

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

Maísa Mota Antunes

**Envolvimento do eixo IL-33 / ST2 no desenvolvimento de
lesão hepática aguda**

Belo Horizonte
2017

Maísa Mota Antunes

**Envolvimento do eixo IL-33 / ST2 no desenvolvimento de
lesão hepática aguda**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Co-orientadora: Prof. Dra. Denise Carmona Cara Machado

Belo Horizonte

2017

Este trabalho foi realizado no Center for Gastrointestinal Biology, do Departamento de Morfologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG e CNPq.

*“Se vi mais longe,
foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”*
(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

“Sorte é isso. Merecer e ter”.

Posso dizer, então, que tive sorte. Não sei o quanto merecia, mas tive muito. E agradecer é tão somente uma pequena demonstração de reconhecimento àqueles que me proporcionaram ser, ter, fazer.

Agradeço a Gustavo, pela orientação, amizade e presença. Ao ver o que você faz diariamente, só consigo pensar naquela frase: “Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”. Você simplesmente negligencia o “impossível”. E é graças a essa determinação e dedicação que hoje posso dizer, com muito orgulho, que me formei em um dos melhores grupos de pesquisa que existem. Obrigada por seu esforço diário em fazer com que tenhamos mais que um laboratório. E obrigada por insistir tanto em me fazer ver do que eu sou capaz.

Agradeço a Denise Carmona, quem primeiro me abriu as portas e me permitiu estar aqui hoje. Obrigada, De. Seu apoio foi fundamental para que tudo isso acontecesse.

Agradeço aos amigos dos primeiros tempos do lab, quando ainda éramos o Imunobiofotônica. Quando o lab ainda era pequeno, mas os sonhos já eram tão grandes. Obrigada Rafa, Pedro, Dani, Lindys e Julia, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço imensamente a Ariane, Alan, Brenda, Bruna, Débora, Maria Alice, Érika, Hortência, Sarah, Monica e Vivi. Obrigada pela presença constante e ajuda incondicional em todos os momentos, e a qualquer hora – literalmente. Obrigada pelas intravitalis até as 04h da manhã, e pelos isolamentos a partir das 06h. Sem vocês eu terminaria daqui a 2 anos, e com bem menos diversão. Mais que um paper, isso nos faz ter histórias pra contar. Gustavo, quero te agradecer aqui também, porque você é parte dessa galera. Agradeço ainda a Raquel, Jorge e Matheus, e Kassiane. Tão recentes, e já tão importantes. *“Together we stand, divided we fall”*. Obrigada também André, Roberta e Lorena, por fazerem parte do que somos hoje.

Agradeço também, muito, a Denise Perez, Rayssa, Renata Monti e Ale, pela amizade, ajuda e por tantos bons momentos.

Agradeço, ainda, a Rhuanna Dutra, da Secretaria da PPGBioCel, a Rose, nossa técnica por longos tempos, e a Aparecida (Cida), da limpeza. O trabalho de vocês tornou, por inúmeras vezes, o meu mais fácil. Obrigada.

Obrigada Lílian e Guilherme, por serem tão vocês. Me identifico. E me conforta.

Obrigada aos meus amigos da vida: Flávia, Nana, Luiz, Lílian e Roll. Nas noites difíceis, lembrar de vocês era me lembrar de quem eu sou. Avante, avante! Super-heróis!

Obrigada também “as meninas”: Maria, Mia, Ada, Renatinha. Lembrar que vocês “me matam de vergonha” me fazia rir quando isso parecia difícil.

Agradeço à minha família, em especial Vovô, Grace, Alex e Tia Vânia. Obrigada pelo orgulho que sei que sentem. E aqui, agradeço também a Vero, um incentivador incansável das minhas aventuras na ciência. Obrigada!

Acho que estou escrevendo tanto pra adiar o momento de agradecer a vocês. Meu Pai, Mãe, Cristiane, Mercinho, Tiago, Tales, Nanan e Raul. Eu poderia escrever um texto pra cada um de vocês, mas sei que nenhum de nós tem coração pra isso. Papi lindo, Fofinha, sei que nada paga a ausência, a distância, e a saudade. Mas espero que se orgulhem da pessoa que me tornei graças a vocês. Essa conquista seria impossível sem todo esforço que fazem, e apoio que me dão, desde sempre. Logo, ela é de vocês. Cristiane, “os meninos”, Raul, estendo a vocês o sentimento. “Basta-me saber que existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida”. É reconfortante a certeza de que tenho a todos vocês. Obrigada! Amo vocês infinitamente.

Maio, 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O Fígado	15
1.2 Lesão hepática e liberação de DAMPs	17
1.3 Atuação da IL-33 no contexto de lesão hepática	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais experimentais	26
3.2 Modelo de lesão hepática	26
3.3 Ensaio enzimático	26
3.4 Histologia	26
3.5 Microscopia intravital	26
3.6 Isolamento de hepatócitos primários – Imunofluorescência e qPCR	26
3.7 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT-PCR)	29
3.7.1 Extração de RNA	29
3.7.2 Síntese de cDNA	29
3.7.3 PCR quantitativo (qPCR)	29
3.7.3.1 <i>Controle endógeno</i>	29
3.7.3.2 <i>Determinação da expressão gênica</i>	30
3.8 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas	31
3.9 Depleção de neutrófilos e macrófagos	31
3.10 Quimeras	32
3.11 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	33

4.1	Sobredose de APAP causa lesão hepática de maneira dose- e tempo-dependente, e o bloqueio de ST2 reduz significativamente o dano hepático	33
4.2	Camundondos deficientes em ST2 desenvolvem a lesão tóxica inicial provocada por APAP, que não progride como a de camundongos <i>wild type</i>	35
4.3	Ausência de ST2 atenua infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA no fígado	36
4.4	Ausência de ST2 reduz os níveis de mediadores inflamatórios em resposta a APAP	37
4.5	Deleção de ST2 altera perfil de liberação de citocinas após APAP	38
4.6	Células mielóides que detectam IL-33 são fundamentais para o agravamento da lesão por paracetamol	39
4.7	Hepatócitos e células não-parenquimais hepáticas expressam elevados níveis de IL-33 após desafio por APAP	41
4.8	Dentre as células não parenquimais hepáticas, os neutrófilos são as principais células presentes no fígado quando há aumento na expressão de IL-33	43
4.9	Neutrófilos, mas não macrófagos, estão envolvidos na progressão da lesão hepática dependente de IL-33	44
	DISCUSSÃO	45
	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

APAP – *Acetaminophen*; Paracetamol

BSA – Albumina sérica bovina

CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CEUA – Comissão de Ética de Uso Animal

CLL – clodronato em lipossomos

Ct – *Threshold cycle*

DAMP – *Danger-associated-molecular patterns*; Padrão molecular associado a dano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

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

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

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FHA – Falência Hepática Aguda

FIG – Figura

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSH – Glutathiona reduzida

H&E – Hematoxilina e Eosina

HMGB1 – *High-motility group box 1*

HSP – *Heat-shock protein*; proteínas do choque térmico

IFN γ – Interferon gama

IL- – Interleucina

IL1RL1 – Receptor tipo receptor de IL-1 tipo 1

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

IVM – Microscopia intravital Confocal

KC – Célula de Kupffer

LSEC – Célula endotelial sinusoidal do fígado

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*; MAP quinase

MPO – Mieloperoxidase

NAG – N-acetylglucosaminidase

NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonaimina

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear
NK – Célula *natural killer*; célula assassina natural
NKT – Célula *natural killer T*
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
RNA – Ácido ribonucleico
ST2^{-/-} – Célula ou animal deficiente em ST2
TAA – *Thioacetamide*; Tioacetamida
TIR – Receptor tipo-toll com domínio de ligação para interleucinas
TLR – Receptor tipo-toll
TMB – Tetrametilbenzidina
TNF – Fator de necrose tumoral
WT – *Wild-type*; Tipo selvagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Metabolismo do APAP e formação de NAPQI	17
Ilustração 2	Liberação de IL-33 de células necróticas e sinalização via ST2	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Toxicidade induzida por APAP provoca grave necrose hepática e mortalidade, que são prevenidos pela depleção de ST2	31
Figura 2	Ausência de ST2 impede a progressão da toxicidade hepática induzida por APAP	33
Figura 3	Sobredose de APAP aumenta infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA no fígado, o que é atenuado pela deficiência de ST2	34
Figura 4	Sobredose de APAP aumenta níveis de quimiocinas no fígado e soro, o que é atenuado pela deficiência de ST2	35
Figura 5	Perfil de liberação de citocinas é alterado durante a lesão hepática induzida por APAP	36
Figura 6	Transferência de medula óssea de camundongos ST2 ^{-/-} protege camundongos WT contra lesão hepática induzida por APAP, além de reduzir a infiltração de neutrófilos e deposição de DNA no fígado	37
Figura 7	Sobredose de APAP aumenta expressão de IL-33 tanto em hepatócitos quanto em células não-parenquimais hepáticas (NPCs), mas NPCs são as principais responsáveis pela expressão de ST2	39
Figura 8	APAP induz aumento no infiltrado de leucócitos, que são constituídos principalmente por células Ly6G ⁺	41
Figura 9	Liberação de IL-33 e consequente lesão hepática envolve participação de neutrófilos, mas não de macrófagos	42

