfito e contra-coradas com 1% *light green*. Por fim, as células foram lavadas com água destilada, desidratadas e montadas. A quantificação

foi feita através da contagem de células apresentando estruturas no citoplasma positivas para Feulgen, em um total de 200 células por lâmina.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os hepatócitos foram retirados das placas por tripsinização, centrifugados a 840 x g, 4°C, por 2 minutos e fixados em glutaraldeído 4% tamponado. O *pellet* foi embebido em agarose 2%, cortado e desidratado em álcool e acetona. Os cortes obtidos foram embebidos em resina Epon-812 e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão do Centro de Microscopia da UFMG.

3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após os tempos indicados, os hepatócitos foram fixados em paraformaldeído 4%, permeabilizados com PBS/Triton 0.5% e bloqueados com PBS contendo BSA 10% e soro de cabra 5% por 12 horas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-lamina A (1:200; Sigma-Aldrich) ou anti-IRF3 (1:200; Santa Cruz) e incubadas com anticorpos secundários conjugados a Alexa-Fluor 488 (1:200; Molecular Probes) e iodeto de propídeo (PI, 30µM; Sigma-Aldrich) por 1 hora. As imagens foram obtidas usando microscópios confocais Nikon Ti C2 e Zeiss LSM 510 Meta, equipados com objetivas 63x. O perfil de fluorescência linear foi obtido usando o *software* ImageJ. Brevemente, uma linha foi traçada através do hepatócito e de seus núcleos, e a intensidade dos pixels de cada canal foi obtida e plotada.

3.5 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, a partir de quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA protocolo 051/11) e da University of Notre Dame (IACUC 16/024). Também utilizamos camundongos que

expressam a proteína verde fluorescente eGFP apenas em seus neutrófilos (Lysm-eGFP); deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}); e que não possuem pelos no corpo (SKH1-hr) (BENAVIDES *et al*, 2009). Estes últimos foram especificamente utilizados nos experimentos de imagem não-invasiva.

3.6 O MODELO DE LESÃO HEPÁTICA

Os camundongos foram submetidos a jejum de 15 horas na noite anterior ao experimento e então tratados com APAP, por via oral, dissolvido em salina estéril aquecida (150-600mg/kg). Animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Em um conjunto separado de experimentos, camundongos receberam duas injeções i.p. de TAA na dose de 300mg/kg. As injeções foram aplicadas com 24 horas de intervalo, e os animais sacrificados no tempo 48h após a primeira injeção. Para a coleta de amostras, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de ketamina e xilazina e submetidos a uma laparotomia. O sangue foi coletado para obtenção do soro e o fígado foi retirado e dividido em fragmentos para a realização de histologia (H&E) e ensaios bioquímicos. Em um dos experimentos, a porcentagem de sobrevivência dos animais foi avaliada até o oitavo dia após a intoxicação.

Para determinar a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro utilizamos o kit transaminase ALT cinético (Bioclin). O ensaio cinético é o método recomendado pela *International Federation of Clinical Chemistry*. Também quantificamos no soro dos camundongos a produção da citocina TNF- α e da quimiocina CXCL1 utilizando kits de ELISA comerciais (R&D Systems). A atividade de mieloperoxidase (MPO) hepática foi avaliada através da reação de extratos de fígado com o substrato TMB. As absorbâncias obtidas a 450 nm foram comparadas a uma curva-padrão de MPO de neutrófilos coletados da cavidade peritoneal, e os dados foram apresentados como número de neutrófilos relativo a essa curva (PIRES *et al*, 2014). A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) foi feita pela reação de homogenatos de fígado com o substrato DTNB, como descrito anteriormente (TIETZE, 1969).

3.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO

Os fígados foram lavados com salina e seu lobo inferior foi fixado em formol 4% tamponado. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo e corados com hematoxilina & eosina. A visualização dos cortes foi feita no microscópio óptico BX41 (Olympus) e as imagens obtidas utilizando a câmera Moticam 2500 (Motic) e o *software* Motic Image Plus 2.0ML.

3.8 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E ANTICORPOS

Os tratamentos farmacológicos foram: Desoxiribonuclease 1 (DNASE1; Sigma-Aldrich) administrada por via intravenosa (i.v.; 1000 U/dose) nos tempos 6, 12 e 18 horas após APAP. E6446-02 (2.5mg/animal, Merck Millipore) administrado 2 horas antes ou 6 horas após APAP, por via oral. Os seguintes tratamentos foram aplicados 6 e 18 horas após a intoxicação: Ciclosporina H (30µg/dose, LKT Laboratories), hialuronidase (HNase; 200U/dose, Sigma), anticorpo anti-CXCR2 (30µg/dose, R&D Systems) e anticorpo anti-CD18 (20µg/dose, R&D Systems). A eliminação de neutrófilos foi feita por duas injeções i.v. de anticorpo anti-GR1 (100µg/dose, clone RB6-8C5; eBioscience), 24 e 4 horas antes do experimento. A eliminação de células de Kupffer foi feita por uma injeção i.v. de 200µl de clodronato em liposomos (ClodronateLiposomes.org) 48h antes do experimento. Todos os reagentes foram dissolvidos em salina ou PBS estéreis, e grupos controle foram tratados com os respectivos veículos das drogas.

3.9 AQUISIÇÃO DE IMAGEM NÃO INVASIVA

Para experimentos não invasivos de aquisição de imagens, os camundongos SKH1-*hairless* foram anestesiados com isoflurano e injetados i.v. com 100µl do fluoróforo para ácidos nucleicos NucRed Dead 647 (Molecular Probes). As imagens foram adquiridas após um intervalo de 5 minutos no aparelho MS FX PRO (Bruker) com o auxílio do Prof. W. Matthew Leevy, na *Integrated Imaging Facility*, da Universidade de Notre Dame (Indiana, EUA).

3.10 MICROSCOPIA INTRAVITAL CONFOCAL

A microscopia intravital confocal (IVM) de fígado de camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente (MARQUES *et al*, 2012), utilizando microscópios confocais Olympus Fluoview ou Nikon Ti C2 equipados com objetivas 10x. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados e seu fígado exposto em um suporte de acrílico compatível com os microscópios. Antes da aquisição de imagens, os camundongos foram injetados i.v. com 100µl dos seguintes fluoróforos: Sytox Green (1µM, Invitrogen), rodamina 6G (0.5mg/ml; Sigma-Aldrich), PI (100µM, Sigma-Aldrich), anticorpo anti-GR1 conjugado a PE ou FITC (40µg/ml, eBioscience), anti-F4/80 conjugado a PE (40µg/ml, eBioscience). Anti-elastase (Santa Cruz) foi conjugado usando um kit de conjugação Alexa-555 (Molecular Probes) e usado na dose de 200µg/ml. Em alguns experimentos, DNA foi eliminado por uma injeção i.v. de 1000 U de DNASE1. As quantificações de DNA extracelular e necrose hepática foram feitas usando o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Contagens de neutrófilos e seus parâmetros de movimentação (*tracking*) foram feitos usando o programa Velocity (PerkinElmer).

3.11 CAMUNDONGOS TRATADOS COM ANTIBIÓTICOS

Camundongos foram tratados por quatro semanas com a seguinte mistura de antibióticos: ampicilina (2g/l), vancomicina (0.5g/l), neomicina (2g/l), metronidazol (1g/l), e ciprofloxacino (0.2g/l). Os antibióticos foram administrados continuamente na água disponibilizada aos animais. As fezes dos camundongos foram plaqueadas em agar BHI e tioglicolato para avaliação da redução da microbiota. Os experimentos com esses animais foram feitos após o momento em que a presença de bactérias se tornou indetectável nas culturas. Em outro conjunto de experimentos, o sangue e homogenatos de fígado de camundongos também foram coletados e plaqueados em agar comum ou BHI para verificação de translocação bacteriana.

3.12 PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE DE RNA 16S

O DNA total de soro e fígado foi extraído usando o kit de purificação de DNA genômico (Thermo Scientific). O PCR em tempo real foi feito em um 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os seguintes pares de *primers* foram utilizados: 18S ribossomal murino RNA, 5'-CGT TCC ACC AAC TAA

GAA CG-3' (forward) e 5'-CTCAACACGGGAAACCTC AC-3' (reverse); 16S ribossomal (*conserved, Eubacteria*). 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT-3' (forward) e 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GGC-3' (reverse).

3.13 EXTRAÇÃO DE DNA DE FÍGADO DE CAMUNDONGO

Camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seus fígados foram homogeneizados em 20ml de PBS usando o aparelho Omni TH (Omni International). Um volume equivalente de uma mistura 1:1 fenol/clorofórmio foi adicionado ao tubo. A mistura foi agitada e centrifugada a 7000 x g por 15 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi removida e o tubo recebeu mais 20ml de clorofórmio para uma nova rodada de agitação e centrifugação. A fase aquosa resultante foi recuperada e adicionada a um volume equivalente de etanol, misturada, e centrifugada para a obtenção do *pellet* de DNA. O DNA foi ressuspendido em água destilada e armazenado a 4°C até o momento de uso. A concentração da solução de DNA, assim como as razões proteína/DNA e solvente/DNA foram determinadas em um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O DNA também foi avaliado em gel de agarose 1% (SERVA) para confirmação de integridade.

3.14 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DNASE DO SORO DE CAMUNDONGO

Amostras de soro de camundongos e humanos foram coletadas e rapidamente congeladas para checagem da sua capacidade de clivar DNA. Resumidamente, 14µg de DNA de fígado foram incubados com 2.5µl de soro e tampão Tris-EDTA até o volume total de 50µl, por 15 minutos a 37°C. Após esse período, as amostras foram armazenadas em gelo, transferidas para um gel de agarose 1% e corridas por 120 minutos a 100V (Thermo Scientific). O gel foi corado com Gel Red (Uniscience), visualizado em iluminação UV e fotografado para avaliação. Utilizamos o padrão de peso molecular 1kb (Fermentas) e como controle positivo, 2U de DNASE1 comercial. Em um dos experimentos, fizemos a desnaturação térmica dos soros por 30 minutos a 70°C. A utilização de alíquotas de soro humano, saudável ou FHA, foi consentida formalmente pelos indivíduos e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP - 2012) e pela Fiocruz (CEP-FIOCRUZ 22/03).

3.15 NEUTRÓFILOS DE MEDULA ÓSSEA

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e seus fêmures e tíbias foram extraídos. Os músculos adjacentes foram retirados e as pontas dos ossos removidas para que 2ml de meio de cultura RPMI (Cultilab) fossem injetados dentro da cavidade óssea. A suspensão foi coletada, filtrada em uma membrana de 70µm, centrifugada e ressuspensa em RPMI. Hemácias remanescentes foram eliminadas pela adição de 12ml de água destilada a suspensão celular, seguida de 4ml de 0.6M KCl. Em seguida, as células foram depositadas sobre 3ml de Ficoll-Paque (GE Healthcare) e centrifugadas. O *pellet* resultante foi ressuspensa em RPMI e plaqueado em placas de 6 poços a uma densidade de 1×10^5 neutrófilos por poço. Neutrófilos foram incubados com DNA de fígado de camundongo na concentração de 5 ou 50µg/ml por 4 horas, após isso o RNA total foi extraído usando o reagente TRIzol.

Em um conjunto separado de experimentos, realizamos uma transferência adotiva de neutrófilos purificados de medula através de uma injeção i.v. de 4×10^6 neutrófilos por camundongo, 6 horas após o desafio com APAP (MCDONALD *et al*, 2010). Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a intoxicação para coleta de soro e fígado.

3.16 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Amostras de 2µg de RNA total isoladas de neutrófilos e hepatócitos foram submetidas a transcrição reversa usando M-MLV (Promega). Os cDNAs resultantes foram amplificados por PCR em uma mistura Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix e um aparelho ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Curvas de *melting* foram usadas para verificar especificidade de produtos. A expressão gênica relativa foi determinada pelo método de comparação do *cycle threshold* (Ct), onde as amostras foram normalizadas à GAPDH e representadas como expressão relativa ao grupo controle. Os *primers* murinos foram: IFN-β: forward 5'- CAT CAA CTA TAA GCA GCT CCA -3', reverse 5'- TTC AAG TGG AGA GCA GTT GAG -3'; IκB-α: forward 5'- CTG CAG GCC ACC AAC TAC AA -3', reverse 5'- CAG CAC CCA AAG TCA CCA AGT -3'; ISG54 forward: 5'- ATG AAG ACG GTG CTG AAT ACT AGT GA -3', reverse 5'- AAC CCA GAG TGT GGC TGA TG -3'; IFN-α4: forward 5'- CCT GTG TGA TGC AGG AAC C -3', reverse 5'- TCA CCT CCC AGG CAC TGA; CXCR2 forward: 5'- CCC AGA GTT TAG AAC

CCC CTA TAT T -3'; GAPDH: forward 5'- CGA CTT CAA CAG CAA CTC CCA CTC -3', reverse 5'- CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA TTC -3'.

3.17 CITOMETRIA DE FLUXO DE LEUCÓCITOS HEPÁTICOS

Para a obtenção de leucócitos hepáticos, camundongos foram anestesiados e seus fígados perfundidos com 3ml de PBS através da veia porta. Após isso, o fígado foi removido, picado, e digerido com colagenase tipo 8 (1mg/ml; Sigma-Aldrich) e DNASE (1µg/ml, Sigma-Aldrich) sob agitação, a 37°C, por 20 minutos. A suspensão foi filtrada a 70µm (Becton-Dickinson), lavada com PBS/BSA 2% e centrifugada por 30 minutos. O *pellet* de células foi lavado novamente e centrifugado em Percoll 36% (Sigma-Aldrich). Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas, e as hemácias lisadas usando solução de cloreto de amônio (ACK). A viabilidade foi checada usando azul de trypan e a concentração de células ajustada a 1×10^6 células/ml. Os anticorpos utilizados foram: anti-TLR9 conjugado a FITC (clone M9.D6), anti-GR1 conjugado a PE (clone RB6.8C5), e anti-CD11b conjugado a PECy5 (clone M1/70). Todos os anticorpos foram obtidos da eBioscience e aplicados por 30 minutos nas amostras. Não houve permeabilização das células em nenhuma etapa deste procedimento. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 2% e lidas em um citômetro FACS-CantoII (Becton-Dickinson). Utilizamos o programa FlowJo (Tree Star) para a análise dos resultados. Após as medidas, as células foram adicionadas a lâminas histológicas e visualizadas ao microscópio confocal.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste foi one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. No caso de os dados não possuírem distribuição normal, o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunn foram aplicados. Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm), e são referentes a pelo menos dois experimentos independentes, contendo no mínimo 3 replicatas (*in vitro*) ou 4 animais (*in vivo*). O nível de significância foi definido como $p < 0.05$. Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.

4 RESULTADOS

4.1 APAP CAUSA PERDA DE VIABILIDADE CELULAR E ACÚMULO ABERRANTE DE DNA NO CITOPLASMA DE HEPATÓCITOS

Estudos mais detalhados sobre os processos de morte celular requerem experimentos com tipos celulares específicos e condições controladas. Desse modo, padronizamos um método de purificação de hepatócitos de camundongo e utilizamos essa preparação para avaliar os efeitos citotóxicos e morfológicos da incubação com APAP. Na figura (FIG) 1A podemos observar que APAP causa perda de viabilidade dos hepatócitos primários nas concentrações de 20 e 40mM, sendo que a perda se inicia a partir de 6 horas e atinge valores máximos 18 horas após a incubação. Buscando responder como seria o manejo e compartimentalização do DNA em hepatócitos intoxicados, e lembrando que durante a lesão por APAP ocorre instabilidade genômica e fragmentação de DNA (RAY *et al*, 1993; BAJT *et al*, 2006), incubamos hepatócitos com APAP (20mM) e avaliamos a distribuição de DNA nas células pela coloração de Feulgen, que evidencia este ácido nucleico em roxo. Observamos que APAP induziu um acúmulo aberrante de DNA no citoplasma dos hepatócitos, aparentemente contido dentro de vesículas (FIG. 1B). Este DNA aberrante foi encontrado tanto próximo ao núcleo quanto na periferia celular. Avaliação dos hepatócitos incubados com APAP ao microscópio eletrônico de transmissão confirmou o extravasamento de DNA para vesículas no citoplasma e demonstrou que o conteúdo destas vesículas é um material com morfologia similar à de cromatina, ou seja, DNA associado a histonas (FIG. 1C).

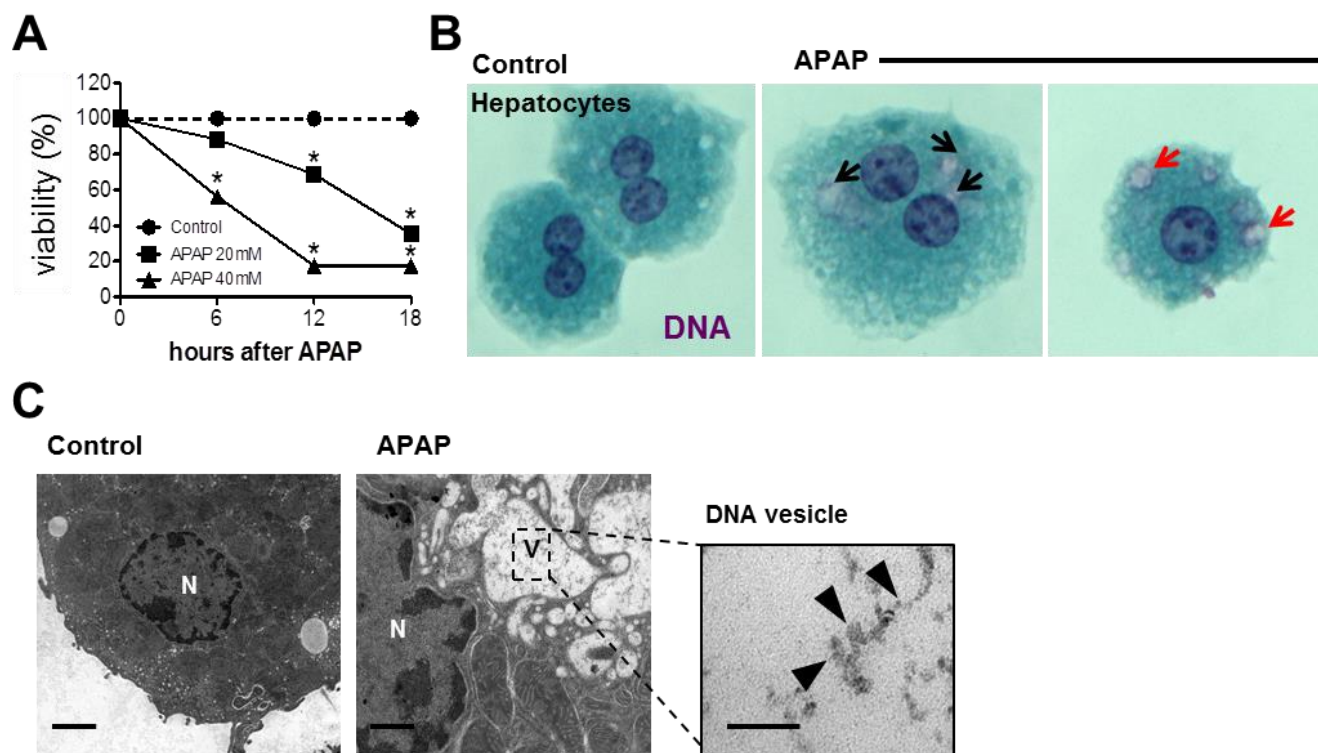


Figura 1 – A toxicidade por APAP causa acúmulo de DNA no citoplasma de hepatócitos

(A) Redução da viabilidade celular de hepatócitos primários de camundongo por doses crescentes de APAP (20 e 40mM), avaliada pelo método de MTT. (B) Hepatócitos primários corados pela técnica de Feulgen, demonstrando acúmulo de DNA (roxo) citoplasmático induzido por incubação com APAP por 4 horas. As vesículas contendo DNA encontram-se tanto na proximidade do núcleo (setas pretas) quanto na periferia celular (setas vermelhas). (C) Microscopia eletrônica de transmissão de hepatócitos comprovando o acúmulo de vesículas no citoplasma. Em grande aumento, observa-se um material similar a cromatina dentro destas vesículas; (N) = núcleo. Escalas em C: 2 μ m no controle, 0,5 μ m em APAP e 0,1 μ m no inserto. * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.2 DNA ABERRANTE EM HEPATÓCITOS É PROPORCIONAL AO DANO INDUZIDO POR APAP E EXTRAVASA PARA O MEIO EXTRACELULAR

Em vista deste fenômeno de DNA aberrante em resposta a APAP, buscamos outros métodos de visualização para validá-lo e explorá-lo. A incubação dos hepatócitos com anticorpo anti-lamina-A para evidenciar os envelopes nucleares e um corante fluorescente (fluoróforo) estabelecido para DNA, o iodeto de propídeo (PI), demonstrou que o DNA citoplasmático aberrante pode ser observado e mensurado por técnicas convencionais de fluorescência (FIG. 2A). Confirmamos mais uma vez que o material acumulado é de fato DNA, pois é corado por PI, e que o acúmulo realmente ocorre no citoplasma, pois encontramos picos de sua fluorescência vermelha fora da região nuclear dos hepatócitos lesados, evidenciada em verde. Também observamos que a toxicidade por APAP está relacionada à diminuição do diâmetro celular em cerca de 15 μ m (FIG. 2A), o que corrobora as alterações morfofuncionais já descritas na literatura. De modo interessante, o número de células contendo DNA aberrante é diretamente proporcional à concentração de APAP no meio, ou seja, ao dano celular causado (FIG. 2B). Por fim, este processo que inicia como uma lesão tóxica e progride para dano genômico e DNA aberrante, acaba culminando no extravasamento de DNA para o meio extracelular, avaliado pela maior concentração deste ácido nucleico no meio de cultura dos hepatócitos 6 horas após APAP (FIG 2C).

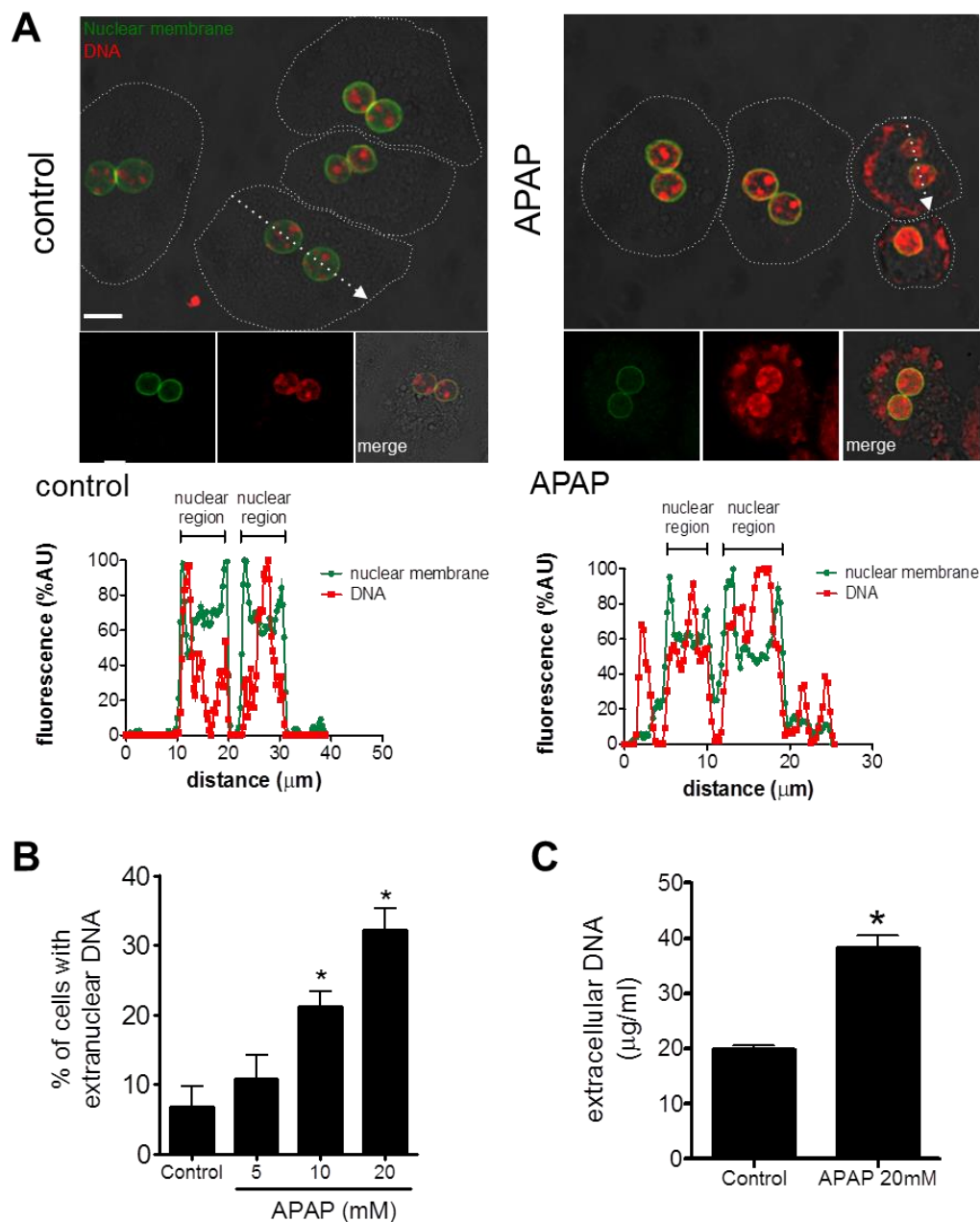


Figura 2 – Acúmulo de DNA aberrante induzido por APAP é dose-dependente e culmina na liberação de DNA para o meio extracelular

(A) Imunofluorescência de hepatócitos corados com PI e anti-lamina-A para evidenciar DNA e núcleos, respectivamente. Os hepatócitos foram incubados por 4 horas com APAP a 20mM. Morfometria e DNA aberrante (vermelho) foram quantificados em compartimentos celulares usando o programa ImageJ. (B) Contagem do número de hepatócitos (% do total) apresentando acúmulo de DNA citoplasmático em resposta a APAP (0-20mM; 4 horas). (C) Liberação de DNA para o meio extracelular 6 horas após incubação com APAP, medida por fluorescência pelo corante para DNA Sytox green no meio de cultura. Escala: 10 μm ; * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.3 PARTE DO DNA ABERRANTE ESTÁ CONTIDA EM VESÍCULAS QUE POSSUEM PROTEÍNAS DO ENVELOPE NUCLEAR

Os hepatócitos são células bastante ricas em DNA, seja ele originado de núcleos ou mitocôndrias. Os resultados anteriores sugerem que ele poderia ser originado do núcleo, então realizamos um experimento para verificar se o DNA estaria associado a proteínas nucleares. Utilizando a mesma técnica de imunofluorescência com PI e anticorpo anti-lamina-A, uma proteína exclusiva do envelope nuclear, observamos que existem vesículas de DNA associadas a proteínas do núcleo. Elas foram vistas acumulando-se no citoplasma e até mesmo sendo liberadas para fora da célula (FIG. 3). Entretanto, essa co-localização acontece em apenas uma pequena porcentagem das células que apresentam DNA aberrante (2%, dados não mostrados).