RESUMO

A lesão hepática é um problema crescente de saúde pública, e uma das causas mais frequentes de insuficiência hepática é a ingestão abusiva e não supervisionada de drogas. Estima-se que 50% dos casos de insuficiência hepática aguda são devidos ao abuso de acetaminofeno (APAP). Em doses mais elevadas, APAP causa necrose de hepatócitos e liberação de moléculas intracelulares que - uma vez no ambiente extracelular - desencadeiam uma potente resposta inflamatória. Diferentes moléculas celulares já foram descritas como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que são relevantes no contexto da inflamação estéril, incluindo ATP, proteínas high motility group box (HMGB)-1, DNA, histonas e também IL-33. A IL-33 sinaliza através de um único receptor (ST2 ou IL1RL1) e a participação desta via nas doenças hepáticas ainda são controversas na literatura. Aqui, demonstramos que a sinalização de IL-33 via ST2 é fundamental no agravamento da inflamação do fígado desencadeada por necrose. Os camundongos que não possuíam o receptor ST2 eram resistentes aos efeitos tóxicos de APAP e o transplante de medula óssea de progenitores hematopoiéticos deficientes em ST2 reverteu a falência hepática em camundongos de tipo selvagem. Os neutrófilos são os principais sensores para IL-33 extracelular, sugerindo uma possível estratégia para futuras abordagens terapêuticas destinadas a abrandar a sinalização de IL-33 em células imunes durante lesão estéril do fígado.

Palavras-chave: leucócitos, neutrófilos, IL-33, DAMPs, ST2, necrose hepática.

ABSTRACT

Liver injury is a major health concern and one of the most frequent causes of hepatic failure is the abusive and unsupervised intake of drugs. It is estimated that 50% of the cases of acute liver failure is due to acetaminophen (APAP) abuse. At higher doses, APAP causes hepatocyte necrosis and release of intracellular molecules that – once in the extracellular environment – will trigger a robust inflammatory response. Different cell molecules were already described as damage associated molecular patterns (DAMPs) that are relevant in the context of sterile inflammation, including ATP, high motility group box (HMGB)-1, DNA, histones and also IL-33. IL-33 signals via a single receptor (ST2, or IL1RL1) and the participation of this pathway in liver diseases is still controversial in the literature. Here we demonstrated that IL- 33 signalling via ST2 is central in aggravation of necrosis-triggered liver inflammation. Mice lacking ST2 receptor were resistant to APAP toxic effects, and bone marrow transplantation of ST2-deficient hematopoietic progenitors rescued hepatic failure in wild type mice. Neutrophils are the major sensors for extracellular IL-33, suggesting a rational for future therapeutic approaches designed to dampen IL-33 signalling in immune cells during sterile liver injury.

Keywords: leukocytes, neutrophils, IL-33, DAMPs, ST2, liver necrosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Fígado

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo humano, pesando aproximadamente 1,5 kg em um homem adulto, o que corresponde a até 2,5% da massa corporal total (VOLLMAR & MENGER, 2009). Se localiza no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, possuindo posição anatômica estratégica no sistema porta-hepático, ligado diretamente ao trato digestivo (VOLLMAR & MENGER, 2009). O fígado é altamente vascularizado e por isso é irrigado por um grande volume de sangue, possuindo suprimento sanguíneo duplo. Aproximadamente 80% do sangue é derivado da veia porta, que traz o sangue venoso dos intestinos (proveniente das veias mesentéricas), e do baço (veia esplênica), sendo pouco oxigenado e rico em nutrientes. Já a artéria hepática, proveniente do tronco celíaco, supre o fígado com sangue arterial (VOLLMAR & MENGER, 2009; JENNE & KUBES, 2013). Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, em baixa pressão e tensão de oxigênio, através de uma rede de vasos capilares de parede fina, do tipo sinusoides; essa dupla irrigação confere ao órgão heterogeneidade funcional e grande capacidade metabólica (JENNE & KUBES, 2013).

O fígado é dividido microscopicamente em inúmeras seções poliédricas chamadas lóbulos hepáticos, que são formados por lâminas hepatocelulares dispostas radialmente na veia central. É nos lóbulos hepáticos que se localizam os hepatócitos – as células parenquimais do fígado. Os hepatócitos são os principais constituintes funcionais dos lóbulos hepáticos, correspondendo a 80% do fígado, e realizam a maioria das funções sintéticas e secretoras atribuídas ao órgão (VOLLMAR & MENGER, 2009).

Os hepatócitos se organizam em cordões de coluna única, separados entre si pelos capilares sinusoides, 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 através da veia cava inferior (VOLLMAR & MENGER, 2009). Já os capilares

sinusoides são constituídos por células endoteliais sinusoidais (LSECs), um tipo celular bastante diferenciado do endotélio convencional. As LSECs são células altamente delgadas, fenestradas e desprovidas de lâmina basal. Tais características permitem um fluxo bidirecional de substâncias do plasma para o hepatócito, permitindo que os mesmos estejam separados do fluxo sanguíneo, mas ainda assim mantenham um contato íntimo, embora seletivo, com células e moléculas carregadas pelo sangue dentro do lúmen dos sinusoides (HICKEY & WESTHORPE, 2013). Outro tipo celular hepático presente nos sinusoides são as células de Kupffer (KCs). KCs são macrófagos residentes hepáticos e são encontradas dentro dos sinusoides, sobre as LSECs. Essa localização deixa as KCs diretamente expostas ao fluxo sanguíneo, permitindo a fagocitose de conteúdo direto da microcirculação hepática. Juntamente com as LSECs, KCs formam o maior sistema reticulo-endotelial do corpo, cuja função básica é 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 de doença (BALMER *et al.*, 2014).

Os tipos celulares, somados à sua organização morfológica e topográfica, são responsáveis pela pluralidade funcional do fígado, sendo integrante da maioria das funções metabólicas do corpo. Uma de suas funções principais, executada pelos hepatócitos, inclui o metabolismo dos três principais grupos de compostos orgânicos: proteínas, carboidratos, e lipídeos. Estes macronutrientes são provenientes da alimentação e chegam ao fígado após digestão e absorção no trato gastrointestinal. Além das funções metabólicas relacionadas aos três macronutrientes, os hepatócitos são ainda responsáveis pelo armazenamento, ativação e transformação das vitaminas e dos minerais, formação e excreção de bile, secreção de hormônios, produção de albumina, fatores de coagulação e proteínas de fase aguda, armazenamento energético e controle glicêmico, dentre outras. Ainda, o hepatócito é especialmente importante na captação, metabolização e excreção de substâncias endógenas e exógenas circulantes, 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. Portanto, uma particularidade dos hepatócitos é possuir um grande número de mitocôndrias em seu citoplasma, além de conter múltiplas cópias do genoma acumuladas em seus núcleos (DUNCAN, 2013).

Além dos hepatócitos e das KCs, são encontradas também no fígado populações de linfócitos T, células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT). Células NK, quando ativadas, são responsáveis por produzir várias citocinas imunoregulatórias, como IFN- γ , TNF e IL-10. Já as células NKT, que constituem a maior população linfocitária do fígado em condições de homeostase, participam do controle de infecções. Assim como as KCs, essas populações residem no lúmen sinusoidal e estão associadas à indução de tolerância imunológica e respostas anti-microbianas e anti-tumorais no fígado, desempenhando assim diversas funções em condições de saúde ou doença (LEE *et al.*, 2010; KRENKEL *et al.*, 2014).

1.2 Lesão hepática e liberação de DAMPs

Considerando as diversas populações celulares, cada uma com suas variadas e importantes funções, o fígado pode ser considerado um órgão onde funções metabólicas e imunológicas indispensáveis ao organismo convergem entre si. Assim, é fácil notar que as doenças que atingem o fígado são de grande importância médica e frequentemente colocam a vida de indivíduos em risco (BERNAL *et al.*, 2010; SCHUPPAN & KIM, 2013).