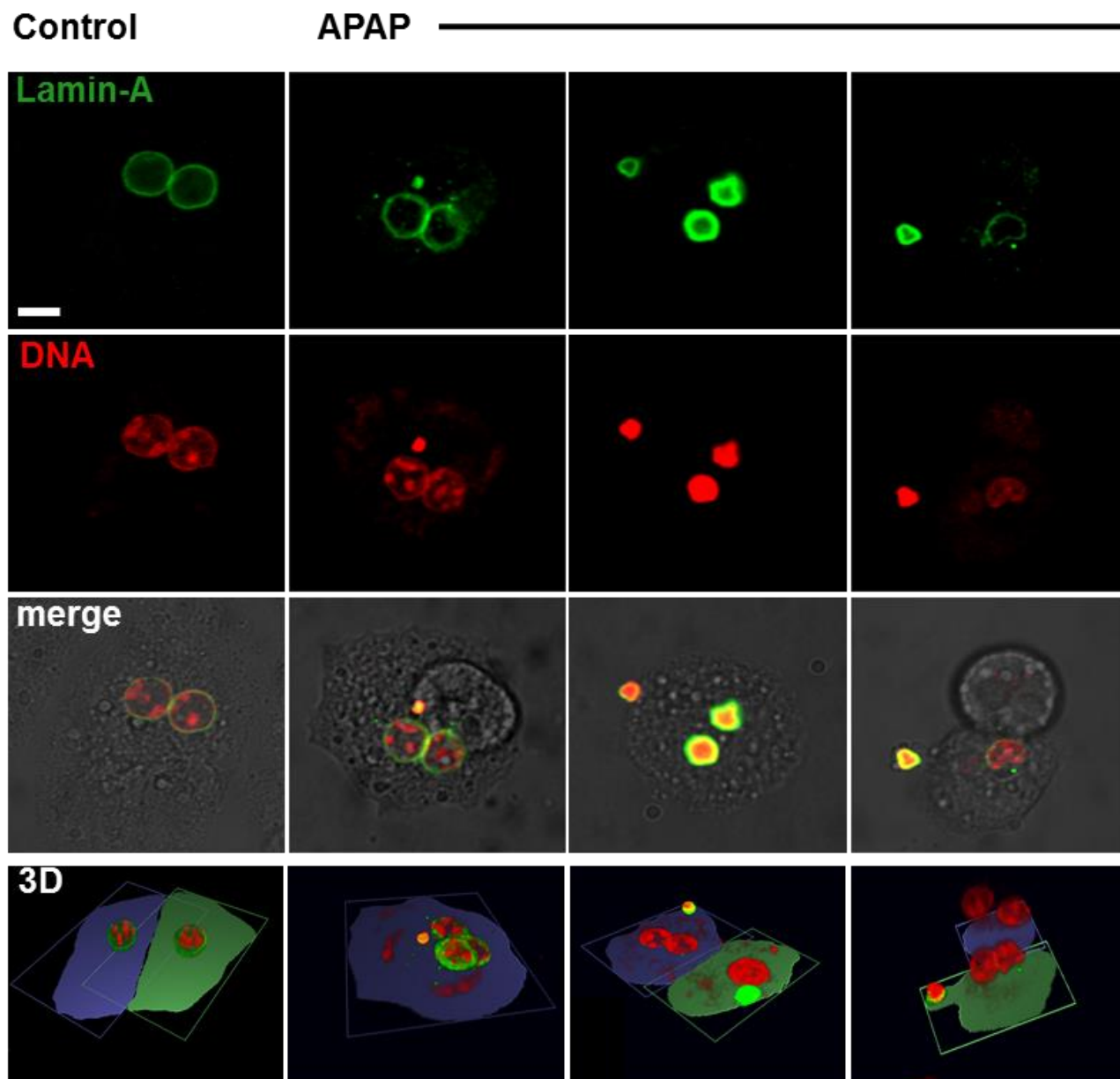


Figura 3 – DNA aberrante pode ser encontrado em vesículas contendo proteínas nucleares

Imunofluorescência de hepatócitos corados com PI e anti-lamina-A para evidenciar DNA e núcleos, respectivamente. Os hepatócitos foram incubados por 4 horas com APAP a 20mM. O DNA (vermelho) pode ser observado em alguns hepatócitos circunscrito em vesículas positivas para a proteína nuclear lamina-A (verde). As vesículas podem ser observadas em detalhe na reconstrução 3D. Escala: 10 μ m.

4.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS INCUBADOS COM APAP NÃO CONDIZEM COM APOPTOSE

Fenômenos de estresse ou morte celular estão intimamente ligados à fragmentação de DNA e sua eventual liberação para o meio extracelular, sendo um destes a apoptose (GREEN, 2011). Assim, com intenção de definir se o acúmulo aberrante de DNA poderia ser relacionado a apoptose de hepatócitos, incubamos as células com o indutor apoptótico staurosporina (STP). Notamos pelas mesmas técnicas de Feulgen e imunofluorescência que o perfil morfológico e a distribuição de DNA induzidos por STP divergem do que acontece durante a incubação com APAP (FIG. 4A,B). Observamos também que STP não foi capaz de induzir DNA aberrante de forma significativa em hepatócitos (FIG. 4C). Portanto, desconsideramos o fenômeno de DNA aberrante como um evento relacionado a apoptose.

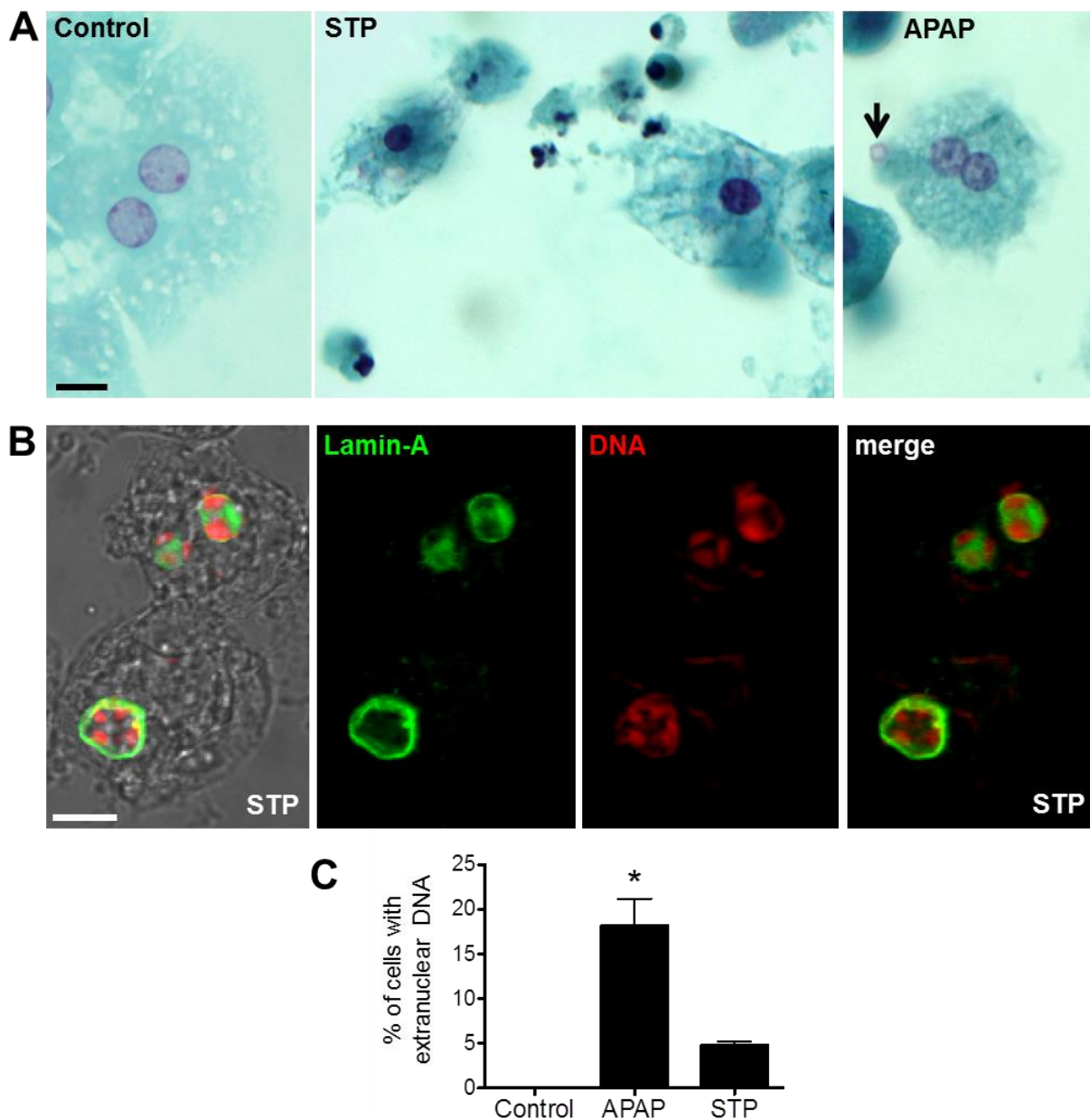


Figura 4 – O indutor de apoptose staurosporina promove um perfil morfológico e de distribuição de DNA distinto de APAP

(A) Hepatócitos primários estimulados com staurosporina (STP, 10 μ M) por 6 horas, e corados pela técnica de Feulgen para evidenciar DNA (roxo). Notar a condensação e fragmentação nuclear características de apoptose, mas distintas do DNA aberrante observado durante a incubação com APAP. (B) Imunofluorescência de hepatócitos incubados com STP e corados com PI e anti-lamina-A para evidenciar DNA e núcleos, respectivamente. (C) Porcentagem de células apresentando DNA citoplasmático foi quantificada. Escala: 10 μ m; * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.5 APAP CAUSA LESÃO HEPÁTICA DE MANEIRA DOSE- E TEMPO-DEPENDENTE EM CAMUNDONGOS

Assim como em hepatócitos purificados, a administração de uma sobredose de APAP em camundongos causa lesão hepática, que pode ser medida pelo aumento da atividade da transaminase hepática alanina aminotransferase (ALT) no soro sanguíneo dos animais. A atividade de ALT aumentou proporcionalmente à dose de APAP, atingindo o pico em 600mg/kg (FIG. 5A). Utilizando a mesma sobredose, verificamos que a lesão hepática induzida pelo medicamento já é significativa a partir de 6 horas após a administração e chega ao pico na 24^a hora (FIG. 5B). Nestas condições, o dano hepático causado por APAP é grave, pois está associado à mortalidade de 25% dos animais, os quais sucumbem à toxicidade nas primeiras 24 horas de experimento, ou seja, no auge da lesão (FIG. 5C). Ao avaliarmos o fígado dos camundongos por histologia, percebemos que o dano consiste principalmente de necrose tecidual nas áreas centrolobulares, um fenômeno característico de lesão de origem metabólica ou tóxica (FIG. 5D) (JAMES *et al*, 2003a; AGARWAL *et al*, 2012).

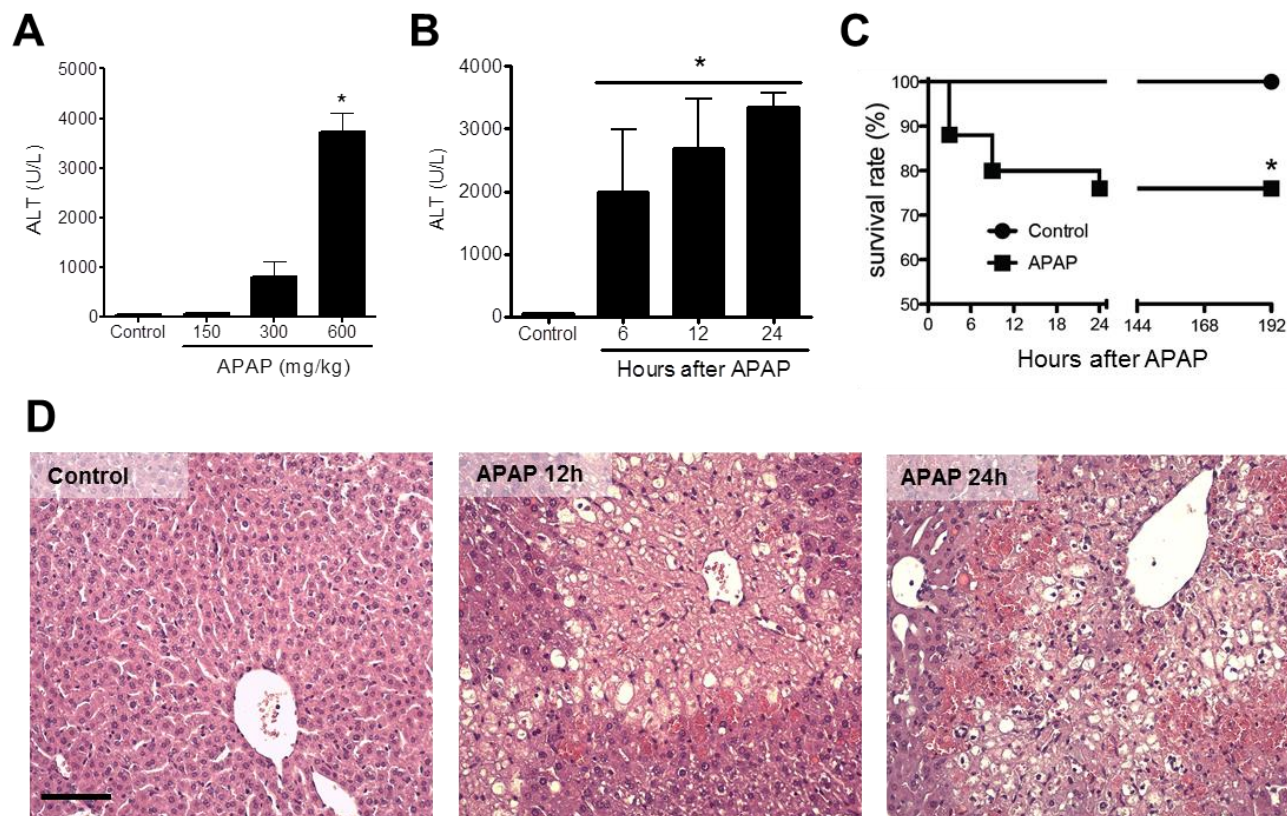


Figura 5 – A toxicidade por APAP envolve grave necrose hepática e mortalidade

(A) Curva dose-resposta de APAP indicando nível de lesão hepática pela atividade de ALT no soro. (B) Curva tempo-resposta de lesão hepática (ALT) induzida por APAP (600mg/kg). (C) Taxa de mortalidade em resposta a mesma dose de APAP, avaliada até o oitavo dia. (D) Histologia de fígado, corada por H&E, de camundongos não tratados (Control) e tratados com APAP por 12 e 24 horas. Escala: 100 μ m; * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.6 ANÁLISE POR IMAGEM NÃO-INVASIVA DE CAMUNDONGOS INTOXICADOS COM APAP INDICA GRANDE QUANTIDADE DE DNA EXPOSTO NA ÁREA DO FÍGADO

Levando em conta nosso conhecimento prévio sobre o acúmulo de DNA aberrante em hepatócitos e a intensa morte necrótica no fígado em resposta a APAP, poderíamos supor que há grande quantidade de DNA exposto neste órgão. Desta maneira, utilizamos uma técnica não-invasiva de visualização que consiste em aplicar um fluoróforo para DNA cuja fluorescência é detectável mesmo através dos tecidos de um animal intacto (NucRed Dead 647). De modo interessante, detectamos um grande sinal fluorescente vindo da região hepática em camundongos que receberam APAP, em comparação com os respectivos controles saudáveis, e esse achado foi confirmado pelo alto sinal fluorescente do órgão isolado cirurgicamente. Isso indica que de fato ocorre um processo no fígado lesado que envolve a exposição de grandes quantidades de DNA.

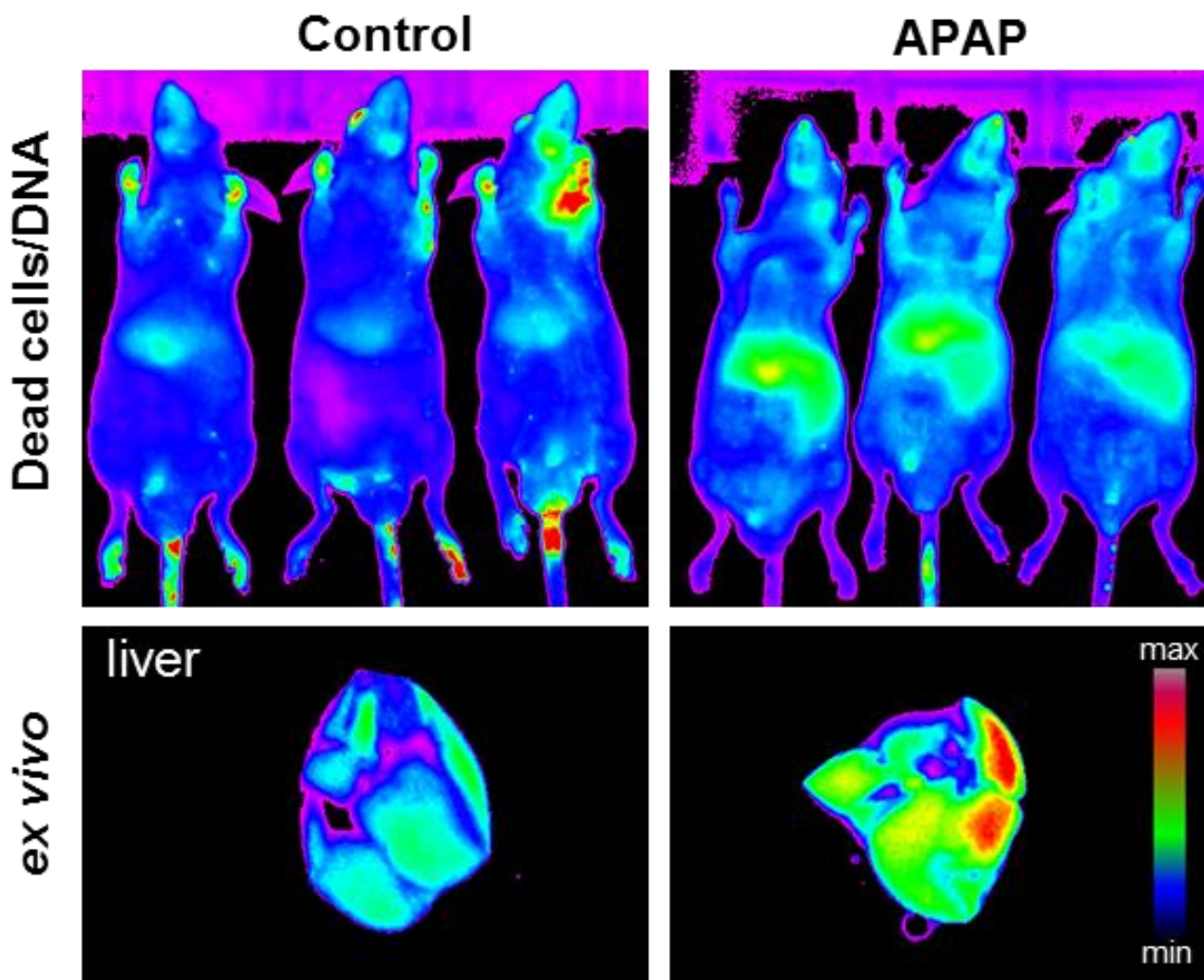


Figura 6 – Imagem de fluorescência não-invasiva indicando grande quantidade de DNA livre no fígado de camundongos tratados com APAP

Camundongos SKH1, que não possuem pelos, receberam APAP (600mg/kg) por via oral e foram anestesiados para a obtenção de imagens 12 horas após a intoxicação. Cerca de 5 minutos antes de seu preparo no aparelho MS FX PRO eles receberam por via endovenosa 100 μ l do fluoróforo para DNA NucRed Dead 647. Após as aquisições não-invasivas, os animais foram sacrificados para coleta de amostras e os fígados submetidos a uma nova rodada de imagens. Este experimento foi feito na *Integrated Imaging Facility* da Universidade de Notre Dame em colaboração com o Prof. Matthew Leevy.

4.7 INTOXICAÇÃO POR APAP LEVA A DEPOSIÇÃO DE DNA NO FÍGADO

Nossos achados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugerem que o descontrole da compartimentalização do DNA e consequente exposição ao meio extracelular podem ser etapas importantes do processo de lesão hepática causado por APAP. Desse modo, buscamos avaliar com maior detalhe se o DNA aberrante aconteceria *in vivo*, se ele envolve a liberação de DNA para fora da célula e em qual escala temporal isso ocorreria. Para isso, utilizamos a técnica de microscopia intravital confocal (IVM), que nos forneceu a resolução em escala celular com a vantagem da manutenção do fluxo sanguíneo e organização estrutural do fígado em um animal vivo.

Em linha com nossas observações anteriores, encontramos um grande acúmulo de DNA no fígado, principalmente em zonas de necrose e na forma de depósitos intravasculares (FIG. 7A). Tais depósitos foram encontrados já na 6^a hora após APAP, sendo posteriormente acompanhados de crescentes zonas de necrose ricas em DNA na 12^a e 24^a horas (FIG. 7A-C). O acúmulo de DNA hepático no auge da lesão compreendia as zonas de necrose, grande parte dos sinusóides, ao redor de hepatócitos, e até mesmo sob a cápsula fibrosa (de Glisson). Para confirmar que o material dos depósitos e das zonas de necrose realmente era DNA, aplicamos uma injeção i.v. de 1000U da enzima DNASE1, e como esperado, quase toda a fluorescência presente na necrose e nos vasos sanguíneos foi eliminada em poucos minutos, como podemos observar em reconstrução 3D (FIG. 7D) e na sequência temporal (FIG. 7E). Também para fins comprobatórios, repetimos o experimento usando outros fluoróforos para DNA (DAPI e PI; dados não mostrados), mas não observamos alteração alguma na localização, formato e visualização dos depósitos de DNA, indicando que os dados não são artefato do uso de Sytox.