A etiologia das doenças hepáticas é bastante variada. Estas podem ser decorrentes de lesões no parênquima hepático provocadas por agentes químicos, como o álcool, podem ser virais (vírus da hepatite A, B e E), de origem metabólica ou provocada por doenças secundárias. Ainda, uma das principais causas, são as desencadeadas por drogas, como o paracetamol (BERNAL *et al.*, 2010; LEE, 2012; WANG *et al.*, 2013). Embora o fígado apresente grande capacidade regenerativa, nessas condições extremas, extensas lesões podem se desenvolver, comprometendo as funções hepáticas (LUEDDE *et al.*, 2014).

Independente do fator etiológico, as hepatopatias podem se caracterizar por agressão e necrose celular, resposta imunológica e regeneração nodular que comprometem a estrutura hepática e a capacidade funcional dos hepatócitos (MCDONALD & KUBES, 2016). Essas condições podem levar à falência hepática

aguda (FHA), que é uma doença caracterizada por lesão hepática aguda e grave, que leva a perda de função metabólica e imunológica do fígado, podendo acarretar em encefalopatia, coagulopatia, e descontrole metabólico, e pode ainda evoluir para falência múltipla de órgãos (BERNAL *et al.*, 2010; LEE, 2012; MCDONALD & KUBES, 2016).

Entre os fatores etiológicos citados, toxicidade por drogas está entre os principais fatores. Dentre as drogas mais comumente envolvidas na FHA, estão as drogas de acesso livre, como antibióticos e antiinflamatórios. O paracetamol (APAP (*N*-acetyl-*p*-aminophenol) é a maior causa de morte por falência hepática aguda em países desenvolvidos, sendo um grande problema de saúde pública (LEE, 2007).

O evento que dá início à hepatotoxicidade por APAP é uma lesão de origem tóxico-metabólica, em que há a junção de dois grandes fatores: o fator toxicológico direto, em que a droga mata diretamente a célula, e o fator imunológico. Durante a fase tóxica da lesão, o hepatócito sofre estresse metabólico, ocasionando na necrose oncótica dessas células, perdendo a capacidade de fazer controle osmótico, levando ao rompimento da membrana, e liberando seu conteúdo intracelular. Esse evento estimula o início da nova fase da lesão, que é a ativação da resposta imune inata, que envolve regulação de citocinas inflamatórias, e recrutamento de células NK, NKT e neutrófilos (LIU *et al.*, 2004; 2006).

O uso de APAP é considerado seguro quando em doses terapêuticas, no entanto, a sobredose é capaz de causar grave dano hepático, podendo levar à FHA, com necessidade de transplante, que pode evoluir para a morte (LARSON *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2009; LARSEN & WENDON, 2014). APAP é absorvido no intestino logo nas primeiras horas após a ingestão. Uma pequena fração de 10 a 15% de APAP é metabolizada nos hepatócitos pelo citocromo p450, resultando no metabólito tóxico *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI). O NAPQI é convertido a uma molécula não reativa pela glutatona reduzida (GSH), sendo então excretada. Quando há sobredose de APAP, a GSH é depletada e o NAPQI não pode ser metabolizado (Ilustração 1). Isso resulta em acúmulo de NAPQI que se liga então a proteínas mitocondriais, com formação de produtos citotóxicos, e consequente desestabilização de mitocôndrias, membranas, citoesqueleto, dos sistemas enzimáticos do hepatócito, e indução da fragmentação de DNA (LARSEN & WENDON, 2014).

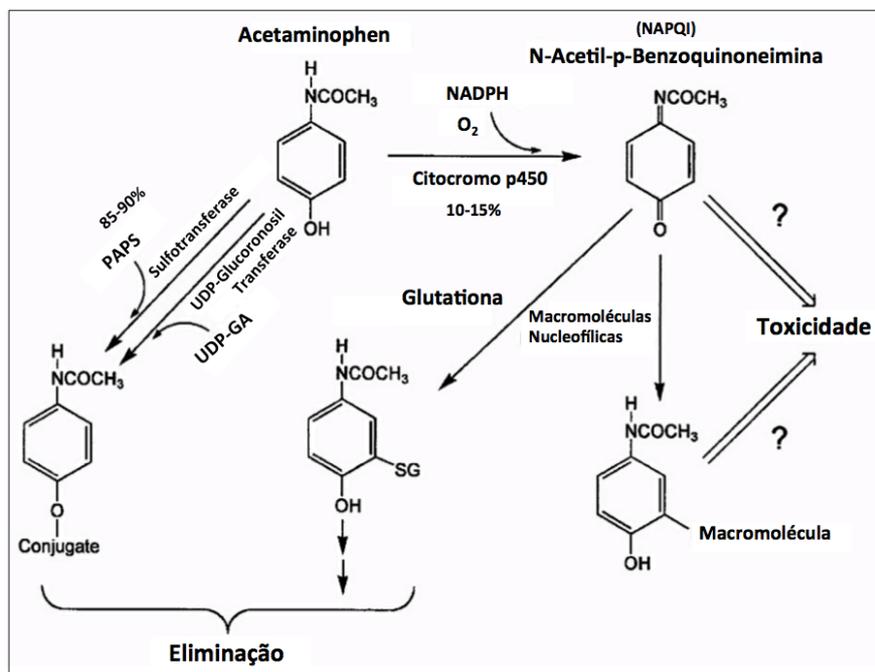


Ilustração 1 – Metabolismo do APAP e formação de NAPQI. O APAP é metabolizado pelas isoformas do citocromo P450 no metabólito tóxico N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI). Níveis baixos de NAPQI podem ser completamente convertidos na forma inativa reduzida pela glutathione S-transferase e glutathione. Sobredose de APAP depleta os estoques de GSH, e a NAPQI deixa de ser totalmente reduzida, se ligando às proteínas mitocondriais, levando à necrose de hepatócitos (Adaptado de JAMES *et al.*, 2003).

No entanto, a toxicidade provocada pelo APAP não é a única determinante para a progressão da lesão hepática. A disfunção mitocondrial decorrente do acúmulo de NAPQI leva à necrose de hepatócitos, seguida pela liberação de diversos mediadores inflamatórios, sendo os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) os mais notáveis (KRENKEL *et al.*, 2014).

Os principais DAMPS envolvidos na progressão da lesão hepática induzida por droga (DILI) são as *high-motility group box 1* (HMGB-1), proteínas do choque térmico (HSP) e fragmentos de DNA. Ao serem liberados das células necróticas, esses DAMPS são reconhecidos via receptores tipo-toll (TLR) por células como macrófagos residentes (KCs), levando à ativação de células do sistema imune, como células não parenquimais, células dendríticas, e as próprias KCs, com consequente produção de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6 (MARTIN-MURPHY *et al.*, 2010; CHAMBERS & LoGRASSO, 2011; ANTONIADES *et al.*, 2012; JAESCHKE *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2012; 2015a).

Essa cascata de eventos que tem início na liberação de DAMPs pela necrose

de hepatócitos, leva à liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias, que irão atuar no recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos, para a lesão, contribuindo para a progressão da mesma (MARQUES *et al.*, 2012; 2015a).

Algumas citocinas da família da IL-1 já são associadas à amplificação da lesão hepática, como IL-1 β e IL-18, potentes indutores do processo inflamatório, e que são liberadas por KCs após a formação do inflamassoma – importante etapa na geração da resposta inflamatória (JAESCHKE *et al.*, 2012; KUBES & MEHAL, 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a IL-33, outra citocina da família da IL-1, e que apresenta grande homologia com a sequência de aminoácidos da cadeia da IL-18 (MILLER, 2011), em um contexto de lesão hepática estéril.

1.3 Atuação da IL-33 no contexto de lesão hepática

A interleucina (IL)-33, também conhecido como IL1F11, é uma citocina da família da IL-1, e foi identificada primeiramente como um fator nuclear presente em células endoteliais de linfonodos humanos, sendo por isso chamada de Fator Nuclear de Vênulas Endoteliais Altas (NF-HEV - *Nuclear Factor of High Endothelial Venules*) (BAEKKEVOLD *et al.*, 2003). No entanto, dois anos após sua identificação, esta interleucina foi novamente, e mais claramente, descrita como o ligante do receptor ST2, quando foi então denominada “IL-33” (SCHMITZ *et al.*, 2005). ST2, também conhecido como IL1RL1, é um receptor pertencente à família de IL-1, pertencente à superfamília dos receptores semelhantes a toll (TLR), que foi isolado pela primeira vez em 1989, após estimulação de fibroblastos murinos. A princípio, o ST2 foi considerado um receptor órfão, uma vez que não havia ligantes conhecidos para o mesmo (SCHMITZ *et al.*, 2005). Quatro isoformas distintas de ST2 foram identificadas: uma isoforma solúvel (sST2), a forma transmembrana (ST2L), e uma forma variante (ST2V), sendo que a isoforma ST2L era expressa primariamente em mastócitos e em células de resposta inflamatória do tipo Th2, estando relacionada a esse tipo de resposta efetora (TOMINAGA, 1989; TOMINAGA *et al.*, 1999).

Além da função extracelular via IL-33/ST2, havia ainda fortes evidências de que a IL-33 poderia ser uma citocina de dupla função, podendo agir como fator nuclear intracelular com propriedades transcricionais regulatórias (CARRIERE *et al.*, 2007), além de ser uma potente citocina pró-inflamatória, similaridade observada pela IL-1 e pelas proteínas HMGB1 (ARSHAD *et al.*, 2012a).

A localização nuclear da IL-33 foi observada em 2007, estando associada à heterocromatina e cromossomos mitóticos, exibindo potente propriedade de regulação transcricional (CARRIERE *et al.*, 2007). Em sua extremidade N-terminal, IL-33 apresenta um domínio de ligação à cromatina e, em humanos, é expressa constitutivamente nos núcleos das células endoteliais e nas células epiteliais dos tecidos expostos ao meio ambiente, como as células do tubo digestório e respiratório (LEFRANÇAIS & CAYROL, 2012). Em camundongos, a expressão de IL-33 endotelial parece estar restrita ao tecido adiposo, fígado e aparelho reprodutor de fêmeas (PICHERY *et al.*, 2012).

A princípio, acreditava-se que era necessária a ação da caspase-1 para clivagem de IL-33, o que a tornaria biologicamente ativa, assim como ocorre com outros membros da família da IL-1, como IL-1 β e IL-18, que são ativadas através da clivagem de seus precursores (pró-IL-1 β e pró-IL-18) pela caspase 1 (CARRIERE *et al.*, 2007). No entanto, está estabelecido que a IL-33 pode ser liberada por células necróticas, e que sua clivagem por caspases 1, 3 e 7 a torna inativa, evento observado na apoptose (CARRIERE *et al.*, 2007; CAYROL & GIRARD, 2009; LUTHI *et al.*, 2009; TALABOT-AYER *et al.*, 2009).

IL-33, normalmente encontrada no núcleo de células que a expressam, não apresenta uma sequência sinal clássica ou uma via não canônica de secreção, o que faz com que seja liberada em um contexto de morte celular por necrose, atuando assim como um sinal endógeno de dano celular (DAMP), ou “alarmina” (GARLANDA *et al.*, 2013; CAYROL & GIRARD, 2014). Essa expressão nuclear reforça a ideia de que essa citocina pode desempenhar dupla função como regulador transcricional, em adição às funções imunomodulatórias (BESSA *et al.*, 2014). É, no entanto, essencial que a IL-33 liberada se ligue ao seu receptor ST2 através da porção C-terminal da proteína, a fim de induzir as respostas inflamatórias (LEFRANÇAIS & CAYROL, 2012). Uma vez liberada para o meio extracelular, a *full-length* IL-33 pode ser clivada por serino proteases, como catepsina G e elastase de neutrófilos, tornando-se de 10 até 30 vezes biologicamente mais ativa, e ambas as formas (clivada ou não), podem então se ligar ao ST2, dando início à sinalização via NF- κ B e MAPK (LEFRANÇAIS *et al.*, 2012). O receptor ST2 transmembrana possui estrutura similar ao IL-1R1, e a sinalização ocorre via recrutamento de um correceptor, o IL-1RacP (Ilustração 2). A IL-33 se liga ao ST2L, que é membro da superfamília dos receptores semelhantes a toll (TLR). O complexo IL-33/ST2 então

sinaliza através do domínio citoplasmático receptor toll interleucina 1 (TIR) para IL1RAcP. Isso leva ao recrutamento do adaptor proteico MyD88 e ativação de fatores de transcrição como NF- κ B via TRAF6, IRAK-1/4 e MAP quinases, com produção de mediadores inflamatórios (MILLER, 2011). Já o receptor ST2 solúvel (sST2) atua como *scavenger*, ou seja, se liga à IL-33 impedindo que a mesma se ligue ao ST2L, restringindo assim seus efeitos imunomodulatórios (CHACKERIAN *et al.*, 2007).

A IL-33 é mais frequentemente caracterizada como uma citocina envolvida com a indução de resposta imune tipo 2, e sua participação predominante em processos alérgicos (HARDMAN *et al.*, 2013). Entretanto, esse conceito evoluiu, dando espaço para a até então pouco clara função em processos fisiológicos, além dos processos inflamatórios clássicos. Assim como acontece com outros membros da família da IL-1, a dinâmica do comportamento, e funcionamento, da IL-33 depende - e varia - de acordo com o ambiente mais ou menos inflamatório envolvido, e de quais tipos celulares responderão a esse ambiente. Alguns exemplos da atuação da IL-33 são seu papel em situações de lesão e reparo de tecidos, com consequente fibrose (MARVIE *et al.*, 2009), a função imune em resposta a vírus (ARSHAD *et al.*, 2011; 2012a; 2013), e à sepse (ALVES-FILHO *et al.*, 2010).

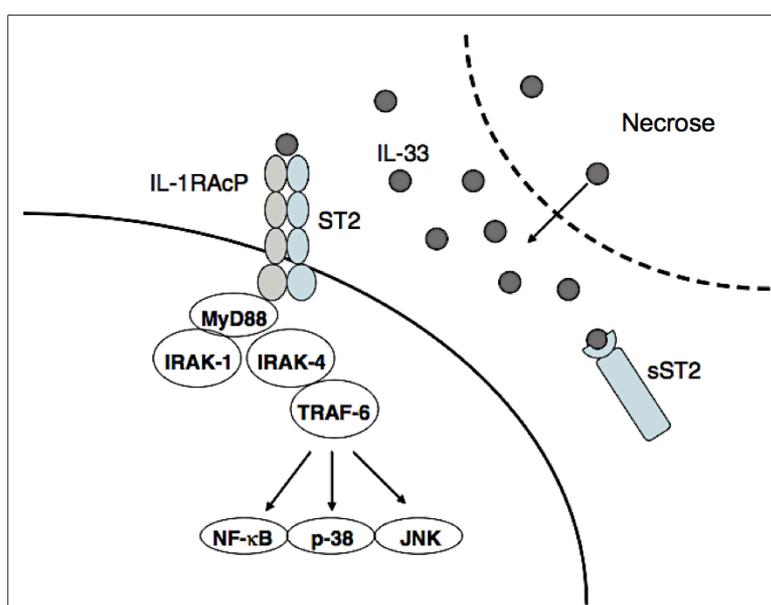


Ilustração 2 – Liberação de IL-33 de células necróticas e sinalização via ST2. A IL-33 secretada por células necróticas sinaliza via complexo receptor heterodimérico ST2 / IL-1RAcP, levando ao recrutamento de MyD88. Durante a apoptose, caspases 3 e 7 clivam IL-33, evitando assim a sinalização via ST2. A atividade biológica da IL-33 pode também ser neutralizada por ligação a sST2 (Adaptado de Miller & Liew, 2011).

Podemos assim entender a IL-33 em um contexto de homeostase e inflamação. Em estado de homeostase, IL-33 constitutiva torna-se ativa de forma a manter os níveis basais, o que acontece a partir da ativação de células residentes que expressam ST2. Com o aumento de IL-33, há também aumento de células que expressam ST2, na tentativa de controlar a homeostase, o que geralmente ocorre em situações de infestação por parasitas, ou na presença de alérgenos. Em decorrência disso, há inflamação de tecidos que leva à hiperresponsividade à IL-33 através da indução da expressão de ST2 por células inflamatórias, como células NK e Th1. Esse mecanismo que resulta na manifestação de imunidade tipo 1, que é eficiente e desejável, já que é fundamental no *clearance* de patógenos, tem também um custo elevado, que é o dano tecidual (MOLOFSKY *et al.*, 2016).