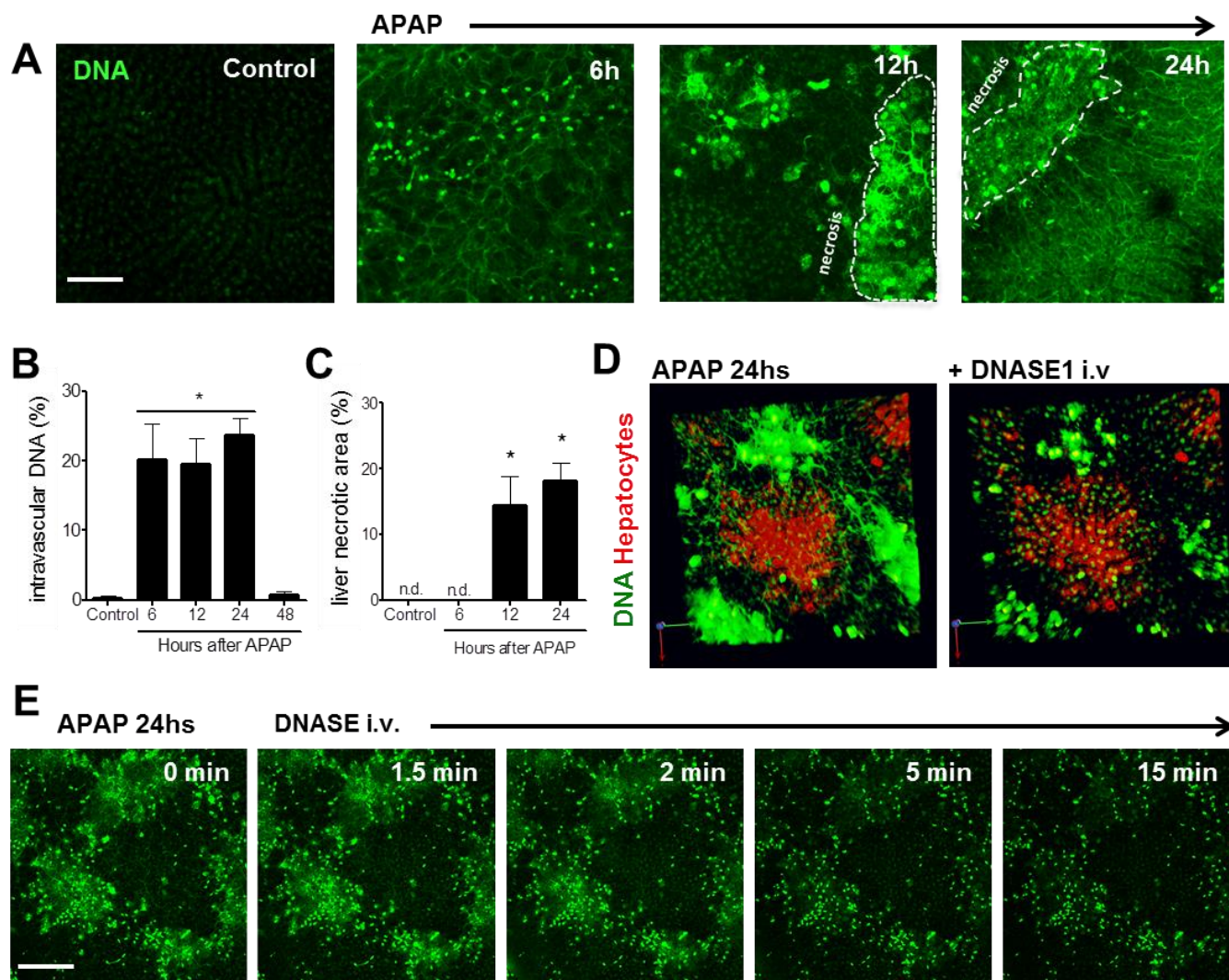


Figura 7 – A lesão hepática causada por APAP é acompanhada de intensa deposição de DNA no fígado

(A) Curva tempo-resposta de deposição de DNA no fígado em resposta a APAP, avaliada por microscopia intravital confocal (IVM). Camundongos foram gavados com 600mg/kg de APAP e as imagens coletadas nos tempos indicados; DNA está em verde, corado por Sytox Green. (B) Quantificação da área com deposição de DNA intravascular nos respectivos tempos após intoxicação. (C) Porcentagem da área necrótica do fígado, evidenciada pela fluorescência verde. (D) Reconstrução 3D de área do fígado de um animal tratado com APAP, antes e depois da injeção de 1000U de DNASE1. Em verde vemos DNA e em vermelho hepatócitos (Rodamina 6G). (E) Sequência de imagens de um fígado lesado por APAP após injeção de DNASE1. Escala em A: 100µm, E: 300µm; * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.8 DEPOSIÇÃO DE DNA NO FÍGADO É DIRETAMENTE PROPORCIONAL AO GRAU DE LESÃO

A necrose hepática por APAP é dose-dependente, como demonstramos na figura 5A. Com isso, buscamos determinar se a deposição de DNA intravascular no fígado também seria proporcional à dose de APAP, ou seja, ao grau de lesão hepática. Observamos por IVM que o DNA intravascular correlaciona diretamente com a lesão no fígado, sendo que ele é inexistente em animais controle ou tratados com a dose de 150mg/kg, mas inicia-se em 300mg/kg e chega a cobrir em média 25% da área hepática quando os camundongos são tratados com a dose máxima de 600mg/kg (FIG. 8).

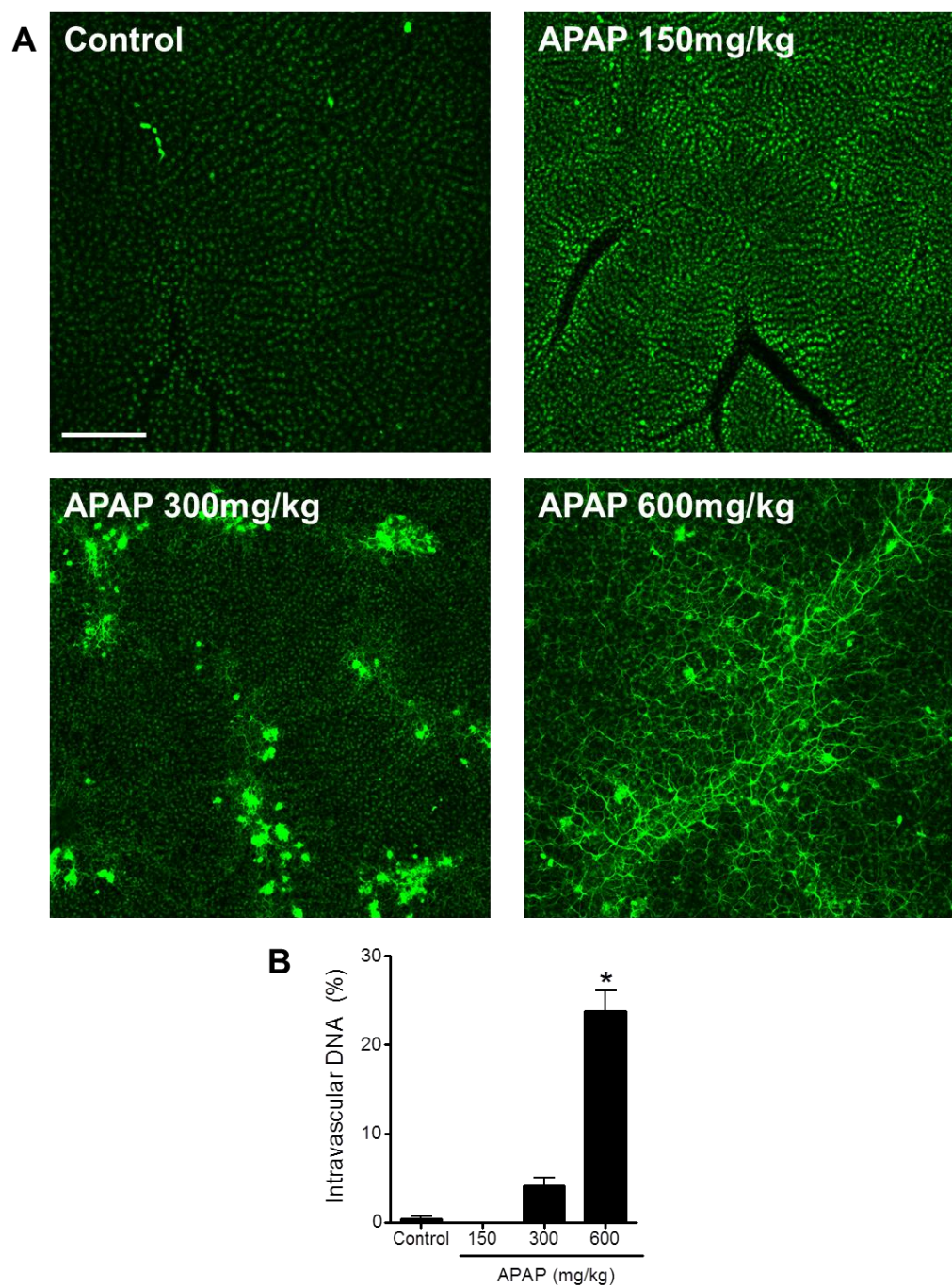


Figura 8 – Presença de DNA intravascular é proporcional ao dano hepático

(A) Microscopia intravital confocal (IVM) de fígado evidenciando DNA em verde. Camundongos foram tratados com APAP nas doses de 150, 300 e 600mg/kg, por 24 horas. (B) Quantificação digital da área coberta por DNA intravascular, usando o programa ImageJ. Escala: 300 μ m; * = $p < 0.05$ em relação ao controle.

4.9 ATIVIDADE DE DNASE DO SORO DE CAMUNDONGOS NÃO É REDUZIDA DURANTE A LESÃO HEPÁTICA POR SOBREDOSE DE APAP

O fígado secreta grande parte da DNASE1 presente no soro, uma enzima responsável pela constante clivagem de DNA livre no sangue e tecidos, permitindo sua subsequente reabsorção pelo organismo (LUDWIG *et al*, 2009). Considerando isso, em casos de DILI grave e perda de função hepática, é possível que a atividade de DNASE sérica seja reduzida, sendo este o mecanismo que permite que o DNA aberrante se acumule nos vasos e parênquima hepáticos. Desse modo, estimamos a capacidade do soro de camundongos de clivar DNA. Como é possível observar na figura 9A, na 24^a hora após APAP os soros controle e de animais tratados com APAP são igualmente eficazes em degradar DNA hepático, seja ele de alto peso molecular (>10.000 pares de bases; bp) ou baixo peso molecular (~250 bp). Isto é reforçado pela presença de arraste nas bandas contendo soro, um indício claro de que houve degradação do DNA depositado. Percebemos que a atividade de DNASE sérica também se mantém estável em um momento prévio ao auge da lesão (12h; FIG. 9B), e que a degradação de DNA é principalmente derivada de atividade proteica/enzimática do soro, pois a desnaturação térmica bloqueou completamente a clivagem das bandas no gel (FIG. 9C). Também avaliamos a atividade de DNASE sérica de pacientes com FHA (FIG. 9D), onde observamos que não há redução da clivagem de DNA em comparação com soro de indivíduos saudáveis, ou seja, resultados similares ao ensaio com soro murino. Portanto, estes dados indicam que não há redução da atividade de DNASE sérica durante a DILI em camundongos e humanos.

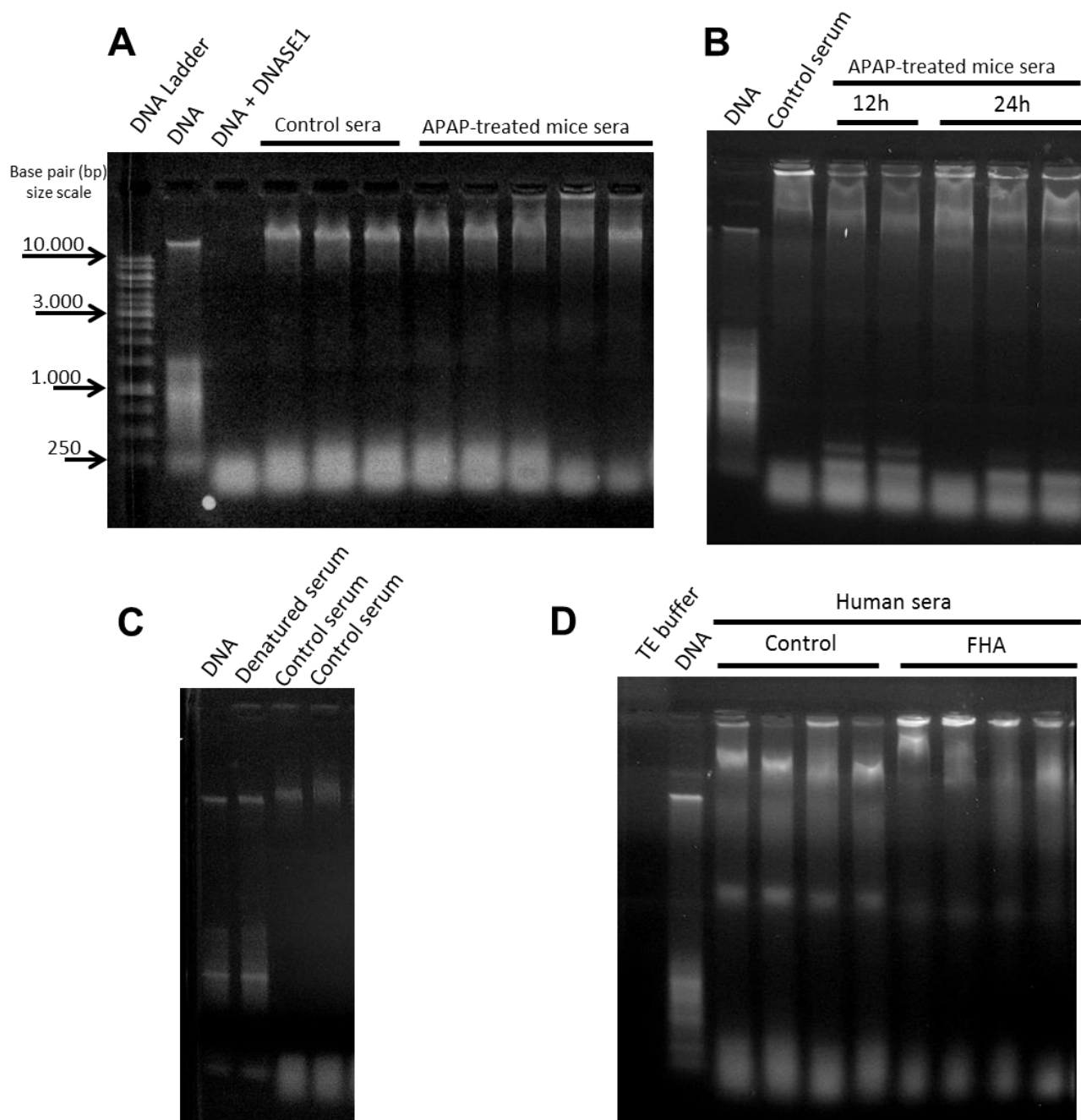


Figura 9 – Não há redução da atividade de DNASE sérica durante a lesão hepática por APAP

(A) Amostras de soro (2.5 μ l) de camundongos controle ou intoxicados com APAP (600mg/kg) por 24 horas foram incubadas com 14 μ g de DNA de fígado e depois corridas em gel de agarose 1% para verificação da integridade das bandas. O controle positivo foi realizado do mesmo modo, mas com adição de 2U de DNASE1. (B) Atividade de DNASE sérica nos tempos 12 e 24 horas pós APAP. (C) Desnaturação térmica inibe a clivagem de DNA pelo soro. (D) Ensaio de atividade de DNASE sérica de pacientes com Falência Hepática Aguda (FHA).

4.10 NEUTRÓFILOS, MAS NÃO MACRÓFAGOS, ESTÃO PRESENTES EM ZONAS RICAS EM DNA E PARTICIPAM DA LESÃO HEPÁTICA CAUSADA POR APAP

O fígado é um órgão bastante rico em leucócitos, e como muitos outros, possui seu próprio macrófago tecidual, a célula de Kupffer (KC). Como as KCs são essenciais para a fisiologia e imunologia hepática, decidimos avaliar o papel destas células no fígado durante o desafio com APAP. Em um fígado saudável, as KC estão espalhadas por todos os sinusóides, deste modo cobrindo quase toda a área vascular. Isso pode ser visto pela injeção endovenosa de partículas de látex fluorescentes (*beads*) no camundongo, as quais são instantaneamente capturadas pelas KCs (FIG 10A). Em contrapartida, em animais tratados com APAP existem grandes áreas onde não há captura de partículas, justamente as áreas necróticas ricas em DNA (FIG. 10A). Isto sugere que não há KCs funcionais ou vivas nessas áreas.

Nesta linha de raciocínio, observamos as zonas necróticas de camundongos intoxicados com APAP que receberam anticorpos fluorescentes específicos para KCs (anti-F4/80) e para neutrófilos (anti-GR1), um outro tipo de leucócito sabidamente presente em DILI (LIU, Z. X. *et al*, 2006; MARQUES *et al*, 2012). Notamos que realmente havia pouquíssimas KCs nas zonas ricas em DNA, mas por outro lado, o número de neutrófilos era alto nestas áreas (FIG. 10B,C). Isso nos levou a pensar que, devido ao seu posicionamento oposto, talvez o papel de KCs e neutrófilos também divergisse durante a lesão hepática por APAP. Assim, realizamos um experimento em que eliminamos as KCs ou neutrófilos dos animais previamente à intoxicação, através de injeção endovenosa de clodronato encapsulado em lipossomos (MCDONALD *et al*, 2010) ou de anticorpo anti-GR1 (MARQUES *et al*, 2012), respectivamente. A eliminação de KCs não surtiu efeito no dano hepático, mas de modo interessante, a eliminação de neutrófilos causou uma redução de aproximadamente 70% da lesão hepática por APAP, indicada pela queda da atividade sérica de ALT (FIG. 10D). Isto sugere que neutrófilos recrutados, mas não KCs, participam da patogênese da lesão hepática medicamentosa.

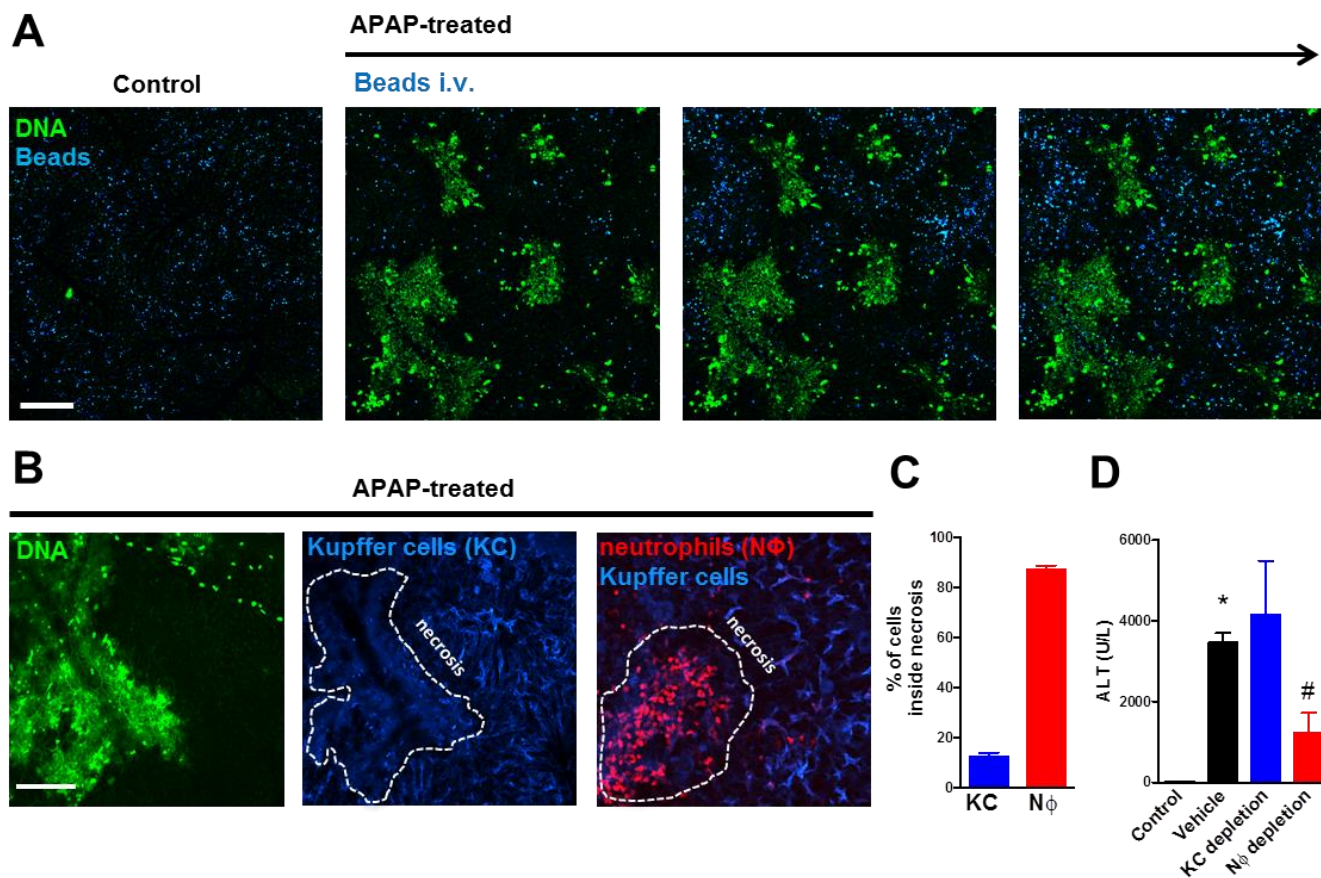


Figura 10 – Necrose hepática aguda por APAP envolve neutrófilos, mas não envolve células de Kupffer

(A) IVM de fígado de animais injetados com partículas fluorescentes (*Beads*) para evidenciar células de Kupffer (KC). Camundongos foram tratados com 600mg/kg de APAP por via oral e avaliados após 24 horas. As zonas necróticas/DNA estão em verde e *beads* em azul. (B) IVM mostrando a ausência de KCs, mas presença de neutrófilos dentro da necrose hepática induzida por APAP. (C) Quantificação da porcentagem de cada tipo celular dentro das zonas de necrose. (D) Nível de ALT de animais tratados com APAP nos quais previamente eliminamos KCs (200 μ l clodronato em lipossomos) ou neutrófilos (200 μ g anti-GR1). Escala em A: 300 μ m; B: 100 μ m; * = $p < 0.05$ em relação ao controle; # = $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo.

4.11 NEUTRÓFILOS MIGRAM ESPECIFICAMENTE PARA O INTERIOR DAS ZONAS DE NECROSE NO DECORRER DA LESÃO HEPÁTICA

Neutrófilos são leucócitos conhecidos por participarem de respostas inflamatórias agudas, mas seu posicionamento e movimentação no tecido inflamado ainda são pouco explorados. Desse modo, utilizando IVM, avaliamos a localização dos neutrófilos durante o desenvolvimento da lesão no fígado e medimos o modo e a direção de sua migração dentro do órgão. Primeiramente, observamos em menor aumento os vários focos de necrose centrolobular (verde) causados pelo medicamento (24h), os quais contém um grande número de neutrófilos praticamente restritos em seu interior (FIG. 11A). Em seguida, buscando saber como seria o recrutamento destas células para o fígado, realizamos IVM em diferentes tempos após APAP e vimos que os neutrófilos iniciam seu acúmulo a partir da 6^a hora, sendo que a partir da 12^a e 24^a horas o número de células é ainda maior e elas ativamente se dirigem para os focos de necrose (FIG. 11B-D). Em relação ao seu posicionamento, na 6^a hora os neutrófilos encontram-se dispersos pelo tecido, aderidos à extensa rede de sinusóides. Este perfil é substituído por uma grande presença de neutrófilos na 12^a hora, espalhados quase que proporcionalmente pelos sinusóides e necroses do tecido hepático. Já na 24^a hora, a maioria dos neutrófilos se encaminhou para o interior das zonas necróticas, deixando a vasculatura por onde chegaram (FIG. 11B-D).

Em seguida, ao estudarmos os parâmetros de movimentação dos neutrófilos, percebemos inicialmente que a distância total percorrida é significativamente maior 24 horas após APAP (FIG. 11E). Esta maior distância é acompanhada por movimentação mais rápida dos neutrófilos (FIG. 11F) e por deslocamento significativamente maior a partir de seu ponto de origem no tecido (FIG. 11G). Por fim, avaliamos o índice de vagueação (em inglês, *meandering*). Quanto mais alto o índice, maior é o direcionamento do neutrófilo, e quanto mais baixo, mais errante é a trajetória da célula. Observamos que os neutrófilos tem elevação significativa do índice na 12^a hora, mas esse forte direcionamento é substituído por uma trajetória errante na 24^a hora (FIG. 11H). Curiosamente neste mesmo tempo, os neutrófilos exibiram um comportamento de patrulhamento, se movimentando ativamente dentro da necrose, mas sem direcionamento aparente e sem sair do foco necrótico.

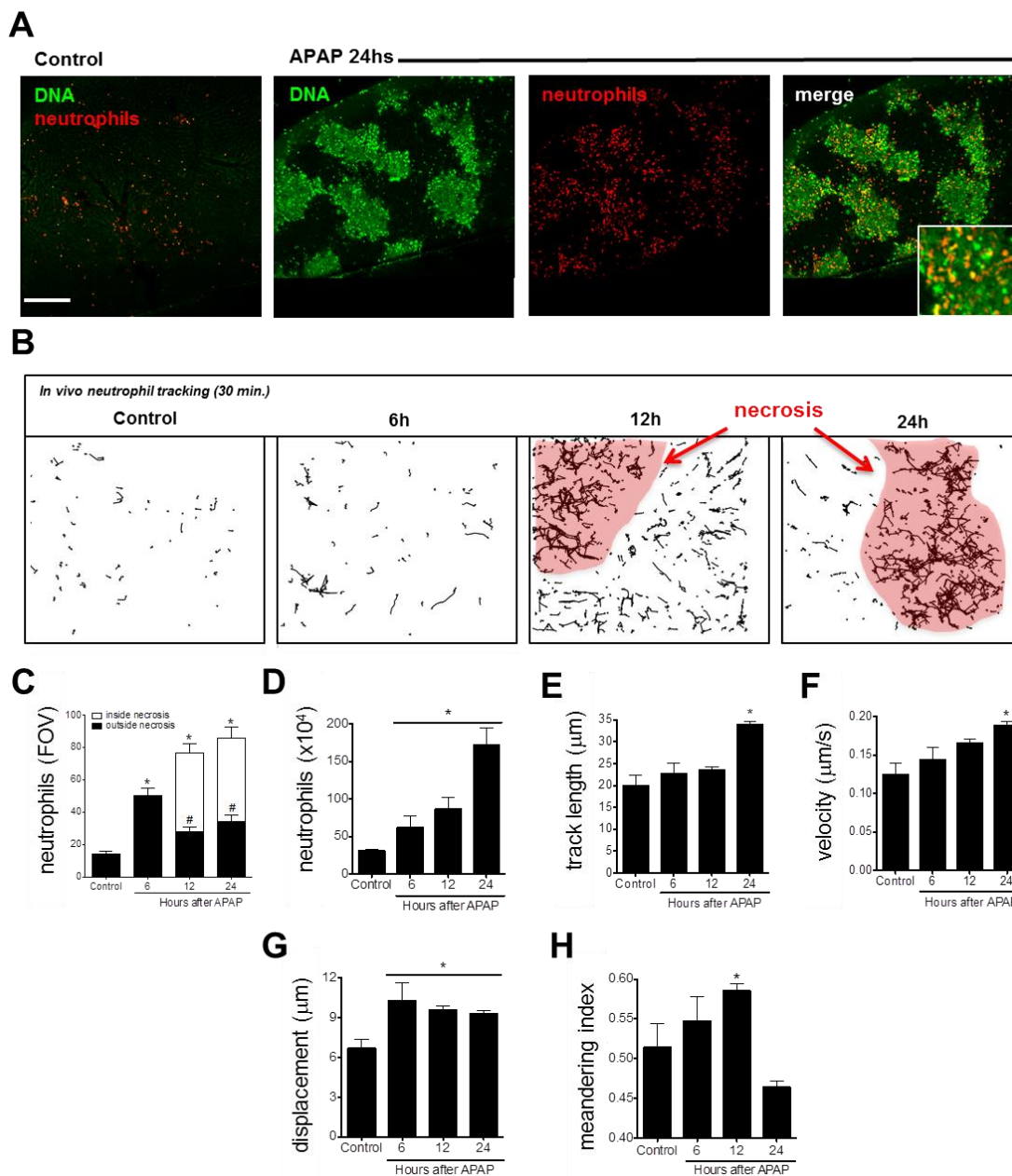


Figura 11 – Neutr3filos s3o ativamente recrutados para o interior das zonas de necrose durante a les3o hep3tica, onde desenvolvem um comportamento de patrulhamento

(A) IVM em pequeno aumento evidenciando zonas de necrose/DNA (verde) no f3gado contendo grande n3mero de neutr3filos (vermelho) em seu interior. (B) Rastreamento digital da movimentaç3o de neutr3filos (traç3s pretos) no f3gado lesado. (C) Contagem de neutr3filos dentro e fora das 3reas de necrose nos respectivos tempos. (D) N3vel de MPO no f3gado ap3s intoxicaç3o. Quantificaç3o dos par3metros de movimentaç3o dos neutr3filos no f3gado necrosado: (E) dist3ncia percorrida, (F) velocidade, (G) deslocamento, (H) 3ndice de vagueaç3o. Escala: 300 μm ; * = $p < 0.05$ em relaç3o ao controle; # = $p < 0.05$ em relaç3o ao grupo 6 horas APAP.