Como mencionado anteriormente, a IL-33 pode atuar como um DAMP. DAMPs funcionam para mobilizar e ativar células imunes após a interação com seus receptores específicos durante a defesa do hospedeiro e reparo tecidual. A maioria desses DAMPs é liberada durante a necrose da célula, e alguns deles têm funções duplas, como fatores nucleares e como citocinas pró-inflamatórias, que é o caso da IL-33 (ARSHAD *et al.*, 2012).

A função de DAMP da IL-33 é importante para o recrutamento de células inflamatórias (BESSA *et al.*, 2014), como neutrófilos que, ao serem recrutados para o fígado em um contexto de lesão estéril, podem amplificar o dano celular inicial causado por drogas (MARQUES *et al.*, 2015a). Ausência de sinalização de localização nuclear, que impede que a IL-33 permaneça no núcleo da célula, ou aumento da expressão constitutiva da mesma, induz ao desenvolvimento de inflamação sistêmica, o que pode ser evitado pelo bloqueio do ST2 (BESSA *et al.*, 2014; TALABOT-AYER *et al.*, 2015). Camundongos expostos cronicamente ao fumo apresentam aumento massivo de IL-33 nos pulmões, e a expressão de ST2 se torna *upregulated* em leucócitos, aumentando a inflamação, e piorando a doença (KEARLEY *et al.*, 2015).

Considerando nosso modelo de lesão estéril por sobredose de paracetamol, o ponto chave seria então “quem” produz IL-33, e “quais” são as células que expressam ST2, ou seja, as células efectoras. Em modelos de lesão hepática a IL-33 assume o comportamento padrão, funcionando conforme o ambiente inflamatório, e as células envolvidas. Em um estudo com modelo de isquemia / reperfusão hepática, foi observado que os hepatócitos eram as células que expressavam tanto

IL-33 quanto ST2, e que o bloqueio do ST2 foi responsável por aumento no influxo de neutrófilos para o fígado, acarretando em piora da lesão no órgão (SAKAI *et al*, 2012). Já Arshad e colaboradores (2011) observaram, em modelo de hepatite induzido por concanavalina A, que hepatócitos eram estimulados a produzir IL-33 na presença de células NKT, e que na ausência dessas células os níveis de IL-33 e a lesão hepática eram menores. Nesse estudo, o infiltrado de leucócitos e os níveis de citocinas pró-inflamatórias não se alteraram na ausência de células NKT, demonstrando que, ainda que com o ambiente inflamatório favorável à lesão, a mesma era menor na ausência de IL-33.

No contexto de lesão hepática, em que há rompimento da membrana dos hepatócitos durante a necrose, com liberação de grande quantidade de DNA para fora da célula, como já demonstramos (MARQUES *et al*, 2015a), e citamos anteriormente, há também outros componentes associados ao DNA sendo liberados, como histona e IL-33. A IL-33 é uma molécula que não é apenas uma citocina, ela é também um fator de transcrição associado ao DNA, além de atuar como DAMP, ou seja, um fator inflamatório. Já demonstramos que esse DNA liberado para fora da célula é citotóxico. Assim, estando associada ao DNA, a IL-33 que está sendo liberada seria também um fator adjuvante na progressão da lesão hepática, e a interrupção do eixo IL-33 / ST2, poderia contribuir para a diminuição do recrutamento de células inflamatórias para o fígado, ou que, ainda que recrutadas, elas seriam menos ativadas. Dessa forma, haveria o dano hepático inicial provocado pela toxicidade da droga, mas não haveria progressão do dano secundário provocado pela ativação do sistema imune. Nossa hipótese de trabalho, então, foi: IL-33 liberada durante a lesão é um fator adjuvante na progressão da lesão hepática induzida por droga?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel de IL-33 durante a lesão hepática induzida por paracetamol, e os efeitos de sua liberação na progressão do dano e inflamação tecidual.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a cinética do desenvolvimento de lesão hepática induzida por APAP em camundongos BALB/c *wild type*;
- Analisar a necrose hepática e a liberação de IL-33 *in vivo* durante a intoxicação em camundongos;
- Identificar as fontes celulares de IL-33;
- Avaliar o efeito da liberação de IL-33 no fígado e seu impacto na lesão hepática induzida por medicamento;
- Verificar efeito da sobredose de APAP em animais deficientes para o receptor ST2;
- Determinar as células envolvidas na resposta inflamatória decorrente da necrose hepática e subsequente liberação de IL-33.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, de 08 a 12 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 (NUVILAB) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Também utilizamos camundongos deficientes em ST2 (ST2^{-/-}) (*knockout* total), submetidos às mesmas condições. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas da Comissão de Ética de Uso Animal da UFMG (CEUA 147/2016).

3.2 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 – gavagem, dissolvido em salina estéril aquecida (150-600 mg / kg). Animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Para a coleta de amostras, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de ketamina (80 mg / kg; Syntec) e xilazina (15 mg / kg; Syntec) e submetidos a laparotomia. O sangue foi coletado para obtenção do soro e o fígado retirado e dividido em fragmentos para a realização de histologia (H&E) e ensaios bioquímicos. A porcentagem de sobrevivência dos animais foi avaliada até 24 horas após a intoxicação.

3.3 Ensaio enzimáticos

Para determinar a atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro foi utilizado o kit transaminase ALT cinético (Bioclin) adaptado para placa de 96 poços. O ensaio cinético é o método recomendado pela *International Federation of Clinical Chemistry*. Ainda, foram quantificadas no soro dos camundongos os níveis das citocinas IL-33, TNF e IL-10, e das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 utilizando kits de ELISA comerciais (R&D Systems). A atividade de mieloperoxidase (MPO) hepática foi avaliada pela 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).

3.4 Histologia

Após removidos, os fígados foram lavados com salina e o lobo inferior foi fixado por imersão 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 micrótomo e corados com hematoxilina & eosina (H&E). A visualização dos cortes foi feita em microscópio óptico BX41 (Olympus) e as imagens obtidas utilizando câmera Moticam 2500 (Motic) e o *software* Motic Image Plus 2.0ML.

3.5 Microscopia intravital

A microscopia intravital confocal (IVM) de fígado de camundongos foi realizada conforme descrito anteriormente (MARQUES *et al.*, 2015a; 2015b), utilizando microscópio confocal Nikon Ti C2 equipado com objetiva 10x. Resumidamente, os camundongos foram anestesiados e o fígado exposto em um suporte de acrílico compatível com o microscópio. Antes da aquisição de imagens, os camundongos foram injetados i.v. com 100 µL dos seguintes fluoróforos: Sytox Green (1 µL, Invitrogen) e anticorpo anti-GR1 conjugado a PE (40 µg / mL, eBioscience). A quantificação de neutrófilos e deposição de DNA foram feitas usando o programa Volocity (PerkinElmer).

3.6 Isolamento de hepatócitos primários – Imunofluorescência e qPCR

Com o objetivo de avaliar a dinâmica de liberação / produção de IL-33 pelos hepatócitos frente ao desafio com paracetamol, e sofrendo influência do sistema imune (*in vivo*), animais foram tratados com paracetamol e 6,12 e 24 horas após tratamento, hepatócitos primários foram isolados.

Para a purificação de hepatócitos primários, camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg / kg; Syntec) e xilazina (15 mg / kg; Syntec) e submetidos a laparotomia para exposição do fígado e dos vasos sanguíneos. A porção inferior da veia cava foi canulada com cateter 16G e o fígado perfundido com as soluções-tampão Hanks A e Hanks B, contendo Colagenase tipo VIII (800 mg / L; Sigma-Aldrich). O fígado foi então removido e dissociado em meio de cultura Williams E (Sigma-Aldrich) em condição asséptica. A suspensão resultante foi filtrada uma vez em membrana de nylon de 40 μ m e centrifugada a 60 x g, 4°C, por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* de células foi ressuspendido em 10 mL de meio Williams, contado em câmara de Neubauer, e a viabilidade foi checada usando o método de exclusão de azul de trypan.

Para imunofluorescência, foi definido o tempo de 6 horas, quando então as células foram plaqueadas em placas de 06 poços com lamínulas de 22 mm x 22 mm a densidade de 3×10^5 , previamente tratadas com colágeno tipo-I (Sigma-Aldrich) (CRUZ *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2013). Após incubação por 30 minutos a 37°C, 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 por 12 h com anticorpos primários anti-IL-33 (1:50; Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a Alexa-Fluor 488 (1:200; Molecular Probes) por 1 hora, sendo então coradas com DAPI. As imagens foram obtidas usando microscópio confocal Nikon Ti C2, equipado com objetiva 60x. O perfil de fluorescência linear foi obtido usando o *software* Volocity (PerkinElmer), traçando-se uma linha através do hepatócito e de seus núcleos, e a intensidade dos pixels de cada canal foi obtida e plotada.