4.12 RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO NECRÓTICO É INDEPENDENTE DE CD18 E ÁCIDO HIALURÔNICO, MAS DEPENDENTE DE CXCR2 E FPR1

A movimentação de leucócitos por vasos sanguíneos e tecidos é governada por moléculas de adesão e por moléculas quimiotáticas (LEY *et al*, 2007). Nos experimentos a seguir, bloqueamos tardiamente (6 e 18 horas após APAP) a função de moléculas conhecidas envolvidas no recrutamento de neutrófilos ao fígado; elas foram: CD18, ácido hialurônico, CXCR2 e FPR1. CD18 e ácido hialurônico são conhecidos por participarem da adesão de neutrófilos a vasculatura em condições patológicas (MCDONALD *et al*, 2008), mas seu bloqueio durante a lesão hepática por APAP por tratamento com anticorpo anti-CD18 ou a degradação de ácido hialurônico pela enzima hialuronidase (HNase) não causou alterações na quantidade total de neutrófilos no fígado ou em seu posicionamento dentro das zonas (FIG. 12A,B). Os receptores quimiotáticos associados ao recrutamento de neutrófilos durante a lesão estéril, CXCR2 e FPR1, apresentaram o resultado oposto após seu bloqueio com anticorpo anti-CXCR2 ou com antagonista de FPR1. Em ambos os casos, houve redução significativa na migração de neutrófilos para as zonas de necrose, o que diminuiu significativamente o número de neutrófilos totais (FIG. 12A,B). De maneira interessante, a inibição do acúmulo de neutrófilos no fígado pelo bloqueio de CXCR2 ou FPR1 também levou a uma redução da área de necrose hepática (FIG. 12C), mas apenas o bloqueio de FPR1 foi capaz de interferir na deposição de DNA intravascular durante a lesão (FIG. 12D). Desse modo, CD18 e ácido hialurônico não parecem estar associados ao recrutamento de neutrófilos, enquanto que CXCR2 e FPR1 parecem ser necessários para este processo durante a lesão por APAP.

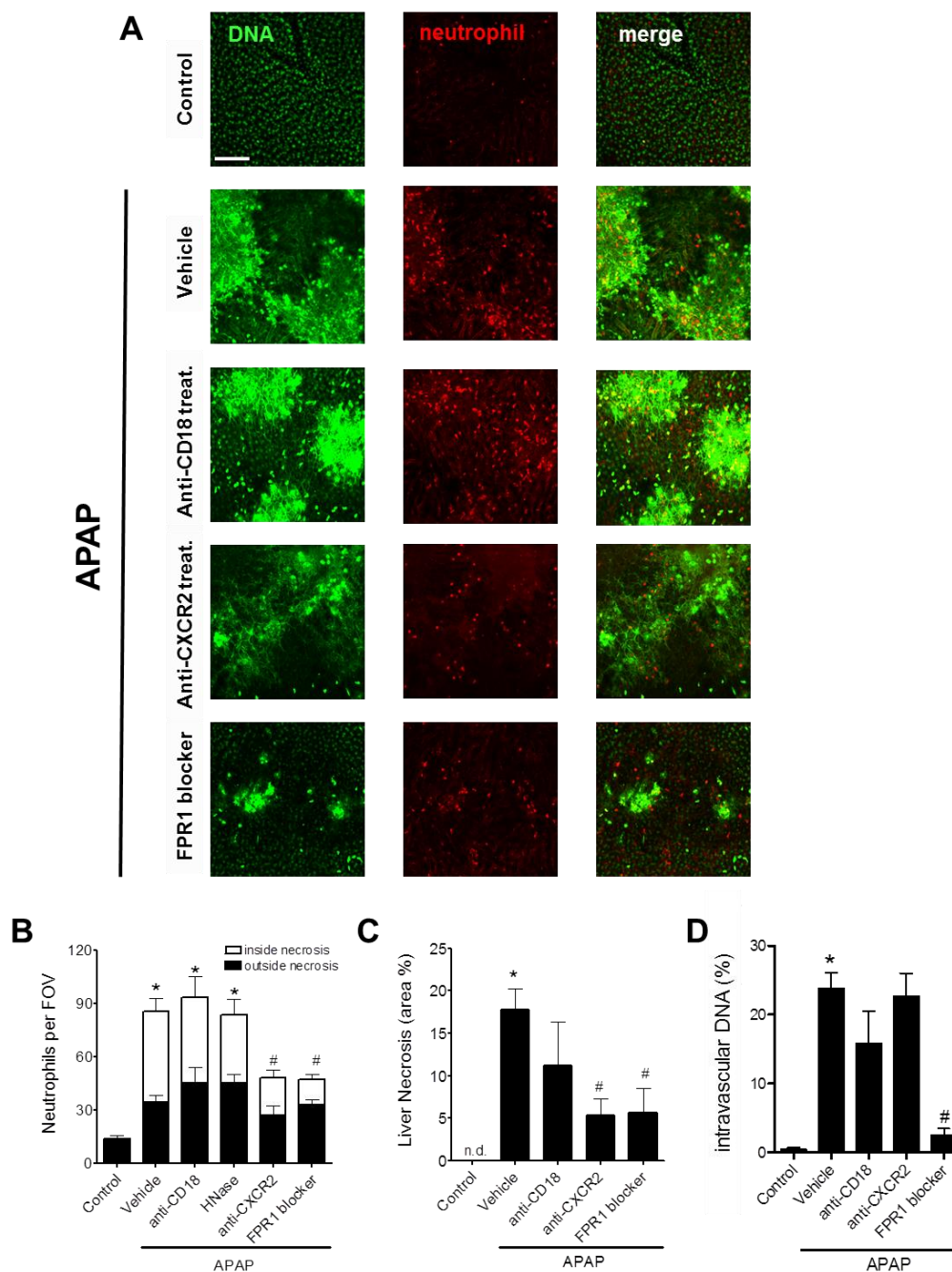


Figura 12 – CXCR2 e FPR1 são necessários para a migração de neutrófilos e desenvolvimento de zonas de necrose induzidos por APAP

(A) IVM de fígado de animais intoxicados com APAP e pós-tratados com duas doses i.v. de anticorpo anti-CD18 (20µg/dose), anti-CXCR2 (30µg/dose) ou bloqueador de FPR1, Ciclosporina H (30µg/dose). Necrose/DNA está em verde e neutrófilos em vermelho. (B) Contagem de neutrófilos dentro e fora da necrose, incluindo grupo hialuronidase (HNase, 200U/dose). (C) Porcentagem de área necrótica. (D) Área com deposição de DNA intravascular. Escala: 100µm; * = $p < 0.05$ em relação ao controle; # = $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo.

4.13 TIOACETAMIDA, OUTRO COMPOSTO HEPATOTÓXICO, TAMBÉM É CAPAZ DE INDUZIR DNA ABERRANTE EM HEPATÓCITOS E ACÚMULO DE DNA *IN VIVO*

Visto a extensão dos fenômenos de DNA aberrante em hepatócitos e seu acúmulo pelo fígado lesado, surgiu a questão se isto seria uma consequência específica da ação do APAP sobre as células. Para responder isso, repetimos nossos experimentos *in vitro* e *in vivo*, utilizando outro agente hepatotóxico, a tioacetamida (TAA)(GOMIDES *et al*, 2014). Nós observamos que os hepatócitos tratados com TAA apresentaram o mesmo acúmulo de DNA aberrante em vesículas no citoplasma (FIG. 13A). Além disso, TAA foi capaz de causar lesão hepática com formação de zonas de necrose e deposição de DNA intravascular de maneira muito similar a APAP (FIG. 13B-F). O recrutamento de neutrófilos ao fígado lesado por TAA também seguiu o mesmo padrão de intensidade e direcionamento aos focos necróticos induzidos por APAP (FIG. 13G). Estes dados indicam que o fenômeno de DNA aberrante não é exclusivo da lesão hepática por APAP, mas sim característico da abrangente classe das lesões hepáticas por medicamentos (DILI).

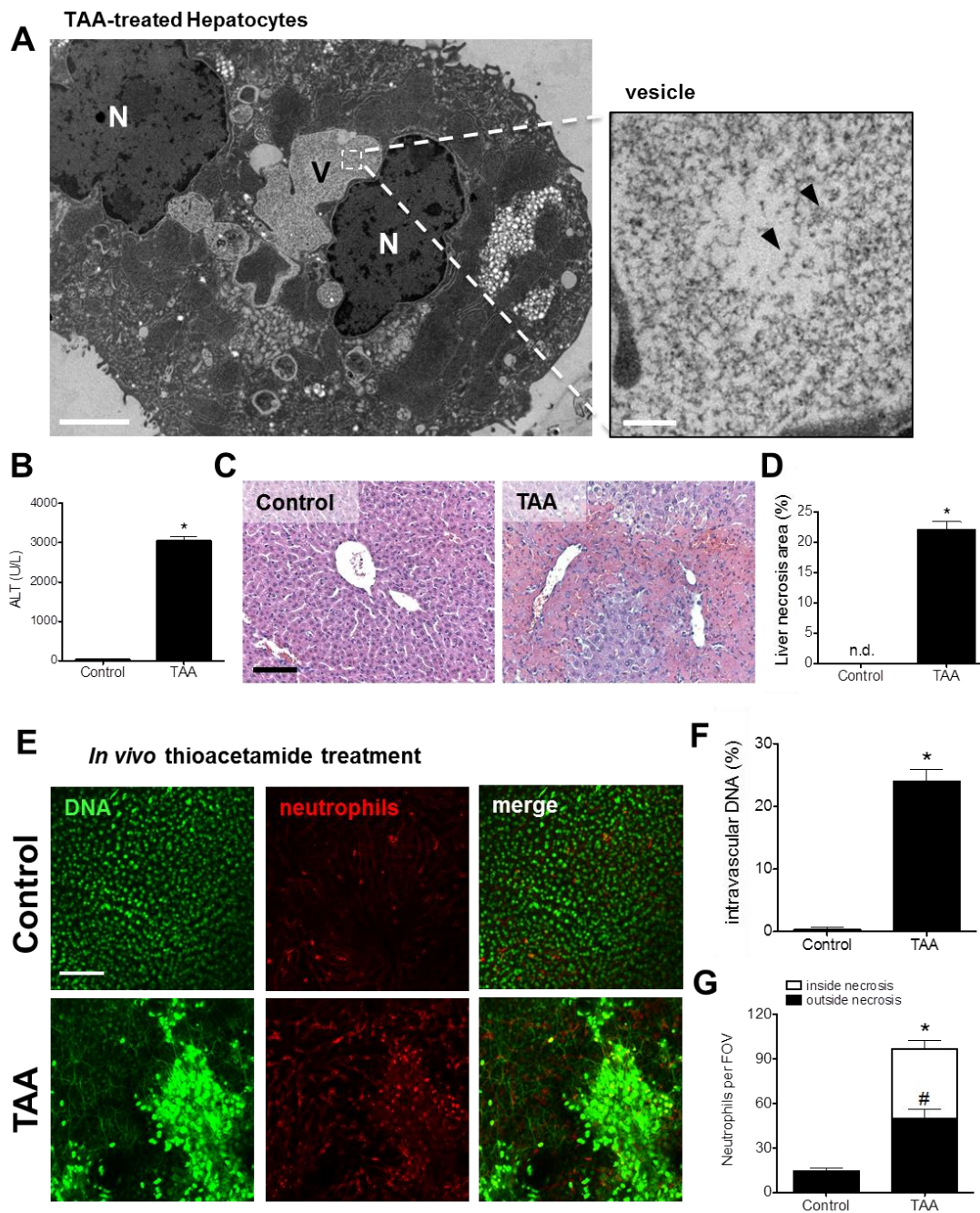


Figura 13 – Acúmulo de DNA aberrante em hepatócitos e camundongos não é restrito a toxicidade por APAP

(A) Microscopia eletrônica de transmissão de hepatócitos tratados com TAA (70 μ M). Notar núcleos (N) ao redor de vesícula (V) contendo cromatina. (B) ALT sérica em resposta a duas doses de TAA 300mg/kg. (C) Histologia (H&E) demonstrando necrose centrolobular. (D) Porcentagem de área necrótica quantificada por IVM. (E) Imagens representativas do fígado, evidenciando DNA e neutrófilos por IVM. (F) Porcentagem de área coberta com DNA intravascular. (G) Contagem de neutrófilos dentro e fora do foco necrótico. Escalas em A: 2 μ m e 0.5 μ m; em B e C: 100 μ m. * = $p < 0.05$ em relação ao controle; # = $p < 0.05$ em relação a neutrófilos fora da necrose.

4.14 A NECROSE HEPÁTICA POR APAP OCORRE EM CONDIÇÃO ESTÉRIL E NÃO ESTÁ ASSOCIADA À TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

A necrose hepática induzida por medicamentos, como APAP, é geralmente considerada como um evento independente de microrganismos, portanto, uma lesão estéril. Mas dados comprovando tal informação são muito escassos, o que nos prontificou a testar essa hipótese. Desse modo, coletamos o sangue e fígado de camundongos tratados com APAP e testamos a presença de bactérias pelo plaqueamento e contagem em meio de cultura, e por PCR quantitativo para o gene de RNA 16S. Tanto as culturas em agar quanto o PCR foram negativos para presença bacteriana no soro e fígado (FIG. 14A,B), indicando que não há translocação bacteriana mesmo nas condições extremas da intoxicação por APAP. Em seguida, realizamos um experimento em que submetemos camundongos selvagens a um tratamento crônico com antibióticos de amplo espectro a fim de reduzir ao máximo a sua microbiota. Ao desafiarmos estes animais com APAP, observamos a mesma deposição de DNA e infiltrado de neutrófilos em comparação com camundongos não tratados com antibióticos (FIG. 14C), confirmando que o acúmulo de DNA e a inflamação hepática ocorrem em condição estéril.

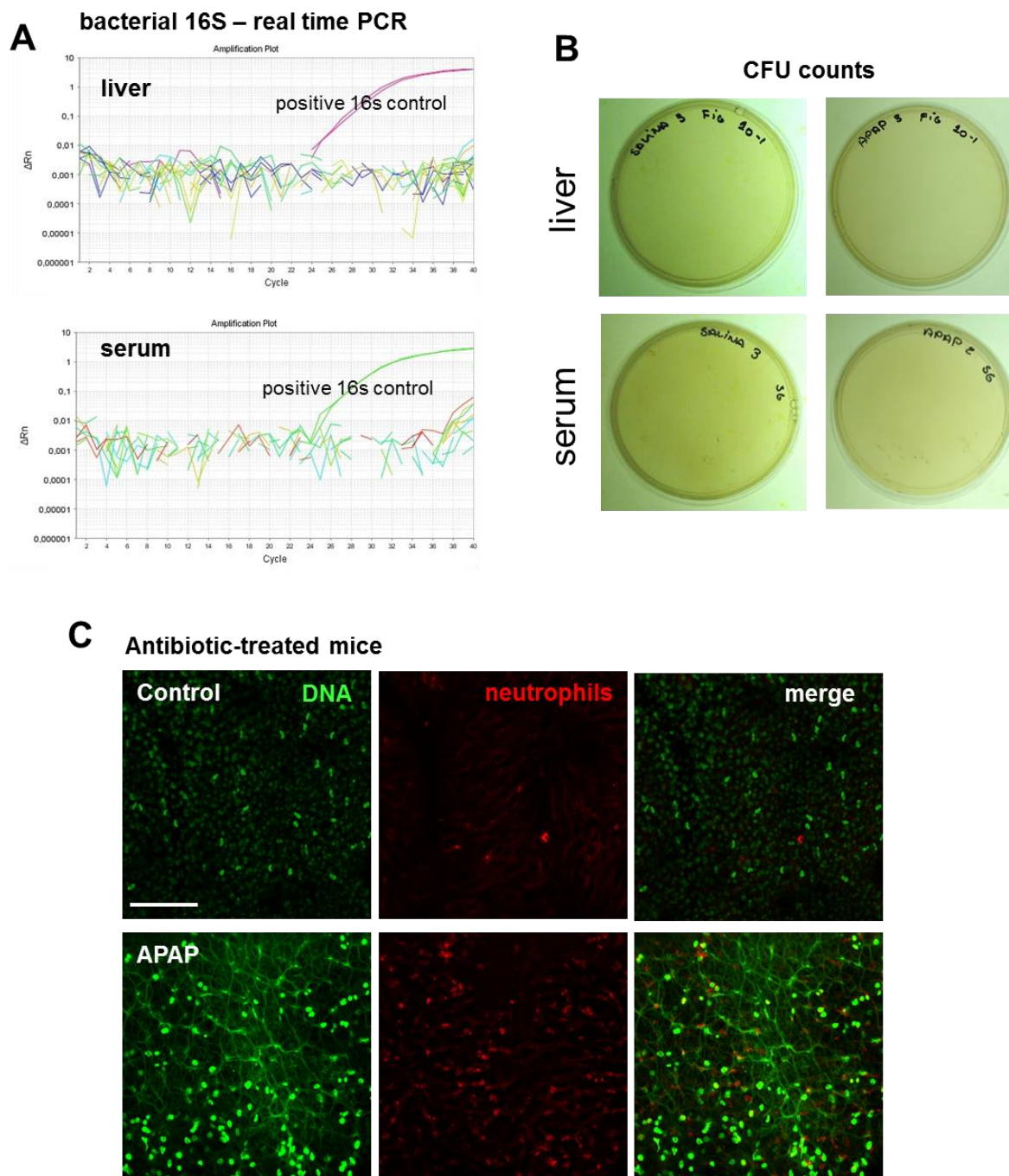


Figura 14 – A lesão hepática induzida por APAP ocorre em condição estéril

(A) PCR quantitativo para o gene de RNA 16S bacteriano em extrato de fígado e sangue de camundongos tratados ou não com APAP (600mg/kg). (B) Culturas em agar de fígado e sangue dos animais. (C) IVM de fígado para visualização de DNA (verde) e neutrófilos (vermelho) de camundongos tratados cronicamente com antibióticos e desafiados com APAP. Escala: 100 μ m.

4.15 DEPOSIÇÃO DE DNA INTRAVASCULAR NÃO É DERIVADA DE *NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS* (NETs)

Existe um processo de extrusão de DNA para o meio extracelular em neutrófilos chamado de NET (“armadilha extracelular de neutrófilo”). Quando essas armadilhas ou redes de DNA são produzidas por neutrófilos, elas carregam proteínas específicas de seus grânulos, como a enzima elastase, possibilitando sua identificação (BRINKMANN *et al*, 2004). Considerando que há uma grande quantidade de DNA e neutrófilos no fígado de animais tratados com APAP, nós supomos que os depósitos de DNA hepáticos poderiam ser NETs. Assim sendo, utilizamos um procedimento de visualização estabelecido onde aplicamos por via endovenosa um anticorpo anti-elastase fluorescente e checamos por IVM se havia dupla marcação nas fibras de DNA (MCDONALD *et al*, 2012; JENNE *et al*, 2013). Nestas condições, não encontramos nenhuma marcação positiva para elastase no tecido hepático (FIG. 15), indicando que NETs provavelmente não são a fonte principal de DNA depositado no fígado durante a DILI por APAP.

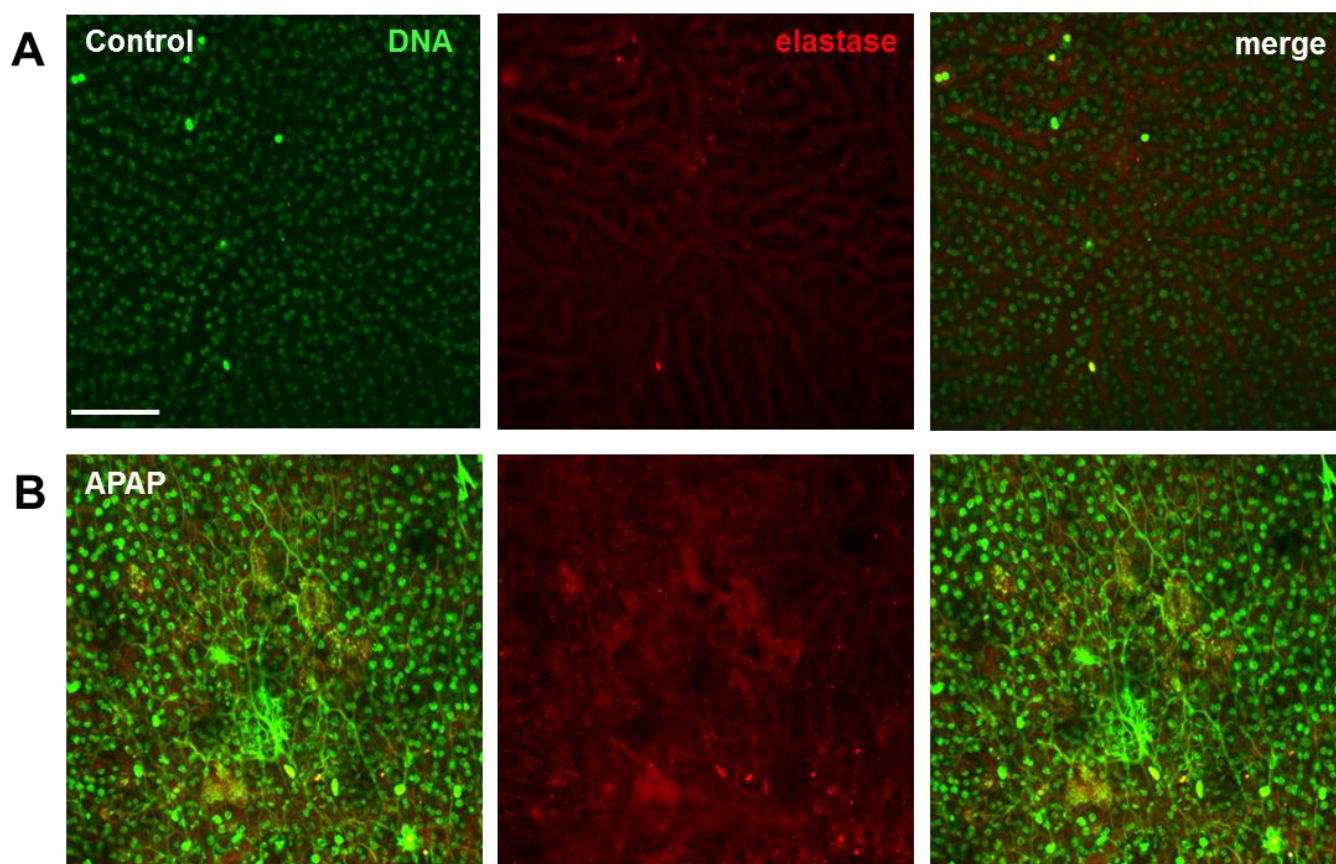


Figura 15 – Deposição de DNA no fígado é negativa para elastase de neutrófilo

IVM de fígado de camundongos controle (A) ou tratados com APAP (B) na dose de 600mg/kg por 24 horas. Os animais foram injetados minutos antes com sytox green (50 μ M) e 20 μ g de anticorpo anti-elastase conjugado a alexa-555. Escala: 100 μ m.

4.16 NEUTRÓFILOS APRESENTAM EXPRESSÃO ELEVADA DO RECEPTOR TLR9 EM SUA SUPERFÍCIE DURANTE A LESÃO HEPÁTICA

Ácidos nucleicos são reconhecidos por uma grande gama de receptores, espalhados por vários compartimentos celulares (ISHII *et al*, 2008; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Um destes é o receptor tipo toll 9 (TLR9), capaz de reconhecer DNA de origem eucariótica, mitocondrial e bacteriana. Com isso, procuramos investigar se neutrófilos, que migram e se concentram em áreas ricas em DNA, expressariam o receptor TLR9. Primeiramente, extraímos leucócitos do fígado de camundongos tratados com APAP e confirmamos que há um grande aumento na proporção de neutrófilos (Ly6G^{hi} CD11b^{hi}, FIG. 16A) no tecido, em relação ao controle não tratado. Ao observarmos estes neutrófilos ao microscópio, notamos que eles expressam o receptor TLR9, entretanto, ele se encontra na membrana plasmática (FIG. 16B). Isso é reforçado pelo fato das células não terem sido permeabilizadas para este experimento. Em seguida, avaliando novamente por citometria de fluxo e sem etapa de permeabilização, notamos que os neutrófilos recrutados para o fígado aumentam significativamente sua expressão de TLR9 durante a lesão hepática induzida por APAP (FIG. 16C,D). Estes dados indicam que o receptor TLR9 expresso na superfície de neutrófilos pode estar envolvido na ativação ou função destas células nessas condições.

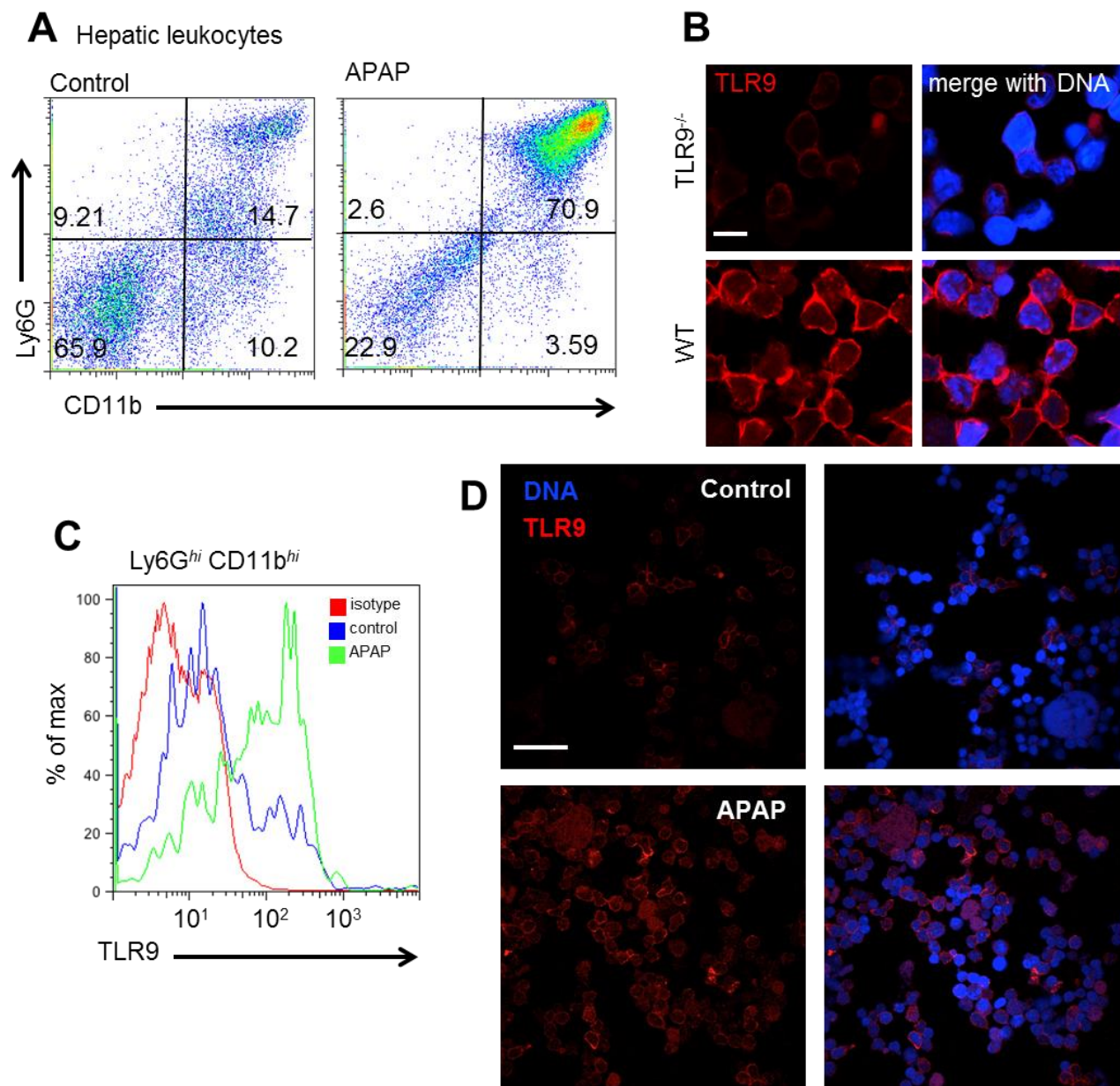


Figura 16 – Neutr3filos hepáticos expressam TLR9 em sua superfície durante a necrose por APAP

(A) Citometria de fluxo de leuc3citos extra3idos de f3gado controle e tratado com APAP. Eventos plotados em fun3o da express3o de Ly6G e CD11b. (B) Mar3a3o fluorescente positiva para TLR9 na membrana de neutr3filos de animal selvagem. (C) Histograma de fluoresc3ncia de TLR9 em neutr3filos de animais controle (azul) ou tratados com APAP (verde). (D) Imagem evidenciando maior mar3a3o fluorescente para TLR9 em leuc3citos de animais intoxicados por APAP. Escala em B: 10 μ m; em D: 100 μ m. * = $p < 0.05$.

4.17 NEUTRÓFILOS DETECTAM E RESPONDEM A DNA HEPÁTICO POR MEIO DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GENES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E REDUÇÃO DE GRANULOSIDADE

A expressão de TLR9 por neutrófilos, especialmente na membrana plasmática, abre um precedente para que eles sejam ativados por DNA depositado nas superfícies onde interagem. Desse modo, purificamos neutrófilos de camundongo e os incubamos com DNA extraído de fígado. Surpreendentemente, neutrófilos foram capazes de detectar a presença de DNA no meio e responderam ativando NF- κ B (medido pelo aumento de I κ B- α) e expressando CXCR2, dois genes envolvidos na sobrevivência e ativação destas células (FIG. 17A). O receptor TLR9 parece ser o candidato mais provável para o reconhecimento de DNA, pois o uso de neutrófilos deficientes neste receptor (TLR9^{-/-}) aboliu a resposta completamente (FIG.17A). Não observamos mudança na expressão de outros genes envolvidos na resposta a DNA, como ISG54 e interferons (IFN) tipo 1 (IFN- α e IFN- β), sugerindo que essa via de sinalização talvez não seja importante nestas condições (FIG. 17A).

Além de alterações na expressão gênica, buscamos outros indícios da ativação de neutrófilos, como a desgranulação (YE *et al*, 2009). Desse modo, avaliamos por citometria de fluxo (*side-scatter*) a granulosidade de neutrófilos extraídos do fígado de animais tratados ou não com APAP (FIG. 16B). Observamos que neutrófilos hepáticos de animais intoxicados tem uma redução da média de granulosidade celular. Em maior detalhe, percebe-se que a porcentagem de neutrófilos com granulosidade média caiu, juntamente com o aumento da porcentagem de células com granulosidade baixa, sugerindo que neutrófilos estão liberando material de seus grânulos dentro do fígado durante a DILI.

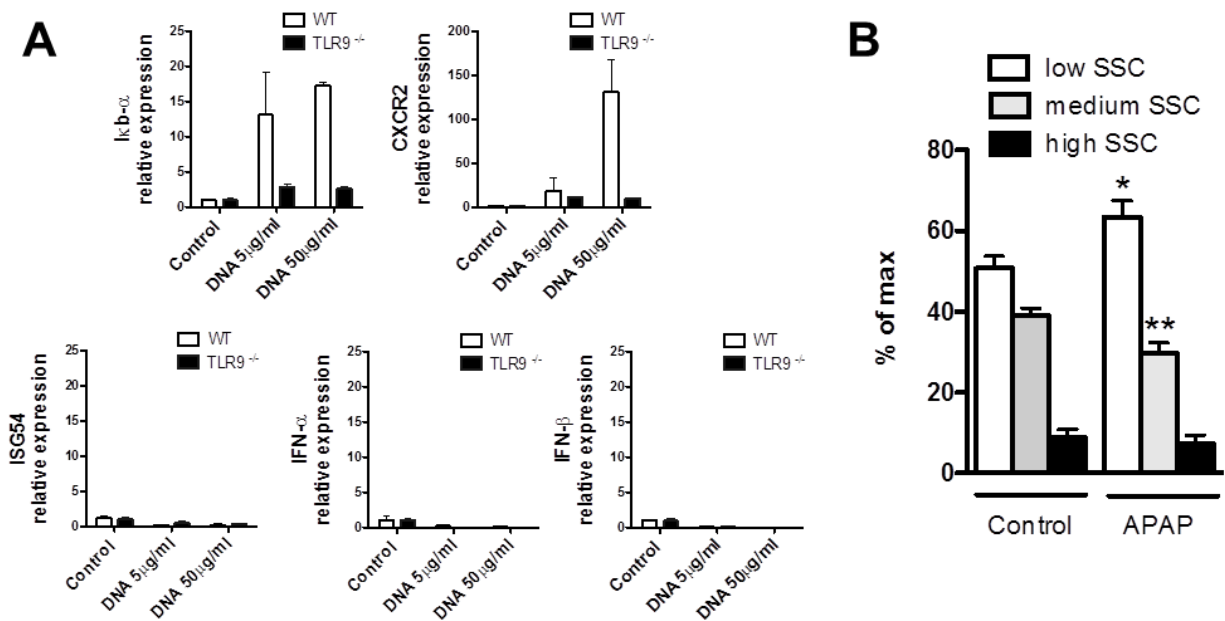


Figura 17 – Detecção de DNA hepático por neutrófilos é dependente de TLR9 e leva ao aumento de expressão de genes pró-inflamatórios e redução da granulocidade

(A) Expressão relativa medida por PCR quantitativo e normalizada a GAPDH de *Ikb-α*, *CXCR2*, *ISG54*, *IFN-α* e *IFN-β* em neutrófilos selvagens e deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) estimulados com DNA de fígado (5 ou 50 μg/ml) por 4 horas. (B) Avaliação de granulocidade por citometria de fluxo (*side-scatter*) de neutrófilos hepáticos. Foi plotada a porcentagem de neutrófilos com alta, média e baixa granulocidade de seu citoplasma, de animais tratados ou não com APAP (600mg/kg).

4.18 ELIMINAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE DNA OU DA DETECÇÃO POR TLR9 REDUZEM SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA, O INFILTRADO DE NEUTRÓFILOS E A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RESPOSTA A APAP

Após explorarmos a cinética da deposição de DNA durante a DILI e de sua detecção pelo sistema imune, faltava determinar se esse fenômeno envolvendo DNA poderia ter alguma relevância biológica, especialmente na severidade da lesão hepática por APAP. Para isso, realizamos experimentos com camundongos TLR9^{-/-} ou pós-tratados de 6 em 6 horas com 1000U de DNASE1, a fim de eliminar a deposição de DNA no fígado. Em ambos os casos, o nível de lesão hepática, a porcentagem de zonas de necrose e a quantidade de DNA intravascular foram significativamente reduzidos (FIG. 18A-C). Esta redução estava associada à diminuição da produção de TNF- α e CXCL1, dois potentes mediadores pró-inflamatórios, e à inibição do recrutamento de neutrófilos para o interior das zonas de necrose (FIG. 18D-F). A utilização de um fármaco bloqueador de TLR9 (E6446) também foi capaz de reduzir a lesão hepática e a deposição de DNA em resposta a APAP, mesmo se administrado 6 horas após a intoxicação (FIG. 18G,H), corroborando nossos resultados com DNASE1.

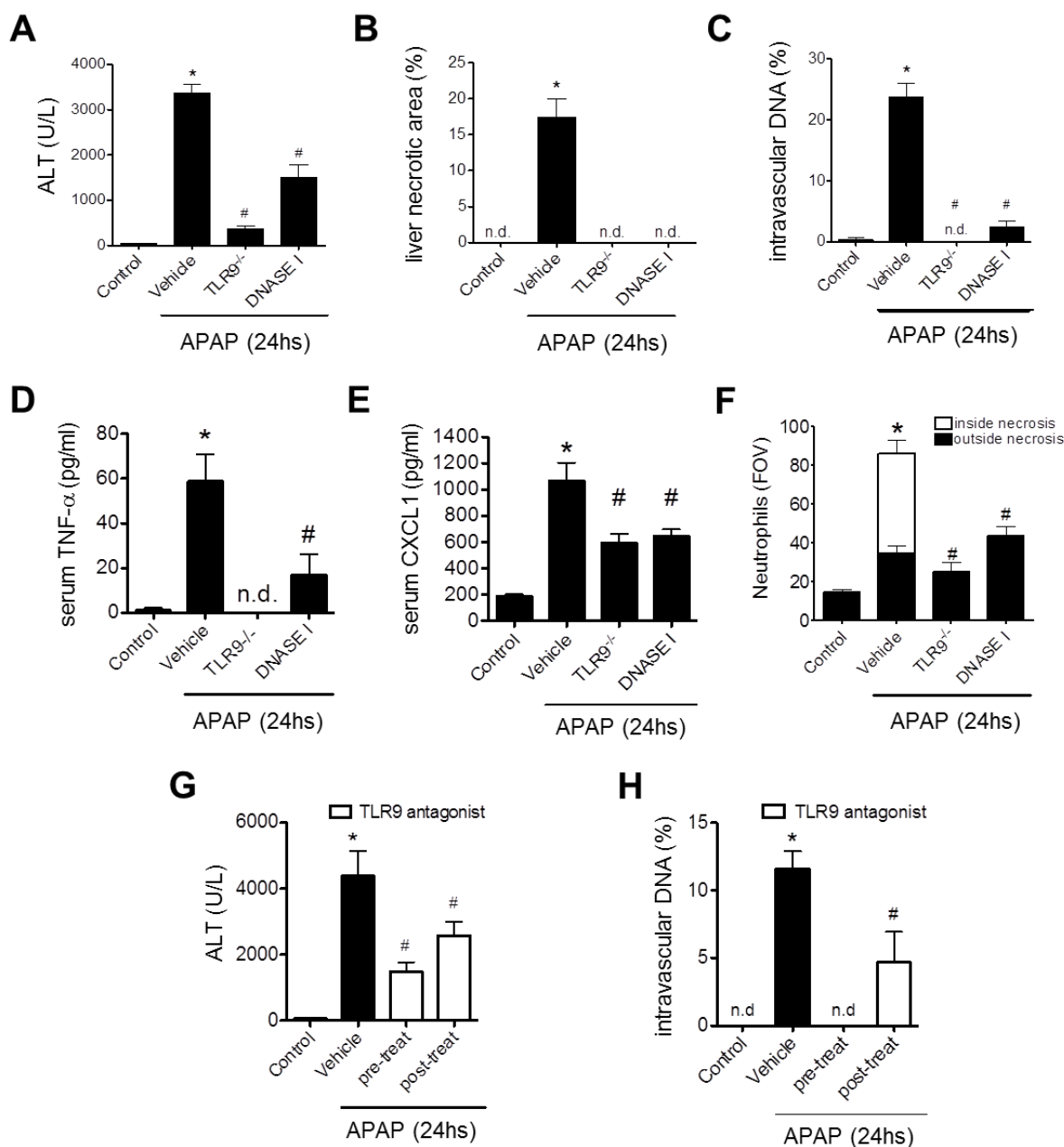


Figura 18 – Eliminação de depósitos de DNA ou bloqueio da detecção via TLR9 reduzem significativamente a lesão hepática e inflamação induzida por APAP

(A) Valores de ALT de camundongos tratados com APAP (600mg/kg) por 24 horas em comparação com animais deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) ou pós-tratados com DNASE1 (3 doses de 1000U), também intoxicados por APAP. (B) Porcentagem de área necrótica e de (C) deposição de DNA intravascular no fígado, medida por IVM. (D, E) Níveis de TNF- α e CXCL1 no soro. (F) Contagem de neutrófilos dentro e fora das necroses hepáticas, por IVM. (G) Valores de ALT e de (H) área com DNA intravascular hepática de animais tratados com antagonista de TLR9 (E6446; 2.5mg/animal). * = $p < 0.05$ em relação ao controle; # = $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo.

4.19 BLOQUEIO DO ACÚMULO DE DNA OU DE SEU RECONHECIMENTO POR TLR9 CAUSA REDUÇÃO SIGNIFICATIVA DA NECROSE HEPÁTICA POR APAP

Coletamos amostras de fígado dos camundongos para uma observação direta dos efeitos protetores da ausência de TLR9, e dos tratamentos com DNASE1 ou E6446. Cortes histológicos do fígado corados por H&E mostraram que o fenótipo protetor indicado pelos níveis reduzidos de ALT, depósitos de DNA hepático e inflamação realmente correlacionam com um menor nível de necrose e alterações morfológicas do fígado em resposta a intoxicação por APAP (FIG. 19).

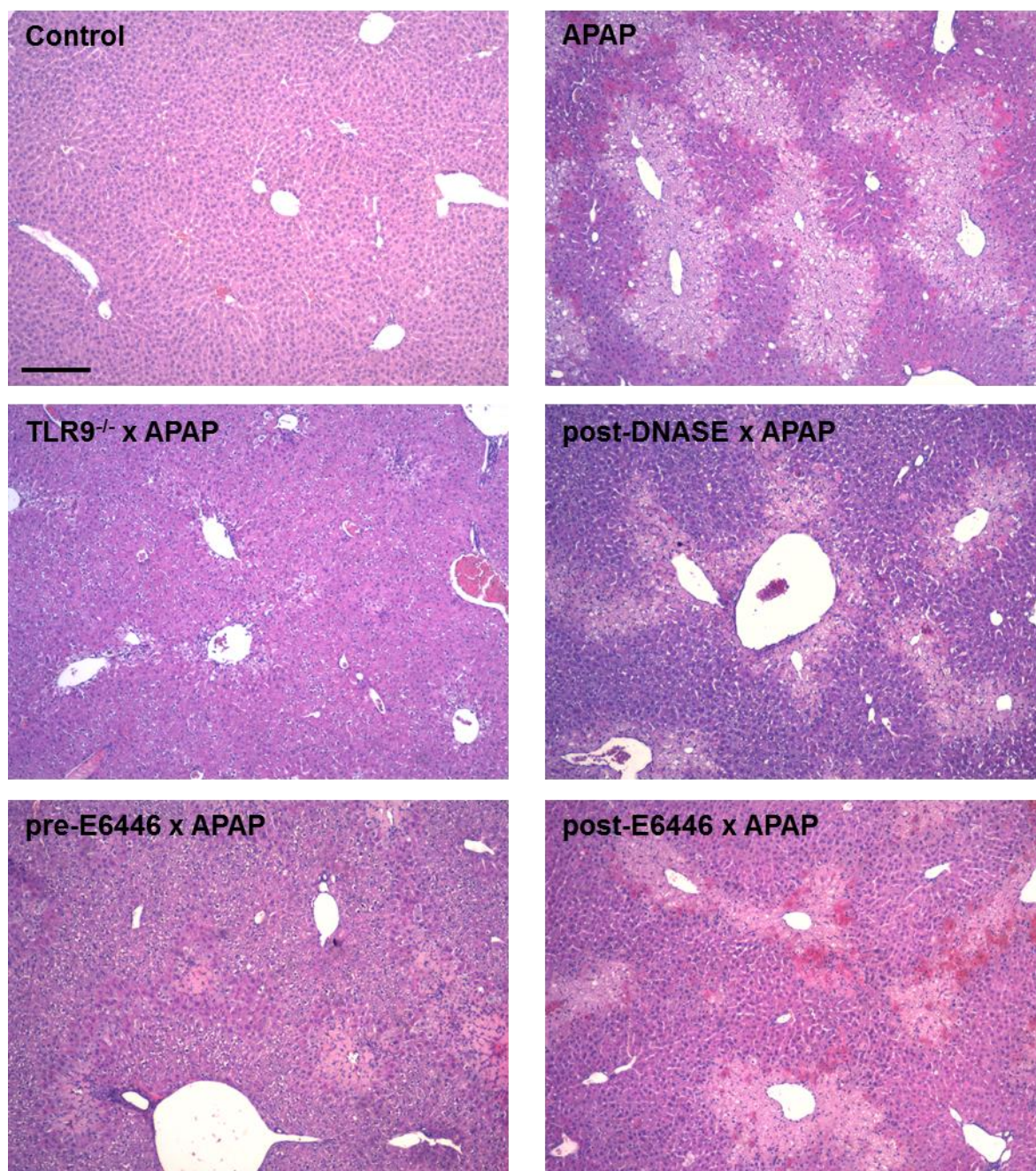


Figura 19 – Cortes histológicas de fígado corados por H&E, evidenciando os efeitos protetores do bloqueio da detecção de DNA ou de sua eliminação durante a lesão hepática por APAP

Histologia de fígado (H&E) de camundongos intoxicados com APAP (600mg/kg, 24 horas). Utilizamos camundongos deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) ou tratamos camundongos selvagens com DNASE1 (3000U/animal) ou com o antagonista de TLR9 E6446 (2.5mg/animal). Escala: 200µm.

4.20 DNA E TLR9 NÃO PARTICIPAM DA LESÃO INDUZIDA POR APAP EM HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS

A liberação de DNA tem sido descrita como prejudicial em diferentes condições (CLARK *et al*, 2007; KESSENBROCK *et al*, 2009; XU *et al*, 2009; FUCHS *et al*, 2010), assim, seria possível que o acúmulo de DNA durante a lesão hepática pudesse danificar diretamente os hepatócitos. Desse modo, purificamos hepatócitos de camundongos selvagens (WT) e deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) e os incubamos com APAP. Observamos que hepatócitos TLR9^{-/-} apresentam acúmulo de DNA aberrante do mesmo modo que hepatócitos WT (FIG. 20A), e que a perda de viabilidade causada por APAP não é reduzida pela ausência de TLR9 ou pelo tratamento com DNASE1 (FIG. 20B). Além disso, a incubação de hepatócitos WT com DNA purificado de fígado não causou perda de viabilidade celular (FIG. 20C). Em seguida, avaliamos se hepatócitos alteravam a expressão gênica de modo similar a neutrófilos (FIG. 17). O tratamento de hepatócitos com APAP, que induz a liberação de DNA para o meio extracelular, ou com o ácido nucleico sintético poli I:C, um agonista de TLR3 usado como controle positivo para indução de IFN tipo I, não foi capaz de induzir aumento da expressão de nenhum dos genes avaliados (FIG. 20D). Em suma, nossos dados sugerem que hepatócitos são insensíveis ao DNA aberrante, e que o eixo DNA-TLR9 é irrelevante durante a toxicidade por APAP nestas células *in vitro*.

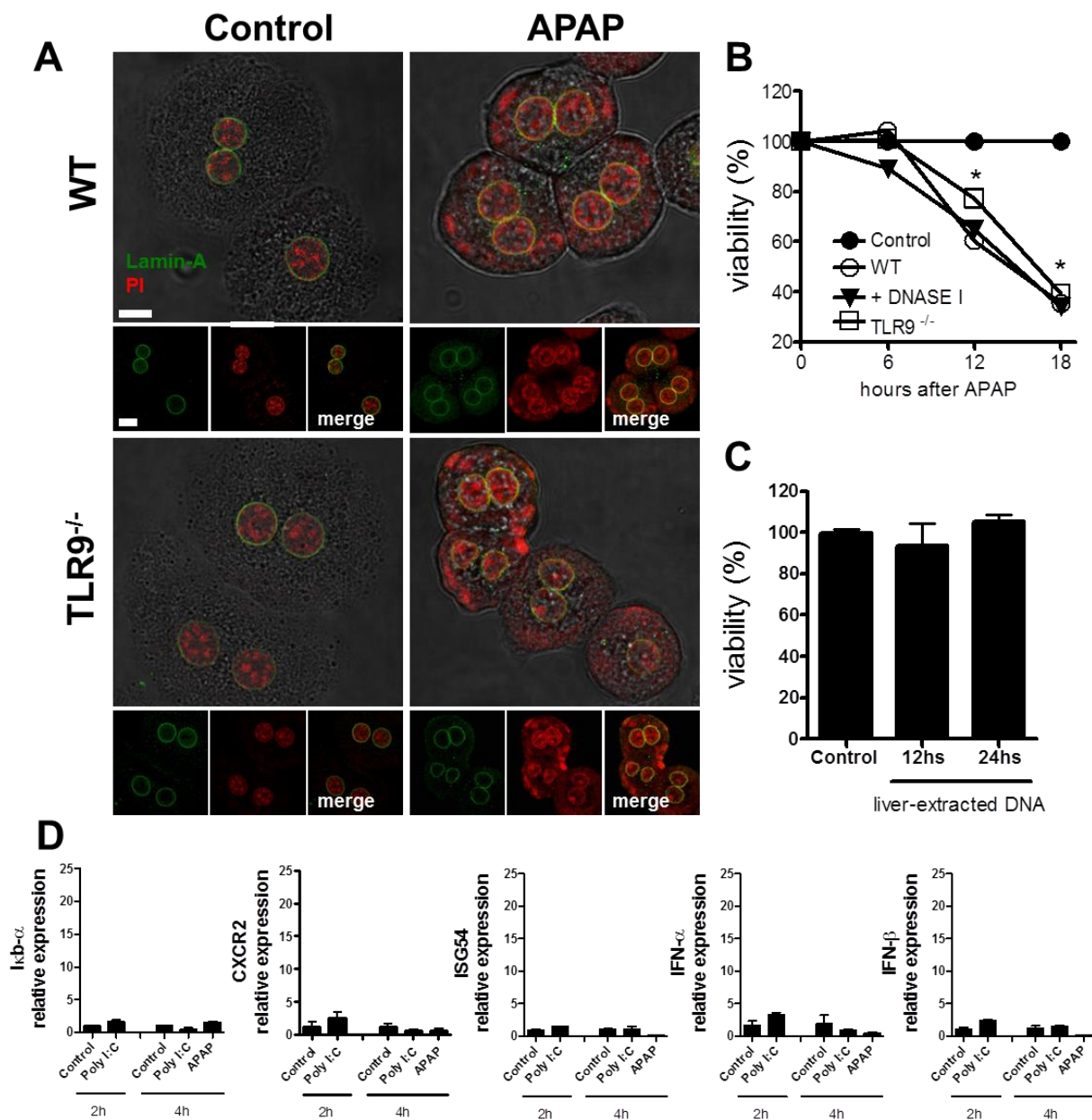


Figura 20 – DNA e TLR9 não participam do dano causado por APAP em hepatócitos primários isolados

(A) Imunofluorescência de hepatócitos corados com PI e anti-lamina-A para evidenciar DNA e núcleos, respectivamente. Os hepatócitos selvagens (WT) ou deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) foram incubados por 4 horas com APAP a 20mM. (B) Viabilidade por MTT de hepatócitos incubados com APAP, comparados a hepatócitos TLR9^{-/-} ou tratados com DNASE1 (10U). (C) Viabilidade de hepatócitos WT incubados com DNA de fígado (50 μ g/ml). (D) Expressão relativa, medida por PCR quantitativo, de I κ B- α , CXCR2, ISG54, IFN- α e IFN- β em hepatócitos selvagens estimulados com Poli I:C (100 μ g/ml) ou APAP (20mM). Escala: 10 μ m; * = p<0.05.