Para análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR), após todos os tempos indicados, as células foram aliquotadas em tubos a densidade de 2×10^6 , sendo então novamente centrifugadas a 60 x g, 4°C, por 2 minutos. O *pellet* resultante foi tratado com PUREzol (BioRad) para extração de RNA.

3.7 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)

3.7.1 Extração de RNA

Dois materiais foram utilizados para avaliação por PCR em tempo real (qPCR). Para o fígado dos animais tratados e não tratados com APAP, o RNA total foi obtido de aproximadamente 30 mg de tecido; para hepatócitos isolados do fígado de animais com ou sem APAP, o RNA foi obtido a partir de 2×10^6 células.

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo Aurum™ Total RNA Mini Kit (BioRad). Ao final da extração, concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm. As amostras foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.7.2 Síntese de cDNA

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

3.7.3 PCR quantitativo (qPCR)

3.7.3.1 Controle endógeno

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Dentre os genes testados (RPL4, GAPDH, 18S e HPRT), o GAPDH mostrou-se o melhor normalizador tanto para os genes avaliados no fígado quanto para os avaliados em células isoladas.

3.7.3.2 Determinação da expressão gênica

O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5 µL de SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen™, EUA), 5 µM de cada iniciador e 2 µL de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas utilizando o sistema. O protocolo de amplificação constituiu-se de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento / extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5 µL de SYBR Green SuperMix e 5 mM de cada iniciador.

As sequências dos iniciadores para os genes relacionados foram:

Gene	Iniciadores	Sequência
<i>Gapdh</i>	<i>Foward</i>	5'ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA3'
	<i>Reverse</i>	5'CGGCCAAATCCGTTACACCCGA3'
<i>Il33</i>	<i>Foward</i>	5'CTCTCCACCGGGGCTCACTG3'
	<i>Reverse</i>	5'CCTGCGGTGCTGCTGAACTT3'
<i>Il1rl1</i>	<i>Foward</i>	5'AACCCGGAACGATGGCAAGC3'
	<i>Reverse</i>	5'AACGTCGGGCAGAGTGTGGT3'

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no valor de Ct (*threshold cycle*) e na eficiência de amplificação. Os Cts obtidos para os genes de interesse foram normalizados subtraindo-se o valor do Ct obtido para o gene de referência (GAPDH) para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de ΔCt , calculou-se o $\Delta\Delta Ct$, que corresponde ao ΔCt amostra – ΔCt do calibrador. Nesse estudo, o calibrador utilizado foi o tecido ou célula que não recebeu o tratamento com APAP. A relação da expressão gênica entre a amostra e o calibrador foi calculado utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os resultados foram obtidos no Bio-Rad SFX Manager Software e analisados no Prism 5.0. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “curva de melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

3.8 Isolamento de células não-parenquimais hepáticas

Para a obtenção de células não-parenquimais hepáticas, camundongos foram anestesiados e os fígados removidos, picados, e digeridos com colagenase tipo 8 (1 mg / mL; Sigma-Aldrich) sob agitação constante, a 37°C, por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 300 x g, 4°C por 5 minutos. O *pellet* de células foi lavado novamente em meio RPMI e centrifugado a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante resultante foi então centrifugado a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado em *cell strainer* de 70 µm (Becton-Dickinson), lavada com meio RPMI e seguido por mais duas etapas de centrifugação a 300 x g, 4°C, por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas, e as hemácias lisadas usando água para injeção, seguido de PBS 10x. A viabilidade foi checada usando azul de trypan. Nesse isolado de células foram então empregadas, isoladamente, as técnicas de Citometria de Fluxo (FACS), Sorting e qPCR (protocolo já descrito).

Para citometria de fluxo, após a etapa de isolamento, a concentração de células foi ajustada a 5×10^5 células / mL. Os anticorpos utilizados foram: anti-IL-33 conjugado a PE (Cat. IC3626P), anti-Ly6G conjugado a APC H7 (clone 1A8), anti-CD3 conjugado a PECy5 (clone 17A2), e anti-F4/80 conjugado a FITC (clone BM8). Todos os anticorpos foram obtidos da eBioscience e incubados por 30 minutos, exceto anti-IL-33 (marcação intracelular), nas amostras. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 2%, e foram então incubadas com anti-IL-33 por 30 minutos, e lidas em citômetro BD Accuri (Becton-Dickinson). Foi utilizado o programa FlowJo (Tree Star) para a análise dos resultados.

3.9 Depleção de neutrófilos e macrófagos

A depleção de neutrófilos foi feita por duas injeções i.v. de anticorpo anti-GR1 (100 µg / dose, clone RB6-8C5; eBioscience), 24 e 4 horas antes do tratamento com APAP (MARQUES *et al.*, 2012). A eliminação de células de Kupffer foi feita através de injeção única i.v. de 200 µL de clodronato em lipossomos (ClodronateLiposomes.org) 48 h antes do tratamento (MACDONALD *et al.*, 2010). Todos os reagentes foram dissolvidos em salina ou PBS estéreis, e grupos controle foram tratados com os respectivos veículos das drogas.

3.10 Geração de Quimeras

Para retirada de medula óssea, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures e tíbias foram extraídos. Os músculos adjacentes foram retirados e as extremidades dos ossos removidas para que 2 mL de meio de cultura RPMI (Cultilab) fossem injetados no canal medular. A suspensão foi coletada, filtrada em membrana de 70 µm, centrifugada e ressuspensa em RPMI. O *pellet* resultante foi ressuspensa em meio RPMI e as células contadas.

Os animais que receberam medula óssea foram tratados com antibiótico durante 15 dias antes da transferência, quando então passaram por duas sessões de radiação gama (Fonte de Cobalto 60, CDTN-UFMG). Na primeira sessão, os animais foram submetidos a 4 Gy de radiação absorvida. Três horas após a primeira sessão, os animais foram submetidos a nova sessão de radiação, dessa vez de 5 Gy (total de 9 Gy de radiação gama). Imediatamente após à segunda dose, foi realizada transferência de medula óssea total através de injeção i.v. de 1×10^7 células por camundongo. Oito semanas após o transplante, as células circulantes totais foram contadas para garantir que houve repovoamento total de células, e só então os camundongos foram tratados com APAP.

3.11 Análises estatísticas

A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste *t* de Student. Todos os resultados foram apresentados como a média ± 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 5 (San Diego, California).

4 RESULTADOS

4.1 Sobredose de APAP causa lesão hepática de maneira dose- e tempo-dependente, e o bloqueio de ST2 reduz significativamente o dano hepático

A sobredose de APAP em camundongos causa extensa lesão hepática, que pode ser medida pelo aumento da atividade da transaminase hepática alanina aminotransferase (ALT) no soro desses animais. Na figura (FIG.) 1A, vemos que a atividade de ALT aumentou proporcionalmente com o aumento gradativo da dose de APAP, atingindo o pico com 600 mg / kg, 24 horas após desafio com APAP. Utilizando então essa mesma dose, tanto para animais WT quanto para animais $ST2^{-/-}$, verificamos que a lesão hepática induzida pelo medicamento já é significativa a partir de 6 horas após a administração, com pico em 24 horas nos animais WT. No entanto, em animais deficientes para o receptor ST2, o dano hepático, que é significativo na sexta hora, regride chegando a níveis próximos dos basais com 24 horas, onde a lesão ainda é grave no grupo WT (FIG. 1B). Nestas condições, observamos a gravidade do dano hepático causado por APAP, uma vez que está associado à mortalidade de 15% de animais WT logo nas primeiras 6 horas de experimento, coincidente com o início da lesão e que, mais uma vez, podemos observar a proteção de camundongos $ST2^{-/-}$ contra a toxicidade hepática do APAP, onde há 5% de mortalidade (FIG. 1C). A avaliação histológica do fígado de camundongos não tratados em comparação com animais tratados com APAP 24h confirma grave dano hepático, que é coincidente com elevados níveis de ALT (24h) em camundongos WT, sendo menores em $ST2^{-/-}$ (FIG. 1D). Observamos ainda aumento dos níveis hepáticos e séricos basais de IL-33 em camundongos $ST2^{-/-}$, consistente com a noção de que a isoforma solúvel do ST2 (ST2s) atua como *scavenger* para a IL-33 circulante (FIG. 1E-F).