4.21 CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM TLR9 DESENVOLVEM A LESÃO TÓXICA INICIAL POR APAP, MAS ELA NÃO PROGRIDE DEVIDO A SUA RESPOSTA INFLAMATÓRIA REDUZIDA

Na área da toxicologia, é comum a avaliação metabólica de animais geneticamente modificados para garantir que a deleção gênica não previna a toxicidade de substâncias (NI *et al*, 2012; WILLIAMS *et al*, 2013). Um dos métodos para avaliar isso é a dosagem de glutathiona reduzida (GSH), que é rapidamente eliminada da célula em caso de intoxicação por APAP (HINSON *et al*, 2010). Observamos que 2 horas após a administração de APAP, camundongos deficientes em TLR9 sofrem a mesma perda de GSH que camundongos WT, indicando que não há alteração metabólica que justifique o fenótipo protegido do animal TLR9^{-/-} (FIG. 21A). Porém, ao checarmos o grau de lesão hepática neste momento precoce (2h), percebemos que os valores de ALT entre os grupos WT e TLR9^{-/-} eram similares (FIG. 21B). No entanto, observamos que o nível de lesão hepática de animais WT progride ao longo do tempo (24h), enquanto que a lesão de camundongos TLR9^{-/-}, que apresentam inflamação hepática reduzida (FIG. 18,19), se mantém essencialmente a mesma durante todo o período (FIG. 21B).

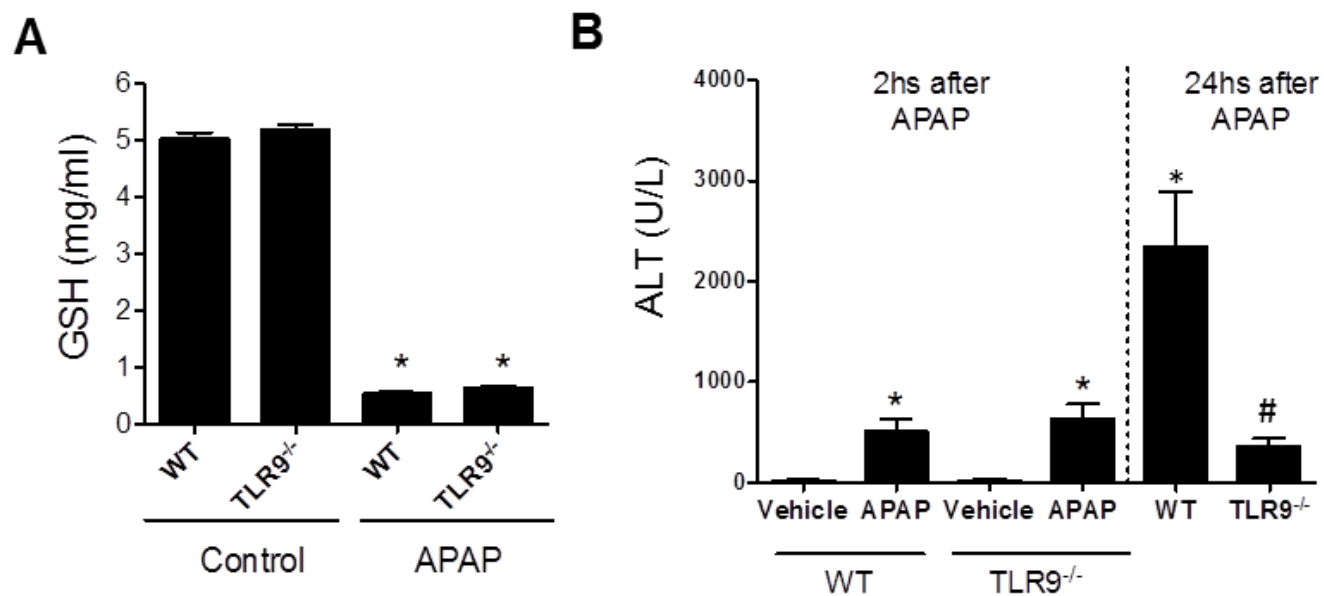


Figura 21 – A ausência de TLR9 bloqueia a progressão da lesão hepática por APAP

(A) Dosagem de glutatona reduzida no fígado de camundongos tratados ou não com APAP (600mg/kg) por 2 horas.

(B) Nível de ALT sérica de camundongos tratados por 2 ou 24 horas com APAP. WT indica camundongos selvagens e TLR9^{-/-} indica camundongos geneticamente deficientes para o receptor TLR9. * = p<0.05 em relação ao controle; # = p<0.05 em relação ao grupo 24 horas WT.

4.22 A EXPRESSÃO DE TLR9 EM NEUTRÓFILOS É UMA PEÇA FUNDAMENTAL NA PATOGÊNESE DA LESÃO HEPÁTICA POR APAP

Para determinar melhor o papel de neutrófilos no desenvolvimento da lesão hepática por APAP, administramos a sobredose do medicamento em camundongos WT e TLR9^{-/-} e os injetamos por via endovenosa com neutrófilos selvagens purificados, 6 horas após APAP. Observamos que a adição de neutrófilos circulantes não causou lesão hepática em camundongos WT controle. Entretanto, a adição de neutrófilos a camundongos WT desafiados com APAP (WT PMN > WT) agravou significativamente a lesão hepática na 24^a hora, e foi capaz de abolir completamente o fenótipo protegido de animais TLR9^{-/-} (WT PMN > TLR9^{-/-})(FIG. 22). Estes dados são evidência de que neutrófilos expressando o receptor TLR9 funcional são fundamentais para o agravamento da lesão hepática induzida por APAP.

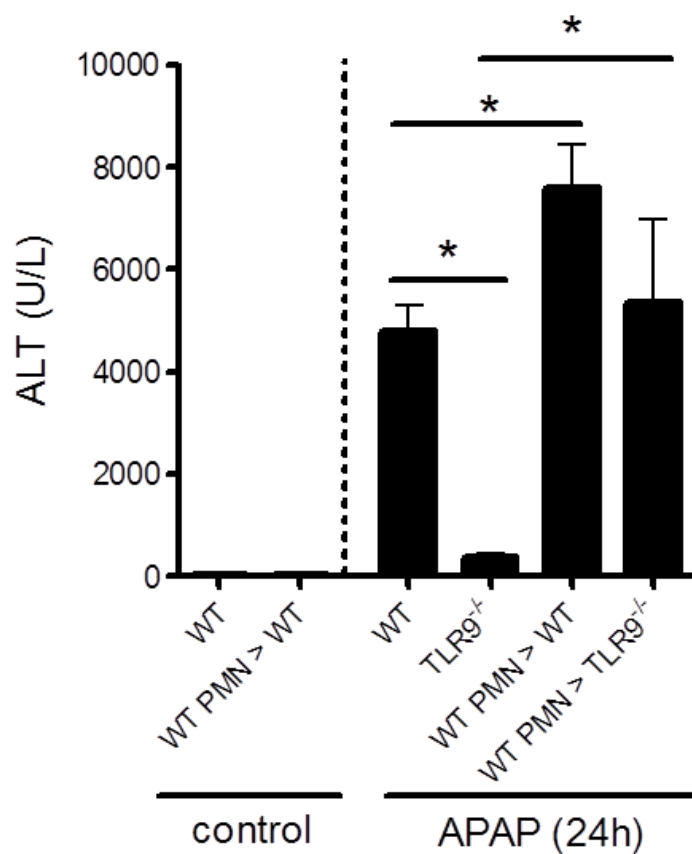


Figura 22 – A amplificação da lesão hepática após intoxicação por APAP é causada por neutrófilos expressando TLR9 funcional

Experimento de transferência adotiva de neutrófilos (WT PMN; 4×10^6 células/animal) para camundongos controle ou tratados com APAP (600mg/kg) por 24 horas. Utilizamos animais selvagens (WT) ou geneticamente deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) como receptores. Os neutrófilos foram obtidos de camundongos selvagens saudáveis e aplicados por via endovenosa 6 horas após a intoxicação. A lesão hepática foi estimada pela atividade de ALT sérica; * = $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

O excesso de APAP é um evento grave que leva à perda de organização e processos enzimáticos dos hepatócitos, culminando na sua morte necrótica. Neste trabalho descrevemos uma nova etapa deste processo lesivo, cujas consequências amplificam a lesão hepática muito tempo após o insulto tóxico inicial, via ativação do sistema imune. Durante a DILI, o hepatócito perde controle de sua compartimentalização e inicia um acúmulo de DNA aberrante no citoplasma, que acaba sendo liberado para o meio extracelular. *In vivo*, este processo ocasiona a formação de depósitos de DNA intravasculares e zonas de necrose, que são prontamente reconhecidos pelo sistema imune e induzem recrutamento de neutrófilos e produção de mediadores pró-inflamatórios. Neutrófilos são peças-chave deste processo, pois se acumulam especificamente em zonas necróticas ricas em DNA e são capazes de reconhecê-lo via receptor TLR9 expresso em sua superfície. O acúmulo de DNA e sua detecção por TLR9 são etapas fundamentais da lesão hepática por APAP, pois a eliminação dos depósitos com DNASE1 ou o bloqueio de TLR9 reduzem significativamente a lesão hepática e a inflamação tecidual.

O nosso estudo se iniciou com o uso de hepatócitos primários, o padrão-ouro para pesquisa de DILI *in vitro* (VINKEN et al, 2013). Mesmo sendo células de vida curta, é o modelo que mantém mais fielmente as capacidades metabólicas e funcionais encontradas *in vivo*. Usando estas células, nós recriamos experimentos de toxicidade hepatocelular já bem descritos na literatura, como a incubação com APAP e TAA, onde observamos perda de viabilidade e alterações morfológicas (FIG. 1,2). Entretanto, utilizando 3 técnicas de visualização que diferem completamente em princípio (reação de Feulgen; contrastação para microscopia eletrônica; imunofluorescência) nós descrevemos pela primeira vez o fenômeno de DNA aberrante em hepatócitos (FIG. 1-3,8). O tempo de observação empregado nos experimentos foi determinante para a visualização de DNA aberrante, visto que qualquer processo de vesiculação, acúmulo ou secreção inexistem em células mortas ou terminalmente danificadas. Assim, avaliamos os hepatócitos sempre nos intervalos de 4 a 6 horas após APAP, onde a perda de viabilidade é pequena, para justamente observarmos fenômenos e alterações morfológicas que precedem a morte das células.

A presença de vesículas positivas para DNA na periferia nuclear, contendo material morfológicamente caracterizado como cromatina (associação com histonas), e em alguns casos

positiva para lamina-A (FIG. 1-3) sugere que o DNA aberrante se origina do núcleo, e não de mitocôndrias. Por outro lado, a proporção de vesículas positivas para lamina-A é bastante baixa, indicando que o DNA estaria associado a vesículas contendo outras proteínas durante seu extravasamento, ou simplesmente sairia do núcleo sem a necessidade de fragmentação do envelope nuclear. Outros experimentos poderiam ser feitos para determinar com clareza a origem do DNA aberrante, como por exemplo, verificar por imunofluorescência se há co-localização com histonas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ou mesmo identificá-lo por meio de sequenciamento para genes nucleares e mitocondriais. De qualquer maneira, o DNA aberrante poderia também se originar de ambas as organelas, afinal o dano por APAP é difuso no hepatócito (JAESCHKE & BAJT, 2006). Mas vale lembrar que DNA nuclear e mitocondrial possuem tamanho, modificações epigenéticas e imunogenicidade bastante distintas (WATANABE *et al*, 2007; ZHANG, Q. *et al*, 2010; PALUDAN & BOWIE, 2013), e tais propriedades podem ser individualmente responsáveis por diferentes componentes da lesão hepática, deposição de DNA, e do processo inflamatório que observamos nos camundongos.

O envelope nuclear possui duas membranas e uma cisterna entre elas, criando continuidade entre ele e o retículo endoplasmático (RE) distribuído por todo o hepatócito (SUSKI *et al*, 2014). Uma possível via para o surgimento do DNA aberrante seria justamente seu vazamento para as cisternas do envelope nuclear e conseqüentemente para o RE, onde se manteria circunscrito por membrana e com relativa aparência vesicular. Este acesso poderia também ser o caminho pelo qual o DNA chega ao meio extracelular sem necessariamente haver a morte da célula, pois o RE pode em certos casos formar continuidade com a membrana plasmática (ZHANG, S. L. *et al*, 2005; HELLE *et al*, 2013). Do mesmo modo, uma vez que o DNA esteja acumulado no RE ele poderia entrar na via secretória do hepatócito, sendo encaminhado em vesículas ao complexo de Golgi e posteriormente ao meio extracelular.

Notamos em experimentos *in vitro* e *in vivo* (FIG. 2,8) que a quantidade de DNA aberrante correlaciona diretamente com a dose de APAP. Isso faz sentido visto que quanto maior a dose do medicamento, maior a lesão e maior a desestabilização do hepatócito. Apesar disso, existe um limite mínimo para a ocorrência de DNA aberrante, sendo seguro dizer que este fenômeno só acontece em hepatócitos e fígados com alto grau de lesão. Em situações de pouca lesão hepática, a maioria dos hepatócitos conseguiria manejar o estresse da intoxicação, acarretando em pouca ou nenhuma liberação de DNA. Além disso, o fígado é fonte de grande

parte da DNASE1 sérica (LUDWIG *et al*, 2009), dessa maneira, necessitaríamos de um dano hepático considerável para que a secreção de DNASE1 caísse e houvesse condições para que a deposição de DNA acontecesse. Ao avaliarmos a atividade de DNASE do soro de camundongos tratados com APAP, não observamos diferença na capacidade de degradar DNA em comparação com soros controle (FIG. 9), indicando que a atividade de DNASE sérica não parece ser alterada pela lesão por APAP. Em conjunto, acreditamos que a deposição de DNA no fígado seja uma consequência da liberação de grandes quantidades de DNA pelos hepatócitos lesados, o que supera a capacidade de sua eliminação por DNASE e fagocitose, permitindo seu acúmulo no fígado. Corroborando essa linha de raciocínio, no tempo 48h após APAP já não há mais nenhuma deposição de DNA intravascular no fígado (FIG. 7), sugerindo que este é um fenômeno reversível e restrito à fase aguda da lesão hepática.

A morte de hepatócitos e o fenômeno de DNA aberrante não parecem ser relacionados a apoptose, como demonstrado na figura 4. Tal afirmação é apoiada também por dados previamente publicados (MCGILL & JAESCHKE, 2013) e pelo fato que a aplicação de jejum nos animais é capaz de alterar o tipo de morte dos hepatócitos frente a um desafio tóxico (ANTOINE *et al*, 2010). Foi demonstrado que animais não jejuados possuem maiores níveis de GSH e ATP no fígado, o que permite que eles resistam melhor ao desafio, mas também tenham condições energéticas para iniciar a morte por apoptose se necessário. Isto leva a uma menor lesão tecidual e parâmetros inflamatórios reduzidos (ANTOINE *et al*, 2010). Desse modo, como nossos experimentos são feitos em camundongos jejuados, isto reforça a ausência de apoptose em nosso modelo e novamente relaciona o fenômeno de DNA aberrante como um descontrole celular grave e associado à morte necrótica de hepatócitos.

Apesar do que parece, o fígado não é um órgão homogêneo. Os próprios hepatócitos são funcionalmente diferentes ao longo do lóbulo hepático, onde o repertório enzimático varia de acordo com os níveis de oxigênio e nutrientes no fluxo sinusoidal (JUNGERMANN & KIETZMANN, 1996). Isto faz com que hepatócitos próximos à veia centrolobular expressem altos níveis das enzimas P450, tornando-os mais susceptíveis a hepatotoxinas como APAP. A necrose centrolobular é inclusive um padrão morfológico para o diagnóstico de DILI, e, visto que encontramos tanto em histologia quanto em microscopia intravital essas múltiplas áreas de necrose (FIG. 5,7), isto valida nosso modelo. Em nossas mãos, a lesão por APAP é grave e parece refletir o estado hepático de pacientes sofrendo de DILI e que progridem para FHA. Isto é

corroborado pelo padrão de necrose, pela mortalidade dos camundongos e por níveis de ALT superiores a 50 vezes os valores basais (FIG. 5)(BERNAL *et al*, 2010).

É importante notar que a deposição de DNA no fígado correlacionou positivamente e precedeu a lesão hepática por APAP (FIG. 6,7). Isto já era claro na 6ª hora, quando encontramos deposição de DNA intravascular na fase inicial da lesão. À medida que o dano hepático se tornava mais significativo, a deposição de DNA intravascular foi acompanhada de múltiplas zonas de necrose, fazendo com que a média da área tecidual coberta por DNA chegasse a quase metade da área total do fígado (FIG. 7). A localização dos depósitos também merece atenção, pois à primeira vista eles parecem irradiar das zonas de necrose para dentro dos sinusóides. Porém, lembrando o fluxo sanguíneo no lóbulo hepático, o sangue faz o exato caminho oposto, saindo da borda do lóbulo e indo em direção à zona centrolobular necrosada. Isso sugere que o DNA foi liberado por hepatócitos ainda viáveis nas áreas mediais e perilobulares, e arrastado pelo fluxo formando as fibras intravasculares que observamos (FIG. 7,8). Isto nos lembra que este fenômeno não é restrito às zonas de necrose centrolobulares, ocorrendo em quase todos os compartimentos microscópicos do fígado (dentro das veias centrolobulares e sinusóides, ao redor dos hepatócitos e no espaço de Disse, na cápsula de Glisson). Desse modo, podemos ponderar que a lesão é generalizada, e apesar de menos sensíveis a hepatotoxinas, até hepatócitos perilobulares sofrem com intoxicação por APAP.

A comprovação que os depósitos de DNA podem ser visualizados com vários corantes de DNA *in vitro* e *in vivo* (PI, NucRed, Sytox, DAPI; FIG. 2,3,6,7) e que o fenômeno é estimulado por outros agentes causadores de DILI, como a tioacetamida (FIG. 13), reduz a possibilidade de que estejamos vendo algum tipo de artefato ou algo que não seja DNA. Além disso, exploramos preliminarmente a ocorrência de DNA aberrante em outros modelos de doença hepática, como na endotoxemia induzida por LPS, no modelo de sepse por ligadura e punção cecal (CLP) e na malária por *Plasmodium chabaudi*. Em todos os casos encontramos deposição de DNA hepática, ainda que em quantidades inferiores em comparação a APAP ou TAA (dados não mostrados). Visto que estes são modelos de lesão hepática indireta e de baixo grau, isto sugere que o limitante para a ocorrência de DNA aberrante é a severidade do dano ao fígado e não a natureza química ou microbiológica do agente lesivo (FIG. 2,8,13). Interessantemente, um fenômeno similar de acúmulo de DNA citoplasmático foi descrito em tireócitos em resposta à lesão elétrica (KAWASHIMA *et al*, 2011). Neste trabalho, os autores também demonstraram uma relação

direta entre o nível de lesão estéril e a quantidade de DNA citoplasmático. Além disso, a presença de DNA no citoplasma induziu expressão significativa de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e perda de função dos tireócitos. Desse modo, há pretexto para a ocorrência de DNA aberrante e deposição em outros órgãos, além de sua possível participação no desenvolvimento de doenças nestes tecidos.

A ocorrência de estresse celular e liberação de DAMPs em escala tão grande como a observada certamente desencadearia uma resposta imune intensa. Para iniciar nossos estudos nessa área, visualizamos dois dos leucócitos mais abundantes durante a lesão hepática, a KC e o neutrófilo (FIG. 10). O fato de KCs estarem fora das zonas de necrose e sua eliminação não alterar a lesão por APAP indica que elas não participam diretamente na patogênese da DILI. Além do mais, como KCs são consideradas células imóveis (DAVIES *et al*, 2013), é bastante provável que elas estejam mortas dentro dos focos necróticos. Outros trabalhos demonstraram que KCs são necessárias para a regeneração do fígado através da produção de TNF α e IL-6, citocinas necessárias para iniciar proliferação de hepatócitos (HINSON *et al*, 2010). Corroborando esta informação, a eliminação de KCs aumentou a gravidade de DILI em momentos tardios (JU *et al*, 2002). Por outro lado, o papel de neutrófilos parece ser exatamente o oposto, pois são prontamente recrutados para o fígado lesado e sua eliminação sabidamente reduz a DILI por APAP (FIG. 10)(LIU, Z. X. *et al*, 2006), indicando a provável participação na patogênese da lesão hepática.

Nossas observações sobre o posicionamento e movimentação dos neutrófilos foram uma peça essencial ao entendimento das consequências imunológicas do acúmulo de DNA aberrante. É interessante notar que a chegada de neutrófilos coincide perfeitamente com presença de lesão hepática e depósitos de DNA (FIG. 5-7), e que o número de neutrófilos no fígado é composto principalmente pelo seu aumento dentro das zonas necróticas (FIG. 10,11). Esse tropismo pela zona necrótica rica em DNA é apoiado pela movimentação intensa que neutrófilos realizam para estas zonas e posteriormente dentro delas. Eles patrulham rapidamente e continuamente as necroses, mas sem qualquer direcionamento ou objetivo aparente (FIG. 11). Isto é dificilmente explicado pela teoria da dessensibilização dos receptores, pois os neutrófilos que chegaram ao local com concentração máxima de agente quimiotático (necrose) não cessaram sua migração (GRIFFITH *et al*, 2014). Isso sugere que os neutrófilos estariam realizando algum tipo de função nestas áreas. A teoria vigente é que eles fazem a remoção de restos teciduais, entretanto, dados

comprovando esta informação *in vivo* são muito escassos. A movimentação errática dos neutrófilos também poderia ser consequência de um estado excessivamente ativado em resposta ao grande conteúdo necrótico e citocinas pró-inflamatórias, abrindo possibilidade para que esse seja o momento (12-24h) e o local onde o dano tecidual mediado por neutrófilos acontece e se propaga.

Levando em conta que neutrófilos se movimentam dentro de uma malha vascular complexa dentro do fígado e migram especificamente para dentro das zonas necróticas, é de se esperar que mecanismos adesivos e quimiotáticos estejam envolvidos (LEY *et al*, 2007). A busca por um mecanismo molecular para o recrutamento de neutrófilos é complicada, pois outra particularidade do fígado é que leucócitos não realizam rolamento durante a migração em capilares sinusóides, uma etapa necessária para o recrutamento de leucócitos na maioria dos tecidos (HICKEY & WESTHORPE, 2013; JENNE & KUBES, 2013). Isto é corroborado pelo perfil normal de leucócitos hepáticos em camundongos deficientes para as proteínas encarregadas de promover o rolamento, as L- e P-selectinas (WONG *et al*, 1997).

Dessa maneira, avaliamos duas classes de moléculas que participam da adesão de neutrófilos, as integrinas $\beta 2$ e ácido hialurônico, mas elas parecem não participar do recrutamento destas células durante a lesão hepática por APAP (FIG. 12). A molécula CD18 é a subunidade β que forma a classe de integrinas $\beta 2$ funcionais (CD11a,b,c / CD18), responsáveis pela adesão de neutrófilos à maioria dos tecidos. Demonstramos que o bloqueio de CD18 não interferiu na chegada de neutrófilos ao fígado necrótico ou na gravidade da lesão, e considerando que camundongos deficientes em CD18 também não apresentam alteração nestes dois parâmetros (WILLIAMS *et al*, 2010), descartamos sua participação no modelo. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano muito abundante no endotélio sinusoidal e que já foi associado ao recrutamento de neutrófilos para o fígado durante a sepse (MCDONALD *et al*, 2008). No entanto, o tratamento com a enzima HNase, capaz de degradá-lo, não surtiu alteração no acúmulo de neutrófilos no fígado (FIG. 12). Assim, outros experimentos devem ser realizados para seguramente excluir a participação de ácido hialurônico na DILI, como o bloqueio de seu respectivo receptor em neutrófilos, o CD44, ou a indução de lesão por APAP em um animal deficiente em CD44.