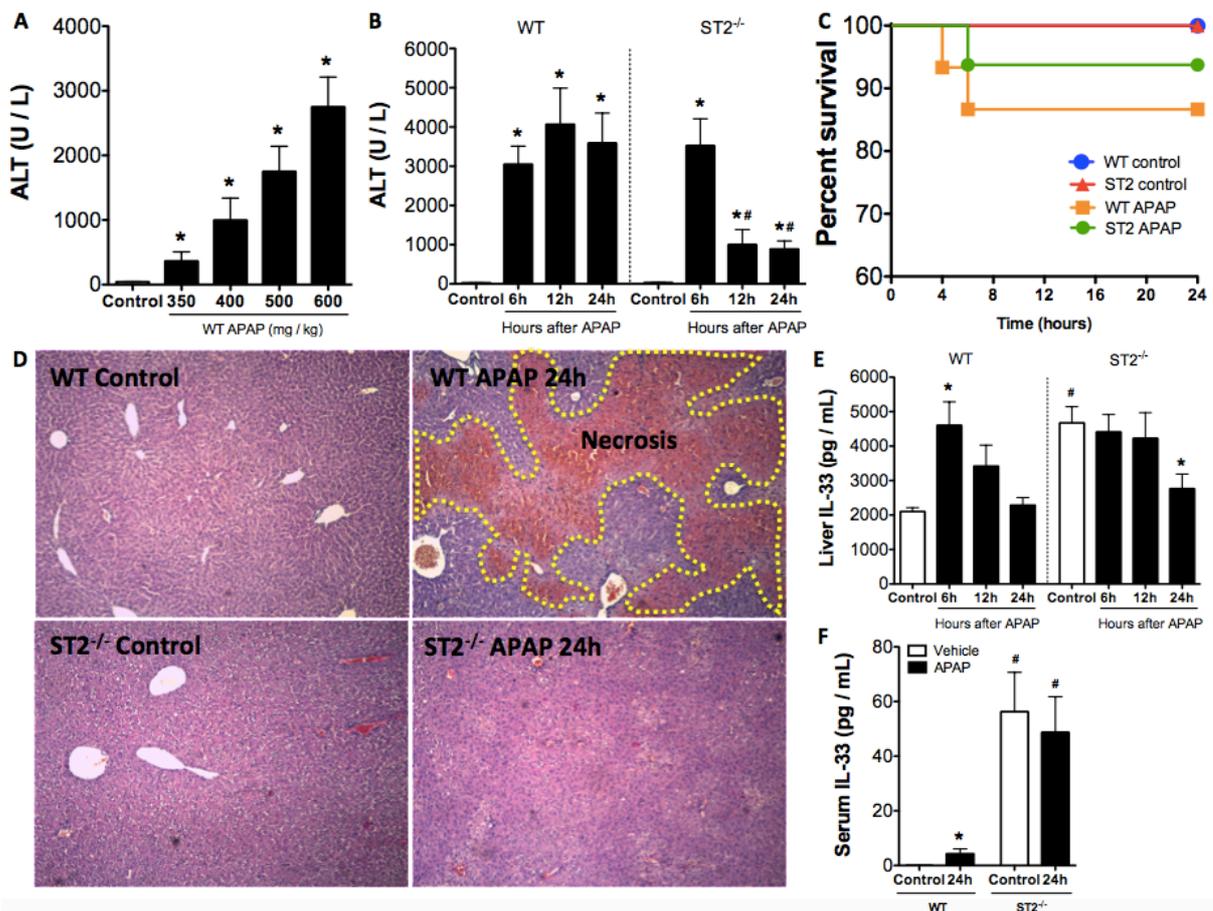


Figura 1. Toxicidade induzida por APAP provoca grave necrose hepática e mortalidade, que são prevenidos pela depleção de ST2. (A) Curva dose-resposta indicando nível de lesão hepática pela atividade de ALT no soro, sendo 600 mg / kg a melhor dose capaz de induzir necrose. **(B)** Curva de tempo-resposta (ALT) confirma lesão hepática por APAP (600 mg / kg). **(C)** Taxa de mortalidade em resposta à sobredose de APAP. **(D)** Histologia de fígado, corada por H&E, de camundongos não tratados (Control) e tratados com APAP 24h. Dosagem por ELISA dos níveis de IL-33 **(E)** hepáticos e **(F)** séricos. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente (teste *t* Student; *p* < 0,05). Número de animais por grupo \geq 5.

4.2 Camundondos deficientes em ST2 desenvolvem a lesão tóxica inicial provocada por APAP, que não progride como a de camundongos *wild type*

Uma vez que utilizamos camundongos geneticamente modificados (ST2^{-/-}), é importante que haja uma avaliação metabólica que garanta que a deleção gênica sofrida pelo animal não seja a responsável por proteger contra a toxicidade de substâncias (NI *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2013). Para tanto, foi realizada dosagem de glutathiona reduzida (GSH), que é rapidamente depletada da célula quando há intoxicação por APAP. Observamos que 2 horas após a administração de APAP camundongos ST2^{-/-} apresentam a mesma redução nos níveis de GSH que os animais WT (FIG. 2A), indicando ocorrência da lesão por bioativação da droga, e não por possível deficiência metabólica no camundongo geneticamente modificado. Observamos ainda, que nesse mesmo período de 2 horas após APAP, embora os níveis de ALT sejam mais altos nos animais ST2^{-/-}, níveis não há diferença significativa em relação aos animais WT. No entanto, a lesão nos animais WT progride ao longo do tempo, com pico em 24h, enquanto que a lesão nos camundongos ST2^{-/-} regride a níveis próximos aos basais (FIG. 2B).

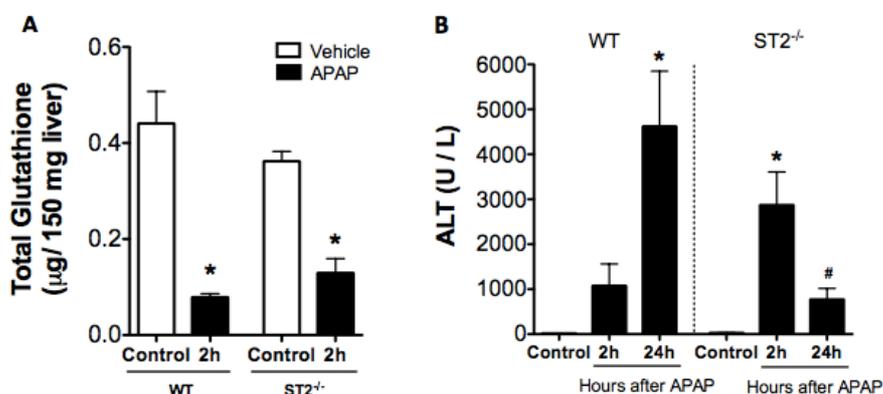


Figura 2. Ausência de ST2 impede a progressão da toxicidade hepática induzida por APAP. (A) Dosagem de glutathiona reduzida (GSH) no fígado de camundongos tratados ou não tratados com APAP por 2 horas. **(B)** Níveis de ALT sérica de camundongos tratados ou não tratados com APAP por 2 e 24 horas. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente (teste *t* Student; $p < 0,05$). Número de animais por grupo ≥ 5 .

4.3 Ausência de ST2 atenua infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA no fígado

Os neutrófilos são ativamente recrutados para o fígado durante a lesão hepática por APAP, e o aumento do número de neutrófilos é coincidente com o grau da lesão, bem como o aumento da deposição de DNA hepático (MARQUES *et al.*, 2015a). Com base nisso, utilizamos a técnica de microscopia intravital para verificar tanto o aumento do infiltrado neutrofilico, quanto a deposição de DNA extravascular devido à toxicidade por APAP. Assim, foi possível visualizar aumento do número de neutrófilos nos camundongos WT (FIG. 2A-B), bem como extensas zonas de necrose hepática, caracterizada por deposição de DNA (FIG. 2A-C), com significativa redução de ambos nos animais deficientes para ST2.