Considerando que selectinas, integrinas e ácido hialurônico aparentemente não participam da adesão de neutrófilos ao fígado necrosado, é possível que este processo esteja acontecendo por

simples retenção mecânica das células. Nem mesmo o DNA aberrante parece estar envolvido na adesão de neutrófilos, pois uma injeção de DNASE1 endovenosa não foi capaz de remover os neutrófilos já aderidos no fígado (dados não mostrados). Além disso, ocorre onchese (inchaço) em LSECs e hepatócitos durante a DILI, o que diminui significativamente o diâmetro dos sinusóides e reduz ainda mais a velocidade do fluxo em seu interior (ITO *et al*, 2003), permitindo a retenção dos leucócitos no fígado sem a necessidade de mecanismos moleculares.

Em contraste com os mecanismos adesivos, o bloqueio dos receptores quimiotáticos CXCR2 e FPR1, descritos como necessários para o recrutamento de neutrófilos durante a lesão hepática estéril (MCDONALD *et al*, 2010), inibiu significativamente o acúmulo de neutrófilos (FIG. 12). É interessante notar que o bloqueio de ambos receptores reduziu principalmente o número de neutrófilos no interior das zonas necróticas, e também causou a redução da área de necrose total, portanto, do nível de lesão hepática dos animais. Isto reforça a contribuição direta de neutrófilos para o agravamento da DILI por APAP e corrobora dados previamente publicados (MARQUES *et al*, 2012). CXCR2 é um dos receptores quimiotáticos mais importantes em neutrófilos, e seu bloqueio já é alvo para o desenvolvimento de fármacos para várias doenças (BERTINI *et al*, 2012). Além disso, uma consequência favorável do bloqueio de CXCR2 é a provável inibição do egresso de neutrófilos da medula óssea (GRIFFITH *et al*, 2014), fornecendo uma eficácia dupla para evitar a chegada de neutrófilos ao sítio alvo. Outra observação de interesse é a redução dos depósitos de DNA intravascular nos camundongos tratados com o bloqueador de FPR1 (FIG. 12), um receptor conhecido por estimular a ativação e liberação de conteúdo tóxico por neutrófilos (YE *et al*, 2009). Levando em conta que a quantidade de DNA intravascular é proporcional ao dano hepático, isto indica que FPR1 pode ser um receptor envolvido no dano mediado por neutrófilos ao fígado. No entanto, isso deve ser interpretado com cautela, pois o receptor FPR1 também está presente em outras populações celulares como KCs e hepatócitos (YE *et al*, 2009), podendo ter um efeito protetor indireto nestas células.

Levando em conta a presença abundante de neutrófilos e DNA simultaneamente no fígado, inicialmente especulamos que os depósitos de DNA hepático seriam NETs. No entanto, vários dados indicaram que esse não era o caso. Primeiramente, não encontramos nenhuma marcação positiva para a proteína mais aceita na identificação de NETs, a elastase de neutrófilo, tanto nos depósitos de DNA quanto em outras áreas do fígado (FIG. 15). Além disso, NETs são descritas *in vivo* exclusivamente em condições infecciosas, como abscessos (YIPP *et al*, 2012),

infecções virais (SAITOH *et al*, 2012) e sepse (MCDONALD *et al*, 2012), o que contrasta diretamente com a nossa comprovação que DILI ocorre em condição estéril e na ausência de translocação bacteriana (FIG. 14). Por fim, uma redução de 50% do número de neutrófilos hepáticos pelo bloqueio de CXCR2 não alterou a deposição de DNA intravascular (FIG. 12). Em conjunto, estes dados sugerem que neutrófilos não são a principal fonte do DNA acumulado no fígado. Apesar dos indicativos que depósitos de DNA originam de hepatócitos, outras populações celulares hepáticas provavelmente também contribuem com o fenômeno. Por exemplo, células de Ito e KCs mortas dentro das necroses podem somar à massa total de DNA nessas áreas. Além disso, LSECs são sensíveis à intoxicação por APAP e sua lesão antecede à dos próprios hepatócitos (DELEVE *et al*, 1997; ITO *et al*, 2003), colocando-as como uma provável fonte dos depósitos de DNA intravasculares no desenvolvimento de DILI.

O envolvimento profundo de neutrófilos com o DNA depositado no fígado necrótico nos levou a pensar que eles poderiam detectar este material. Com este raciocínio, descobrimos que neutrófilos infiltrados no fígado não só possuem o receptor TLR9, como também se localiza na membrana plasmática e tem a expressão aumentada durante a DILI (FIG. 16). O TLR9 é normalmente encontrado no compartimento endossomal (TAKEUCHI & AKIRA, 2010), mas sua expressão na membrana plasmática de neutrófilos foi recentemente descrita (LINDAU *et al*, 2013). Estes pesquisadores também demonstraram que o TLR9 de superfície é funcional, pois a ativação exclusiva do receptor neste local pelo agonista CpG (DNA enriquecido em citidina-fosfato-guanosina) induziu uma produção significativa de IL-8. Nesta linha, o grupo de Gregory Barton investigou as consequências da presença de TLR9 em diferentes compartimentos celulares. Eles observaram que o direcionamento artificial de TLR9 dos endossomos para a membrana plasmática faz com que o reconhecimento de DNA seja alterado, tornando o TLR9 insensível a DNA viral (PAMP), mas muito sensível a DNA genômico (BARTON *et al*, 2006). Além disso, surpreendentemente, camundongos transplantados com células-tronco hematopoiéticas expressando o receptor TLR9 na superfície desenvolvem espontaneamente uma inflamação sistêmica fatal, chegando a 100% de mortalidade em menos de 4 semanas (MOUCHESS *et al*, 2011). Esses dados sugerem que a expressão de TLR9 na membrana plasmática pode ser uma etapa determinante para o reconhecimento de DNA aberrante por neutrófilos, e essencial para a indução de inflamação exacerbada, ativação celular e amplificação do dano hepático durante DILI.

Um ponto que merece ser destacado é que DNA não é um agente quimiotático para neutrófilos (ZHANG, Q. *et al*, 2010). Na realidade, a estimulação de neutrófilos unicamente por DNA ou CpG em meio de cultura dificilmente induz efeitos como a expressão de marcadores de ativação ou expressão de ROS (NEUFERT *et al*, 2001; ZHANG, Q. *et al*, 2010). Mas de modo interessante, a incubação com agonistas de TLR9 é capaz de induzir fenótipo ativado quando neutrófilos passam por *priming* (pré-estimulação) com LPS, GM-CSF, peptídeos formilados, TNF α , e outros agentes pró-inflamatórios, indicando que a célula precisa de um estímulo duplo para iniciar suas funções efetoras (KRIEG, 2002). Corroborando esta teoria, neutrófilos incubados com DNA mitocondrial não possuem fenótipo celular ativado, mas apresentam fosforilação significativa de p38 MAPK (ZHANG, Q. *et al*, 2010), uma via de sinalização envolvida na migração de neutrófilos (LIU, X. *et al*, 2012) e na indução do processo inflamatório (ZARUBIN & HAN, 2005). Além disso, camundongos submetidos à sepse polimicrobiana por CLP, mas pré-tratados com CpG têm mortalidade significativamente reduzida em relação a animais não tratados, e isto estava relacionado a um maior infiltrado de neutrófilos no peritônio, apresentando fenótipo ativado, e com maior eficiência em fagocitose e produção de ROS (WEIGHARDT *et al*, 2000). Isto sugere que apesar de DNA/CpG não causar um fenótipo de recrutamento ou ativação em neutrófilos diretamente, a estimulação por DNA aumenta o número, atividade e eficácia de neutrófilos no tecido já infeccionado ou lesado.

Seguindo essa ideia, a incubação de neutrófilos com DNA de fígado *in vitro* foi capaz de causar a ativação de NF- κ B (medida pelo aumento da expressão de seu inibidor I κ B- α) e o aumento de expressão do receptor de quimiocinas CXCR2 (FIG. 17). NF- κ B é um fator de transcrição conhecido por iniciar a expressão de uma série de mediadores e enzimas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, óxido nítrico sintetase (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), dentre outros. Além de promover o processo inflamatório, um efeito notável de NF- κ B é estimular a sobrevivência celular (LI & VERMA, 2002; PASPARAKIS, 2009). Desse modo, o reconhecimento de DNA torna neutrófilos propensos a migrar e permanecer no tecido por mais tempo, abrindo uma janela para o estímulo com substâncias pró-inflamatórias presentes no fígado necrosado, e provavelmente desencadeando ativação celular e mecanismos efetores capazes de danificar o tecido. Esta situação parece ser provável, afinal neutrófilos extraídos do fígado lesado por APAP apresentam redução de granulosidade (FIG. 17), sugerindo que eles possam estar liberando seu conteúdo granular tóxico no tecido.

O mecanismo pelo qual neutrófilos lesam o fígado durante a intoxicação por APAP ainda é indeterminado. Relatos na literatura e nossos dados argumentam contra a participação de ROS (JAMES *et al*, 2003b; COVER *et al*, 2006) e NETs (FIG. 15), restando o papel de conteúdo granular para ser comprovado. As moléculas presentes nos grânulos são bastante variadas, incluindo receptores, moléculas de adesão, metaloproteinases, MPO, proteases diversas, lisozima e peptídeos antimicrobianos (BORREGAARD *et al*, 2007). A desgranulação de neutrófilos pode ser estudada por citometria de fluxo, pelo aparecimento de marcadores específicos destes grânulos na membrana plasmática de neutrófilos (SIMARD *et al*, 2010). De outra maneira, podemos testar sua participação no desenvolvimento de DILI pelo uso de inibidores farmacológicos do conteúdo granular, como sivelestat, um inibidor de elastase (YOUNG *et al*, 2007), ou hidrazida de ácido benzóico, um inibidor de MPO (MALLE *et al*, 2007). Há também a possibilidade de que outros leucócitos e moléculas promovam o dano tecidual direto, mas até agora, o bloqueio da chegada ou função de neutrófilos tem sido o mais eficaz para reduzir a gravidade de DILI (LIU, Z. X. *et al*, 2006; MARQUES *et al*, 2012).

A contribuição do acúmulo de DNA aberrante à patogênese da lesão hepática medicamentosa foi claramente comprovada ao utilizarmos animais TLR9^{-/-}, ao bloquearmos TLR9 ou eliminarmos os depósitos de DNA. Nos três casos isso levou a uma redução significativa de todos os parâmetros de lesão e inflamação hepática avaliados (FIG. 18,19). A queda de ALT sérica, da área de necrose e da deposição de DNA intravascular do fígado são indicativos claros que o dano hepático foi diminuído, e isto ocorreu juntamente com a inibição da produção de TNF α , CXCL1 e do infiltrado de neutrófilos. Um dos pontos mais importantes deste trabalho é que os tratamentos com DNASE1 e o bloqueador E6446 foram realizados a partir de 6 horas após o desafio com APAP. A aplicação prática disto é evitar qualquer interação metabólica entre os tratamentos e APAP, mas acima de tudo mostra que eles são eficazes mesmo se aplicados tardiamente nos animais, caracterizando o perfil mais desejado para o tratamento de pacientes com DILI e FHA na clínica. Este perfil de tratamento também demonstra que terapias direcionadas diretamente à contenção da inflamação e da ativação do sistema imune são eficazes para tratar a DILI.

Como já é sabido para NETs e sepse, o DNA pode ser danoso para o tecido independentemente de sua capacidade pró-inflamatória. Isso acontece diretamente pelos distúrbios de fluxo sanguíneo e coagulação causados por deposição de DNA nos vasos (FUCHS

et al, 2010; ENGELMANN & MASSBERG, 2013; MAYADAS *et al*, 2014) e pela atividade tóxica de histonas associadas a ele (XU *et al*, 2009; XU *et al*, 2011). Assim, parte do efeito protetor do tratamento com DNASE1 pode estar associado à eliminação da toxicidade direta do DNA ao tecido e vasculatura hepática. Ainda não foi possível determinar se o DNA aberrante está associado a proteínas, mas se de fato estiver, isto não só pode alterar o nível de toxicidade do DNA, via histonas por exemplo, quanto aumentar a imunogenicidade do DNA (TIAN *et al*, 2007; GOWDA *et al*, 2011). Portanto, saber a natureza e composição do DNA aberrante é primordial não só para o melhor entendimento do processo danoso que ele gera, mas também por mostrar alvos mais específicos para o desenvolvimento de tratamentos para DILI e FHA.

Após explorarmos as relações entre o DNA aberrante e o sistema imune, tentamos determinar como seria a interação entre o hepatócito e DNA, e se TLR9 estaria envolvido nisto. Primeiramente, hepatócitos WT e TLR9^{-/-} desenvolvem toxicidade e DNA aberrante de forma idêntica (FIG. 20,21), mostrando que não há alteração metabólica intrínseca nas células que justifique seu fenótipo protegido. Além disso, o fato do tratamento com DNASE1 não reduzir a toxicidade por APAP em hepatócitos primários, e que DNA purificado não é diretamente tóxico *in vitro*, indica que hepatócitos parecem ser insensíveis a DNA. Isto é apoiado pela expressão gênica inalterada em hepatócitos frente diferentes estímulos (FIG. 20), indicando que o efeito prejudicial de DNA na DILI parece partir de outras populações celulares, como por exemplo, neutrófilos. Isto faz sentido considerando que a expressão de TLR9 no fígado está praticamente restrita a LSECs e leucócitos (MARTIN-ARMAS *et al*, 2006; IMAEDA *et al*, 2009). Como um todo, estes dados indicam que os efeitos benéficos do bloqueio de DNA-TLR9 não envolvem hepatócitos, mas sim a ativação imunológica exacerbada causada em outras células, como leucócitos.

Uma observação interessante é que não encontramos ativação da via de interferon tipo I em neutrófilos nem hepatócitos, a qual é tida como a resposta mais convencional contra ácidos nucleicos (PALUDAN & BOWIE, 2013). IFN- α e IFN- β são membros da classe dos interferons tipo I, que induzem a expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) em células alvo, iniciando respostas antivirais de cunho inato e adaptativo essenciais para o controle de infecções. Esta via de sinalização pode ser ativada por vários ligantes, incluindo DNA e RNA, pela ligação à PRRs localizados em diferentes compartimentos celulares (TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Nossos dados indicam que neutrófilos não produzem e nem são estimulados por IFN tipo I na presença

de DNA hepático, o que é corroborado pela ausência de expressão de ISG54 (FIG. 17). Eles sinalizam principalmente via NF- κ B após estímulo com DNA, o que pode ser devido à localização incomum do receptor TLR9 na membrana plasmática, ou à simples ausência da maquinaria molecular necessária para essa via. Similarmente, hepatócitos parecem ser incapazes de produzir esses mediadores, pois nem um agonista de TLR3 indutor de IFN tipo I, o poli I:C, gerou resposta positiva por estas células (FIG. 20). Existe suporte na literatura sobre essa incapacidade de hepatócitos em produzir IFNs, evidenciada pelo estudo de hepatites por infecção com os vírus HAV (LANFORD *et al*, 2011), HBV (LAN *et al*, 2013) e HCV (PARK *et al*, 2012). Em todos estes casos, independente do genoma viral ser RNA ou DNA, a produção de IFN tipo I foi baixa ou indetectável. Entretanto, este paradigma foi recentemente quebrado, pois foi demonstrado que na infecção por malária há produção de IFNs por hepatócitos via reconhecimento de RNA do parasito (LIEHL *et al*, 2014). Assim, se dadas as condições corretas, a produção de IFN pelo fígado é possível. Em conjunto, podemos concluir que a sinalização por IFN tipo I durante a lesão hepática por APAP não é significativa e não parece estar envolvida no desenvolvimento da resposta imune prejudicial ao órgão.

Dada a variedade de receptores para DNA, cuja maioria se localiza no citoplasma, é possível que a sinalização por TLR9 não seja totalmente responsável pelo processo inflamatório em resposta a DNA aberrante. Se o DNA estiver restrito a compartimentos como o envelope nuclear, RE, Golgi ou endossomos é menos provável que outros receptores estejam envolvidos, afinal TLR9 é o único capaz de detectar DNA de origem extracelular/endossomal. No entanto, caso o DNA aberrante esteja de algum modo livre no citoplasma do hepatócito, sensores como AIM2, DAI, DNA-PK, cGAS, IFI16 e vários outros poderão detectar DNA e iniciar a montagem do inflamassoma, no caso de AIM2, ou recrutar a proteína adaptadora STING, o pivô da sinalização em resposta a DNA citosólico, que leva a ativação de NF- κ B, STAT6 e IFN tipo I (PALUDAN & BOWIE, 2013; BARBER, 2014).

Apesar de independente de TLRs, o papel de STING em doenças inflamatórias e autoimunes é bastante intrigante. Por exemplo, camundongos e humanos deficientes em DNASE1 e DNASE3 desenvolvem lúpus sistêmico eritematoso e a síndrome de Aicardi-Goutieres, duas doenças autoimunes graves (NAPIREI *et al*, 2000; YASUTOMO *et al*, 2001; CROW *et al*, 2006). Similarmente, a deficiência em DNASE2, localizada em lisossomos e envolvida na degradação de material fagocitado, é fatal para o embrião, que morre por produção

excessiva de IFN tipo I (YOSHIDA *et al*, 2005). O cruzamento entre camundongos DNASE2^{-/-} e deficientes na sinalização de IFN tipo I foi capaz de abolir a letalidade embrionária, mas a prole desenvolveu artrite crônica, devido à produção excessiva de TNF α (YOSHIDA *et al*, 2005). A única maneira eficaz de eliminar as doenças inflamatórias causadas pelo acúmulo de DNA em animais DNASE2^{-/-} foi pela deleção de STING, ressaltando a importância dessa molécula adaptadora na sinalização do reconhecimento de DNA aberrante (AHN *et al*, 2012). Dessa maneira, não há dúvida que o DNA causa uma resposta muito prejudicial sempre quando acumulado fora dos compartimentos normais, e a possibilidade que ele se encontre no citoplasma nos mostra que a participação de outros sensores de DNA e seu adaptador central STING ainda necessita ser explorada durante a DILI.

A avaliação prévia que hepatócitos WT e TLR9^{-/-} são igualmente susceptíveis à toxicidade por APAP foi importante para mostrar que os efeitos benéficos que observamos foram realmente relacionados à ausência do receptor e sua capacidade imunológica, no entanto, o mesmo deve ser demonstrado em animal desafiado com APAP. Para isso, quantificamos o nível de GSH hepático logo após a administração de APAP (2h)(HINSON *et al*, 2010). Como esperado, os animais perdem a GSH hepática de modo igual, indicando que não há proteção metabólica pela deficiência em TLR9 (FIG. 21). Porém, um dado interessante veio à tona, pois a lesão hepática em um tempo precoce (2h) é significativa e idêntica nas duas linhagens de camundongo, mas ela não aumenta mais nos animais TLR9^{-/-}. Isto apoia a ideia que o agravamento da lesão hepática ocorre após o insulto tóxico inicial, provavelmente mediado pela ativação do sistema imune frente à morte de hepatócitos.

Em conjunto, nossos dados apontam para um papel lesivo de neutrófilos no fígado intoxicado por APAP, principalmente pela liberação e deposição de DNA hepático, que é reconhecido pelos neutrófilos e os ativa antes e durante seu encontro com o fígado danificado. Dessa maneira, para comprovar a importância de neutrófilos e seu reconhecimento de DNA via TLR9 no agravamento da DILI, nós purificamos e injetamos neutrófilos selvagens (WT) em camundongos desafiados com APAP (FIG. 22). Primeiramente, observa-se que a adição de neutrófilos WT a camundongos WT intoxicados já foi capaz de aumentar a lesão hepática por APAP, indicando que o acréscimo apenas de neutrófilos já consegue aumentar a lesão tecidual. Mas, surpreendentemente, a adição de neutrófilos WT a camundongos TLR9^{-/-} foi capaz de reverter completamente o perfil protegido da lesão hepática destes animais (FIG. 22). Isto

demonstra que a expressão exclusiva de TLR9 em neutrófilos já é suficiente para abolir todo o fenótipo protegido do camundongo TLR9^{-/-}. Estes dados sugerem que o neutrófilo e sua ativação via TLR9 são o principal componente imunológico agravante da DILI.

Ainda não foi possível determinar se o acúmulo e liberação de DNA aberrante é um processo ativo ou passivo da célula, portanto, também é uma questão em aberto se esse seria um fenômeno proposital, fisiológico do hepatócito. Considerando que a presença de DNA aberrante é prejudicial para o fígado durante a DILI, à primeira vista seria contraditório que o fígado promovesse um fenômeno que causasse um intenso e danoso processo inflamatório. A noção que inflamação excessiva é prejudicial para tecidos é bem estabelecida, mas este processo foi selecionado e mantido ao longo da evolução em mamíferos por ser necessário ao restabelecimento da função tecidual (MEDZHITOV, 2008; CHOVIATIYA & MEDZHITOV, 2014). Por esse ponto de vista, a inflamação hepática é prejudicial em curto prazo, mas sua ocorrência deve ser necessária para a remoção de *debris* celulares e restos do arcabouço tecidual, permitindo que o tecido possa ser regenerado e recuperar a condição homeostática. Nesta linha, uma consequência nociva da redução da inflamação hepática pelo tratamento com DNASE1 ou bloqueio de TLR9 seria o prejuízo ou atraso da recuperação do fígado em longo prazo.

Caso este fenômeno seja proposital, além de promover a regeneração hepática, a rede de DNA aberrante poderia ser usada para suprir uma das funções mais importantes do fígado: o filtro para microrganismos que atingem a circulação (JENNE & KUBES, 2013). Já é sabido que NETs capturam microrganismos em tecidos e dentro de capilares (MCDONALD *et al*, 2012; JENNE *et al*, 2013), portanto, estruturas de DNA similares como os depósitos de DNA intravasculares poderiam realizar a mesma função. Neste caso, histonas, um dos componentes microbicidas mais abundantes em NETs, poderiam cumprir o mesmo papel nas redes de DNA intravascular no fígado.

Hepatócitos são conhecidos como células poliploides há bastante tempo, mas a função do acúmulo de até 16 cópias do genoma distribuídas por seus dois núcleos é desconhecida (DUNCAN, 2013). Essa situação é ainda mais obscura se considerarmos que além de poliploides, boa parte dos hepatócitos também é aneuploide, ou seja, possui um número de cromossomos anormal, que foge ao número original de pares para a espécie. Alguns trabalhos sugerem que isso fornece adaptabilidade ao fígado em condições de infecção ou lesão (DUNCAN *et al*, 2010), onde células com genomas diferenciados poderiam sobreviver a infecções virais ou toxicidade,

recompondo o fígado. Levando em conta nossos dados, podemos estar no caminho para determinar novas funções para o “excesso” de DNA hepático, além de ser um modo do tecido de sinalizar lesão e inflamação. O processo de DNA aberrante não parece ser restrito ao fígado, mas considerando a composição do hepatócito, seria de se esperar que o fenômeno ocorresse em tecidos com alto conteúdo de DNA.

Neste trabalho descrevemos um novo fenômeno da lesão hepática medicamentosa, onde hepatócitos lesados desenvolvem acúmulo de DNA aberrante e o liberam, causando sua deposição no tecido hepático. O depósito de DNA precede a lesão hepática e a alimenta através da ativação exacerbada de neutrófilos, que reconhecem o DNA hepático por meio do receptor TLR9 expresso na membrana e promovem o agravamento da lesão por APAP. A eliminação dos depósitos ou de sua sinalização por TLR9 reduziu significativamente a lesão hepática mesmo em tempos tardios, representando uma alternativa terapêutica promissora para DILI e FHA. Por fim, muitas questões abordadas por este trabalho ainda permanecem sem resposta, das quais podemos dar destaque à origem do DNA aberrante em hepatócitos, além de sua trajetória dentro da célula e se sua liberação seria um fenômeno proposital. Abordando a parte imunológica, o mecanismo efetor de neutrófilos que danifica o tecido hepático ainda não foi determinado. Além disso, a participação de outros leucócitos hepáticos nesse processo deve ser avaliada. Em relação ao DNA aberrante depositado no fígado, as consequências em outras fases da lesão hepática, assim como em doenças de outras etiologias deve ser explorada. Concluindo, esperamos que este trabalho contribua para um melhor entendimento da biologia hepática durante a saúde e a doença.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir com este trabalho que:

1. O DNA aberrante em hepatócitos e a deposição de DNA *in vivo* consistem em um novo fenômeno da patogênese da lesão hepática por medicamentos (DILI)
2. Neutrófilos contribuem para o dano tecidual por responderem, dentre outras moléculas, aos depósitos de DNA no fígado via receptor TLR9 em sua superfície.
3. O controle da deposição ou reconhecimento de DNA pelo sistema imune é uma alternativa terapêutica promissora para a lesão hepática por medicamentos e falência hepática aguda

7 BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, R.; HENNINGS, L.; RAFFERTY, T. M.; LETZIG, L. G.; MCCULLOUGH, S.; JAMES, L. P.; MACMILLAN-CROW, L. A.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity and protein nitration in neuronal nitric-oxide synthase knockout mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 1, p. 134-142, 2012.

AHN, J.; GUTMAN, D.; SAIJO, S.; BARBER, G. N. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 47, p. 19386-19391, 2012.

AMARAL, S. S.; OLIVEIRA, A. G.; MARQUES, P. E.; QUINTAO, J. L.; PIRES, D. A.; RESENDE, R. R.; SOUSA, B. R.; MELGACO, J. G.; PINTO, M. A.; RUSSO, R. C.; GOMES, A. K.; ANDRADE, L. M.; ZANIN, R. F.; PEREIRA, R. V.; BONORINO, C.; SORIANI, F. M.; LIMA, C. X.; CARA, D. C.; TEIXEIRA, M. M.; LEITE, M. F.; MENEZES, G. B. Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. **Cell Commun Signal**, v. 11, n. 1, p. 10, 2013.

ANTOINE, D. J.; WILLIAMS, D. P.; KIPAR, A.; LAVERTY, H.; PARK, B. K. Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. **Mol Med**, v. 16, n. 11-12, p. 479-490, 2010.

BAJT, M. L.; COVER, C.; LEMASTERS, J. J.; JAESCHKE, H. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. **Toxicol Sci**, v. 94, n. 1, p. 217-225, 2006.

BALMER, M. L.; SLACK, E.; DE GOTTARDI, A.; LAWSON, M. A.; HAPFELMEIER, S.; MIELE, L.; GRIECO, A.; VAN VLIERBERGHE, H.; FAHRNER, R.; PATUTO, N.; BERNSMEIER, C.; RONCHI, F.; WYSS, M.; STROKA, D.; DICKGREBER, N.; HEIM, M. H.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 237, p. 237ra266, 2014.

BARBER, G. N. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. **Trends Immunol**, v. 35, n. 2, p. 88-93, 2014.

BARRAT, F. J.; MEEKER, T.; GREGORIO, J.; CHAN, J. H.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; CHANG, B.; DURAMAD, O.; COFFMAN, R. L. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J Exp Med**, v. 202, n. 8, p. 1131-1139, 2005.

BARTON, G. M.; KAGAN, J. C.; MEDZHITOV, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. **Nat Immunol**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2006.

BENAVIDES, F.; OBERYSZYN, T. M.; VANBUSKIRK, A. M.; REEVE, V. E.; KUSEWITT, D. F. The hairless mouse in skin research. **J Dermatol Sci**, v. 53, n. 1, p. 10-18, 2009.

BERNAL, W.; AUZINGER, G.; DHAWAN, A.; WENDON, J. Acute liver failure. **Lancet**, v. 376, n. 9736, p. 190-201, 2010.

BERNAL, W.; WENDON, J. Acute liver failure. **N Engl J Med**, v. 369, n. 26, p. 2525-2534, 2013.

BERTINI, R.; BARCELOS, L. S.; BECCARI, A. R.; CAVALIERI, B.; MORICONI, A.; BIZZARRI, C.; DI BENEDETTO, P.; DI GIACINTO, C.; GLOAGUEN, I.; GALLIERA, E.; CORSI, M. M.; RUSSO, R. C.; ANDRADE, S. P.; CESTA, M. C.; NANO, G.; ARAMINI, A.; CUTRIN, J. C.; LOCATI, M.; ALLEGRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 2, p. 436-454, 2012.

BJORNSSON, E. S.; BERGMANN, O. M.; BJORNSSON, H. K.; KVARAN, R. B.; OLAFSSON, S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420, 2013.

BLAZKA, M. E.; WILMER, J. L.; HOLLADAY, S. D.; WILSON, R. E.; LUSTER, M. I. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 133, n. 1, p. 43-52, 1995.

BORREGAARD, N.; SORENSEN, O. E.; THEILGAARD-MONCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**, v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

CAI, C.; HUANG, H.; WHELAN, S.; LIU, L.; KAUTZA, B.; LUCIANO, J.; WANG, G.; CHEN, G.; STRATIMIROVIC, S.; TSUNG, A.; BILLIAR, T. R.; ZUCKERBRAUN, B. S. Benzyl alcohol attenuates acetaminophen-induced acute liver injury in a toll-like receptor-4 dependent pattern in mice. **Hepatology**, v., n., p., 2014.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 281-288, 2014.

CLARK, S. R.; MA, A. C.; TAVENER, S. A.; MCDONALD, B.; GOODARZI, Z.; KELLY, M. M.; PATEL, K. D.; CHAKRABARTI, S.; MCAVOY, E.; SINCLAIR, G. D.; KEYS, E. M.; ALLEN-VERCOE, E.; DEVINNEY, R.; DOIG, C. J.; GREEN, F. H.; KUBES, P. Platelet TLR4

activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nat Med**, v. 13, n. 4, p. 463-469, 2007.

COVER, C.; LIU, J.; FARHOOD, A.; MALLE, E.; WAALKES, M. P.; BAJT, M. L.; JAESCHKE, H. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 216, n. 1, p. 98-107, 2006.

CRISPE, I. N. The liver as a lymphoid organ. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 147-163, 2009.

CROW, Y. J.; HAYWARD, B. E.; PARMAR, R.; ROBINS, P.; LEITCH, A.; ALI, M.; BLACK, D. N.; VAN BOKHOVEN, H.; BRUNNER, H. G.; HAMEL, B. C.; CORRY, P. C.; COWAN, F. M.; FRINTS, S. G.; KLEPPER, J.; LIVINGSTON, J. H.; LYNCH, S. A.; MASSEY, R. F.; MERITET, J. F.; MICHAUD, J. L.; PONSOT, G.; VOIT, T.; LEBON, P.; BONTHRON, D. T.; JACKSON, A. P.; BARNES, D. E.; LINDAHL, T. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutieres syndrome at the AGS1 locus. **Nat Genet**, v. 38, n. 8, p. 917-920, 2006.

CRUZ, L. N.; GUERRA, M. T.; KRUGLOV, E.; MENNONE, A.; GARCIA, C. R.; CHEN, J.; NATHANSON, M. H. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. **Hepatology**, v. 52, n. 1, p. 327-337, 2010.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 986-995, 2013.

DEAR, J. W.; SIMPSON, K. J.; NICOLAI, M. P.; CATTERSON, J. H.; STREET, J.; HUIZINGA, T.; CRAIG, D. G.; DHALIWAL, K.; WEBB, S.; BATEMAN, D. N.; WEBB, D. J. Cyclophilin A is a damage-associated molecular pattern molecule that mediates acetaminophen-induced liver injury. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 3347-3352, 2011.

DELEVE, L. D.; WANG, X.; KAPLOWITZ, N.; SHULMAN, H. M.; BART, J. A.; VAN DER HOEK, A. Sinusoidal endothelial cells as a target for acetaminophen toxicity. Direct action versus requirement for hepatocyte activation in different mouse strains. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 9, p. 1339-1345, 1997.

DUNCAN, A. W.; TAYLOR, M. H.; HICKEY, R. D.; HANLON NEWELL, A. E.; LENZI, M. L.; OLSON, S. B.; FINEGOLD, M. J.; GROMPE, M. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 707-710, 2010.

DUNCAN, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. **Semin Cell Dev Biol**, v. 24, n. 4, p. 347-356, 2013.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 1, p. 34-45, 2013.

FUCHS, T. A.; BRILL, A.; DUERSCHMIED, D.; SCHATZBERG, D.; MONESTIER, M.; MYERS, D. D., JR.; WROBLESKI, S. K.; WAKEFIELD, T. W.; HARTWIG, J. H.; WAGNER,

D. D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 36, p. 15880-15885, 2010.

GEERING, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends Immunol**, v. 34, n. 8, p. 398-409, 2013.

GEISSMANN, F.; CAMERON, T. O.; SIDOBRE, S.; MANLONGAT, N.; KRONENBERG, M.; BRISKIN, M. J.; DUSTIN, M. L.; LITTMAN, D. R. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. **PLoS Biol**, v. 3, n. 4, p. e113, 2005.

GOMIDES, L. F.; MARQUES, P. E.; FALEIROS, B. E.; PEREIRA, R. V.; AMARAL, S. S.; LAGE, T. R.; RESENDE, G. H.; GUIDINE, P. A.; FOUREAUX, G.; RIBEIRO, F. M.; MARTINS, F. P.; FONTES, M. A.; FERREIRA, A. J.; RUSSO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; MORAES, M. F.; TEIXEIRA, A. L.; MENEZES, G. B. Murine model to study brain, behavior and immunity during hepatic encephalopathy. **World J Hepatol**, v. 6, n. 4, p. 243-250, 2014.

GOWDA, N. M.; WU, X.; GOWDA, D. C. The nucleosome (histone-DNA complex) is the TLR9-specific immunostimulatory component of Plasmodium falciparum that activates DCs. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20398, 2011.

GREEN, D. R. The end and after: how dying cells impact the living organism. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 441-444, 2011.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 32, n., p. 659-702, 2014.

HELLE, S. C.; KANFER, G.; KOLAR, K.; LANG, A.; MICHEL, A. H.; KORNMANN, B. Organization and function of membrane contact sites. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2526-2541, 2013.

HICKEY, M. J.; WESTHORPE, C. L. Imaging inflammatory leukocyte recruitment in kidney, lung and liver--challenges to the multi-step paradigm. **Immunol Cell Biol**, v. 91, n. 4, p. 281-289, 2013.

HINSON, J. A.; ROBERTS, D. W.; JAMES, L. P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. **Handb Exp Pharmacol**, v., n. 196, p. 369-405, 2010.

ICHAH, P.; DUCLOS-VALLEE, J. C.; GUETTIER, C.; HAMIDA, S. B.; ANTONINI, T.; DELVART, V.; SALIBA, F.; AZOULAY, D.; CASTAING, D.; SAMUEL, D. Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. **Liver Transpl**, v. 13, n. 7, p. 996-1003, 2007.

IMAEDA, A. B.; WATANABE, A.; SOHAIL, M. A.; MAHMOOD, S.; MOHAMADNEJAD, M.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; MEHAL, W. Z. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. **J Clin Invest**, v. 119, n. 2, p. 305-314, 2009.

ISHII, K. J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 352-363, 2008.

ITO, Y.; BETHEA, N. W.; ABRIL, E. R.; MCCUSKEY, R. S. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. **Microcirculation**, v. 10, n. 5, p. 391-400, 2003.

JAESCHKE, H.; BAJT, M. L. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. **Toxicol Sci**, v. 89, n. 1, p. 31-41, 2006.

JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 12, p. 1499-1506, 2003a.

JAMES, L. P.; MCCULLOUGH, S. S.; KNIGHT, T. R.; JAESCHKE, H.; HINSON, J. A. Acetaminophen toxicity in mice lacking NADPH oxidase activity: role of peroxynitrite formation and mitochondrial oxidant stress. **Free Radic Res**, v. 37, n. 12, p. 1289-1297, 2003b.

JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 996-1006, 2013.

JENNE, C. N.; WONG, C. H.; ZEMP, F. J.; MCDONALD, B.; RAHMAN, M. M.; FORSYTH, P. A.; MCFADDEN, G.; KUBES, P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. **Cell Host Microbe**, v. 13, n. 2, p. 169-180, 2013.

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, n. 12, p. 1504-1513, 2002.

JUNGERMANN, K.; KIETZMANN, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. **Annu Rev Nutr**, v. 16, n., p. 179-203, 1996.

KAWASHIMA, A.; TANIGAWA, K.; AKAMA, T.; WU, H.; SUE, M.; YOSHIHARA, A.; ISHIDO, Y.; KOBIYAMA, K.; TAKESHITA, F.; ISHII, K. J.; HIRANO, H.; KIMURA, H.; SAKAI, T.; ISHII, N.; SUZUKI, K. Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1702-1712, 2011.

KESSENBROCK, K.; KRUMBHOLZ, M.; SCHONERMARCK, U.; BACK, W.; GROSS, W. L.; WERB, Z.; GRONE, H. J.; BRINKMANN, V.; JENNE, D. E. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. **Nat Med**, v. 15, n. 6, p. 623-625, 2009.

KRIEG, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol**, v. 20, n., p. 709-760, 2002.

KUMAR, M.; SATAPATHY, S.; MONGA, R.; DAS, K.; HISSAR, S.; PANDE, C.; SHARMA, B. C.; SARIN, S. K. A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. **Hepatology**, v. 45, n. 1, p. 97-101, 2007.

LAN, P.; ZHANG, C.; HAN, Q.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Therapeutic recovery of hepatitis B virus (HBV)-induced hepatocyte-intrinsic immune defect reverses systemic adaptive immune tolerance. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 73-85, 2013.

LANFORD, R. E.; FENG, Z.; CHAVEZ, D.; GUERRA, B.; BRASKY, K. M.; ZHOU, Y.; YAMANE, D.; PERELSON, A. S.; WALKER, C. M.; LEMON, S. M. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 27, p. 11223-11228, 2011.

LEE, W. Y.; MORIARTY, T. J.; WONG, C. H.; ZHOU, H.; STRIETER, R. M.; VAN ROOIJEN, N.; CHACONAS, G.; KUBES, P. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. **Nat Immunol**, v. 11, n. 4, p. 295-302, 2010.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 725-734, 2002.

LIEHL, P.; ZUZARTE-LUIS, V.; CHAN, J.; ZILLINGER, T.; BAPTISTA, F.; CARAPAU, D.; KONERT, M.; HANSON, K. K.; CARRET, C.; LASSNIG, C.; MULLER, M.; KALINKE, U.; SAEED, M.; CHORA, A. F.; GOLENBOCK, D. T.; STROBL, B.; PRUDENCIO, M.; COELHO, L. P.; KAPPE, S. H.; SUPERTI-FURGA, G.; PICHLMAIR, A.; VIGARIO, A. M.; RICE, C. M.; FITZGERALD, K. A.; BARCHET, W.; MOTA, M. M. Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. **Nat Med**, v. 20, n. 1, p. 47-53, 2014.

LINDAU, D.; MUSSARD, J.; WAGNER, B. J.; RIBON, M.; RONNEFARTH, V. M.; QUETTIER, M.; JELCIC, I.; BOISSIER, M. C.; RAMMENSEE, H. G.; DECKER, P. Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 8, p. 2101-2113, 2013.

LIU, X.; MA, B.; MALIK, A. B.; TANG, H.; YANG, T.; SUN, B.; WANG, G.; MINSHALL, R. D.; LI, Y.; ZHAO, Y.; YE, R. D.; XU, J. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. **Nat Immunol**, v. 13, n. 5, p. 457-464, 2012.

LIU, Z. X.; GOVINDARAJAN, S.; KAPLOWITZ, N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. **Gastroenterology**, v. 127, n. 6, p. 1760-1774, 2004.

LIU, Z. X.; HAN, D.; GUNAWAN, B.; KAPLOWITZ, N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1220-1230, 2006.

LUDWIG, S.; MANNHERZ, H. G.; SCHMITT, S.; SCHAFFER, M.; ZENTGRAF, H.; NAPIREI, M. Murine serum deoxyribonuclease 1 (Dnase1) activity partly originates from the liver. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 5, p. 1079-1093, 2009.

MALLE, E.; FURTMULLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 6, p. 838-854, 2007.

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.; MELGACO, 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. 1971-1982, 2012.

MARTIN-ARMAS, M.; SIMON-SANTAMARIA, J.; PETTERSEN, I.; MOENS, U.; SMEDSRØD, B.; SVEINBJORNSSON, B. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. **J Hepatol**, v. 44, n. 5, p. 939-946, 2006.

MASSON, M. J.; CARPENTER, L. D.; GRAF, M. L.; POHL, L. R. Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide. **Hepatology**, v. 48, n. 3, p. 889-897, 2008.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol**, v. 9, n., p. 181-218, 2014.

MCDONALD, B.; MCAVOY, E. F.; LAM, F.; GILL, V.; DE LA MOTTE, C.; SAVANI, R. C.; KUBES, P. Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. **J Exp Med**, v. 205, n. 4, p. 915-927, 2008.

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, n. 6002, p. 362-366, 2010.

MCDONALD, B.; URRUTIA, R.; YIPP, B. G.; JENNE, C. N.; KUBES, P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 3, p. 324-333, 2012.

MCGILL, M. R.; SHARPE, M. R.; WILLIAMS, C. D.; TAHA, M.; CURRY, S. C.; JAESCHKE, H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1574-1583, 2012.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Apoptosis or necrosis in acetaminophen-induced acute liver failure? New insights from mechanistic biomarkers*. **Crit Care Med**, v. 41, n. 11, p. 2653-2654, 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MOLES, A.; MURPHY, L.; WILSON, C. L.; CHAKRABORTY, J. B.; FOX, C.; PARK, E. J.; MANN, J.; OAKLEY, F.; HOWARTH, R.; BRAIN, J.; MASSON, S.; KARIN, M.; SEKI, E.; MANN, D. A. A TLR2/S100A9/CXCL-2 signaling network is necessary for neutrophil recruitment in acute and chronic liver injury in the mouse. **J Hepatol**, v. 60, n. 4, p. 782-791, 2014.

MOUCHESS, M. L.; ARPAIA, N.; SOUZA, G.; BARBALAT, R.; EWALD, S. E.; LAU, L.; BARTON, G. M. Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. **Immunity**, v. 35, n. 5, p. 721-732, 2011.

NAPIREI, M.; KARSUNKY, H.; ZEVNIK, B.; STEPHAN, H.; MANNHERZ, H. G.; MOROY, T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. **Nat Genet**, v. 25, n. 2, p. 177-181, 2000.

NEUFERT, C.; PAI, R. K.; NOSS, E. H.; BERGER, M.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1542-1549, 2001.

NI, H. M.; JAESCHKE, H.; DING, W. X. Targeting autophagy for drug-induced hepatotoxicity. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 709-710, 2012.

PALUDAN, S. R.; BOWIE, A. G. Immune sensing of DNA. **Immunity**, v. 38, n. 5, p. 870-880, 2013.

PARK, H.; SERTI, E.; EKE, O.; MUCHMORE, B.; PROKUNINA-OLSSON, L.; CAPONE, S.; FOLGORI, A.; REHERMANN, B. IL-29 is the dominant type III interferon produced by hepatocytes during acute hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 56, n. 6, p. 2060-2070, 2012.

PASPARAKIS, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 778-788, 2009.

PIRES, D. A.; MARQUES, P. E.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A.; GOMIDES, L. F.; DIAS, A. C.; NUNES-SILVA, A.; PINHO, V.; CARA, D. C.; VIEIRA, L. Q.; TEIXEIRA, M. M.; MENEZES, G. B. Interleukin-4 deficiency protects mice from acetaminophen-induced liver injury and inflammation by prevention of glutathione depletion. **Inflamm Res**, v. 63, n. 1, p. 61-69, 2014.

PROCTOR, W. R.; CHAKRABORTY, M.; CHEA, L. S.; MORRISON, J. C.; BERKSON, J. D.; SEMPLE, K.; BOURDI, M.; POHL, L. R. Eosinophils mediate the pathogenesis of halothane-induced liver injury in mice. **Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 2026-2036, 2013.

RAY, S. D.; KAMENDULIS, L. M.; GURULE, M. W.; YORKIN, R. D.; CORCORAN, G. B. Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. **FASEB J**, v. 7, n. 5, p. 453-463, 1993.

ROCK, K. L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The sterile inflammatory response. **Annu Rev Immunol**, v. 28, n., p. 321-342, 2010.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. **J Innate Immun**, v. 5, n. 4, p. 348-357, 2013.

SAIMAN, Y.; AGARWAL, R.; HICKMAN, D. A.; FAUSTHER, M.; EL-SHAMY, A.; DRANOFF, J. A.; FRIEDMAN, S. L.; BANSAL, M. B. CXCL12 induces hepatic stellate cell contraction through a calcium-independent pathway. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 305, n. 5, p. G375-382, 2013.

SAITO, C.; ZWINGMANN, C.; JAESCHKE, H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 246-254, 2010.

SAITOH, T.; KOMANO, J.; SAITOH, Y.; MISAWA, T.; TAKAHAMA, M.; KOZAKI, T.; UEHATA, T.; IWASAKI, H.; OMORI, H.; YAMAOKA, S.; YAMAMOTO, N.; AKIRA, S. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109-116, 2012.

SCHUPPAN, D.; KIM, Y. O. Evolving therapies for liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 5, p. 1887-1901, 2013.

SIMARD, J. C.; GIRARD, D.; TESSIER, P. A. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 5, p. 905-914, 2010.

SINGHAL, R.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Complement activation in acetaminophen-induced liver injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 341, n. 2, p. 377-385, 2012.

STEWART, R. K.; DANGI, A.; HUANG, C.; MURASE, N.; KIMURA, S.; STOLZ, D. B.; WILSON, G. C.; LENTSCH, A. B.; GANDHI, C. R. A novel mouse model of depletion of stellate cells clarifies their role in ischemia/reperfusion- and endotoxin-induced acute liver injury. **J Hepatol**, v. 60, n. 2, p. 298-305, 2014.

SUK, K. T.; KIM, D. J. Drug-induced liver injury: present and future. **Clin Mol Hepatol**, v. 18, n. 3, p. 249-257, 2012.

SUSKI, J. M.; LEBIEDZINSKA, M.; WOJTALA, A.; DUSZYNSKI, J.; GIORGI, C.; PINTON, P.; WIECKOWSKI, M. R. Isolation of plasma membrane-associated membranes from rat liver. **Nat Protoc**, v. 9, n. 2, p. 312-322, 2014.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

THOMSON, A. W.; KNOLLE, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 11, p. 753-766, 2010.

TIAN, J.; AVALOS, A. M.; MAO, S. Y.; CHEN, B.; SENTHIL, K.; WU, H.; PARROCHE, P.; DRABIC, S.; GOLENBOCK, D.; SIROIS, C.; HUA, J.; AN, L. L.; AUDOLY, L.; LA ROSA, G.; BIERHAUS, A.; NAWORTH, P.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; CROW, M. K.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E.; KIENER, P. A.; COYLE, A. J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. **Nat Immunol**, v. 8, n. 5, p. 487-496, 2007.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

VINKEN, M.; MAES, M.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Drug-induced liver injury: mechanisms, types and biomarkers. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 24, p. 3011-3021, 2013.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1269-1339, 2009.

WANG, X.; SUN, R.; WEI, H.; TIAN, Z. High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of gammadelta T cells with macrophages. **Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 373-384, 2013.

WATANABE, A.; HASHMI, A.; GOMES, D. A.; TOWN, T.; BADOU, A.; FLAVELL, R. A.; MEHAL, W. Z. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. **Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 1509-1518, 2007.

WEIGHARDT, H.; FETEROWSKI, C.; VEIT, M.; RUMP, M.; WAGNER, H.; HOLZMANN, B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. **J Immunol**, v. 165, n. 8, p. 4537-4543, 2000.

WIGG, A. J.; GUNSON, B. K.; MUTIMER, D. J. Outcomes following liver transplantation for seronegative acute liver failure: experience during a 12-year period with more than 100 patients. **Liver Transpl**, v. 11, n. 1, p. 27-34, 2005.

WILLIAMS, C. D.; BAJT, M. L.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Acetaminophen-induced hepatic neutrophil accumulation and inflammatory liver injury in CD18-deficient mice. **Liver Int**, v. 30, n. 9, p. 1280-1292, 2010.

WILLIAMS, C. D.; MCGILL, M. R.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. Fas receptor-deficient lpr mice are protected against acetaminophen hepatotoxicity due to higher glutathione synthesis and enhanced detoxification of oxidant stress. **Food Chem Toxicol**, v. 58, n., p. 228-235, 2013.

WONG, J.; JOHNSTON, B.; LEE, S. S.; BULLARD, D. C.; SMITH, C. W.; BEAUDET, A. L.; KUBES, P. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. **J Clin Invest**, v. 99, n. 11, p. 2782-2790, 1997.

XU, J.; ZHANG, X.; PELAYO, R.; MONESTIER, M.; AMMOLLO, C. T.; SEMERARO, F.; TAYLOR, F. B.; ESMON, N. L.; LUPU, F.; ESMON, C. T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nat Med**, v. 15, n. 11, p. 1318-1321, 2009.

XU, J.; ZHANG, X.; MONESTIER, M.; ESMON, N. L.; ESMON, C. T. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2626-2631, 2011.

YASUTOMO, K.; HORIUCHI, T.; KAGAMI, S.; TSUKAMOTO, H.; HASHIMURA, C.; URUSHIHARA, M.; KURODA, Y. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. **Nat Genet**, v. 28, n. 4, p. 313-314, 2001.

YE, R. D.; BOULAY, F.; WANG, J. M.; DAHLGREN, C.; GERARD, C.; PARMENTIER, M.; SERHAN, C. N.; MURPHY, P. M. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 2, p. 119-161, 2009.

YIPP, B. G.; PETRI, B.; SALINA, D.; JENNE, C. N.; SCOTT, B. N.; ZBYTNUK, L. D.; PITTMAN, K.; ASADUZZAMAN, M.; WU, K.; MEIJNDERT, H. C.; MALAWISTA, S. E.; DE BOISFLEURY CHEVANCE, A.; ZHANG, K.; CONLY, J.; KUBES, P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1386-1393, 2012.

YOSHIDA, H.; OKABE, Y.; KAWANE, K.; FUKUYAMA, H.; NAGATA, S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. **Nat Immunol**, v. 6, n. 1, p. 49-56, 2005.

YOUNG, R. E.; VOISIN, M. B.; WANG, S.; DANGERFIELD, J.; NOURSHARGH, S. Role of neutrophil elastase in LTB4-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 5, p. 628-637, 2007.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2005.

ZHANG, Q.; RAOOF, M.; CHEN, Y.; SUMI, Y.; SURSAL, T.; JUNGER, W.; BROHI, K.; ITAGAKI, K.; HAUSER, C. J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104-107, 2010.

ZHANG, S. L.; YU, Y.; ROOS, J.; KOZAK, J. A.; DEERINCK, T. J.; ELLISMAN, M. H.; STAUDERMAN, K. A.; CAHALAN, M. D. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 902-905, 2005.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O.; NOMIYAMA, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. **Genome Biol**, v. 7, n. 12, p. 243, 2006.

8 ANEXO I – PUBLICAÇÃO RELATIVA À TESE DE DOUTORADO

O conjunto de dados gerado nesta tese foi publicado pelo nosso grupo pesquisa no periódico *Hepatology* (*Impact Factor: 11.19; Online ISSN: 1527-3350*), uma das revistas mais bem conceituadas na área. O artigo é intitulado *Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice*, e possui o DOI: 10.1002/hep.27216. A versão impressa do artigo encontra-se nas páginas a seguir.