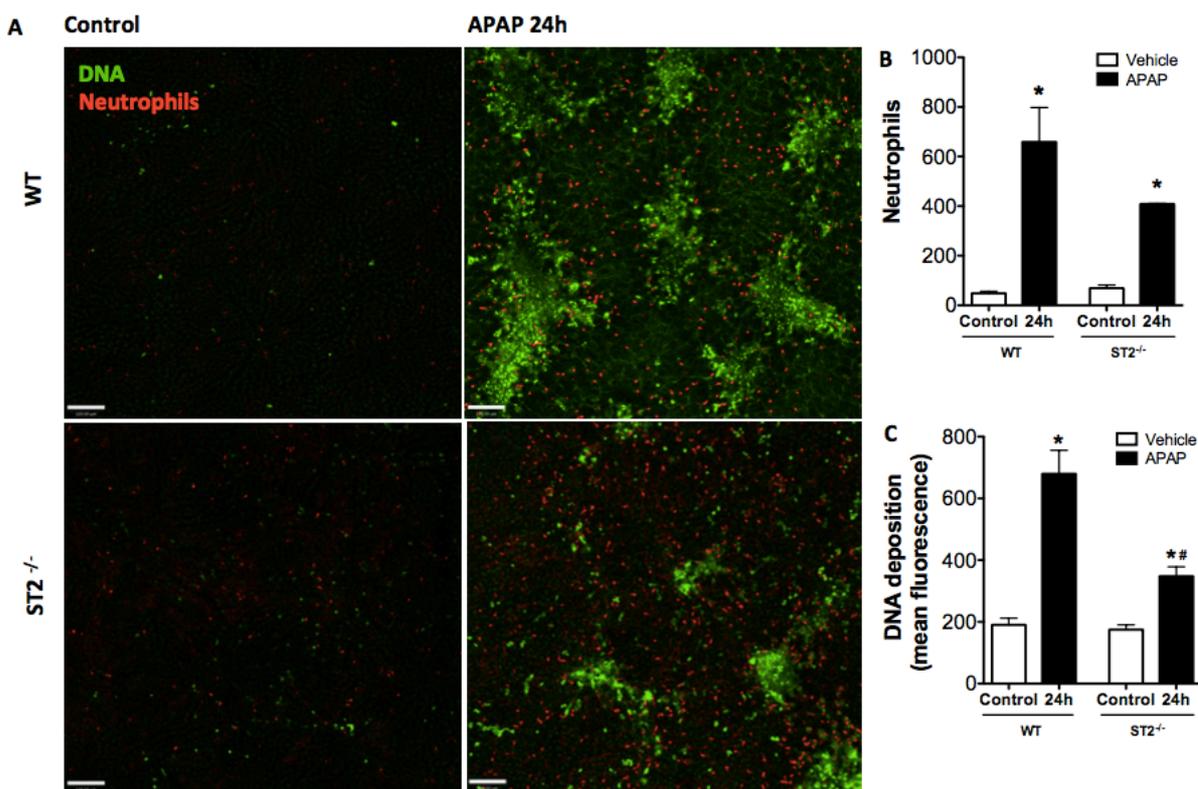


Figura 3. Sobredose de APAP aumenta infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA no fígado, o que é atenuado pela deficiência de ST2. (A) Acúmulo de neutrófilos (em vermelho – anticorpo anti-GR1) e DNA hepático (em verde – SytoxGreen) após 24 horas de APAP **(B)** Contagem direta, por imagem, de neutrófilos. **(C)** Porcentagem da área necrótica apresentada por media de fluorescência. Escala: 120 μ m. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente (teste *t* Student; $p < 0,05$).

4.4 Ausência de ST2 reduz os níveis de mediadores inflamatórios em resposta a APAP

O aumento da lesão por APAP está relacionado ao recrutamento de células inflamatórias para a zona de lesão (MARQUES *et al.*, 2015a). Assim, investigamos se a redução da lesão por APAP nos animais ST2^{-/-} estava associada à diminuição da liberação de mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento dessas células. Avaliando os níveis de CXCL1, uma potente quimiocina com efeitos pro-inflamatórios, observamos redução do mesmo no fígado e soro dos animais deficientes em ST2 (FIG. 4A-B). Houve ainda redução nos níveis hepáticos de outra quimiocina (CXCL2) nesses animais (FIG. 4C), ainda que os níveis séricos, apesar de serem mais baixos, não tenham apresentado diferença significativa (FIG. 4D).

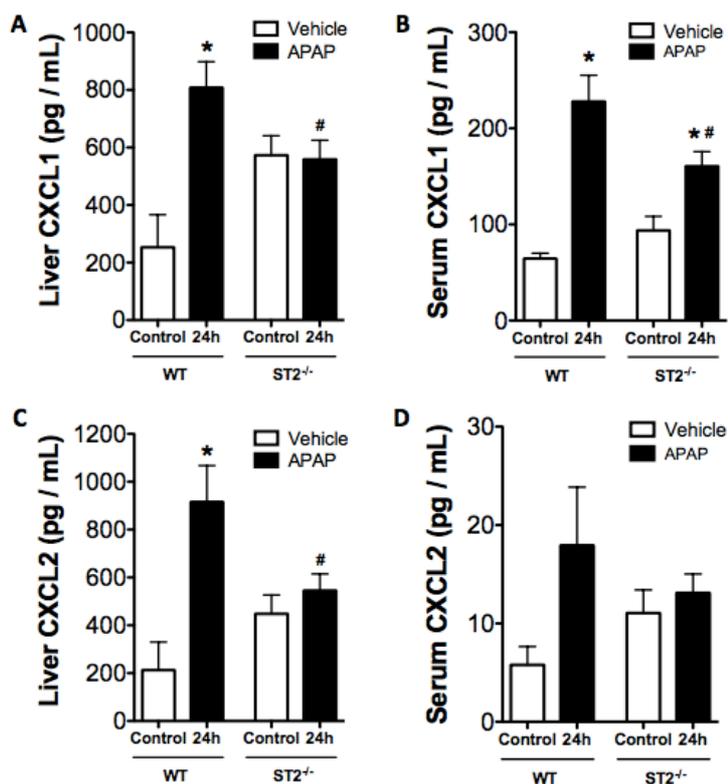


Figura 4. Sobredose de APAP aumenta níveis de quimiocinas no fígado e soro, o que é atenuado pela deficiência de ST2. Dosagem de CXCL1 no (A) fígado e (B) soro por ELISA e de CXCL2 também no (C) fígado e (D) soro por ELISA. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente (teste *t* Student; $p < 0,05$). Número de animais por grupo ≥ 5 .

4.5 Deleção de ST2 altera perfil de liberação de citocinas após APAP

Sabendo que o aumento da lesão mediada por APAP está relacionado ao recrutamento de células inflamatórias, e que em nosso estudo observamos alterações nos níveis de mediadores pro-inflamatórios envolvidos no recrutamento dessas células, investigamos a presença de citocinas envolvidas na manutenção do ambiente mais ou menos inflamado. Dosamos TNF e IL-10, citocinas pro e anti-inflamatórias, respectivamente, e observamos que o balanço parece tender para um ambiente menos inflamatório, uma vez que os animais $ST2^{-/-}$ apresentam níveis mais baixos de TNF, e mais altos de IL-10, em relação aos animais WT (FIG 5A-B).

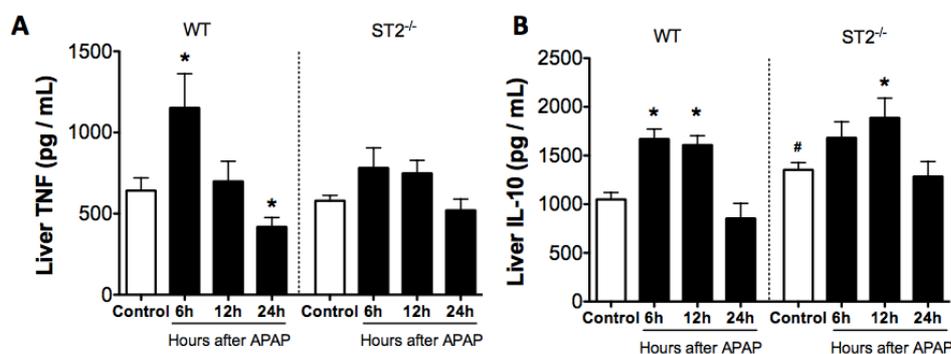


Figura 5. Perfil de liberação de citocinas é alterado durante a lesão hepática induzida por APAP. Camundongos foram tratados com sobredose de APAP (600 mg / kg), e amostras de fígado foram coletadas após 6, 12 e 24h horas, além dos animais controle. Dosagem por ELISA dos níveis hepáticos de (A) TNF e (B) IL-10. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente (teste *t* Student; $p < 0,05$). Número de animais por grupo ≥ 5 .

4.6 Células mielóides que detectam IL-33 são fundamentais para o agravamento da lesão por paracetamol

Tendo em vista o fenótipo observado, em que animais deficientes para o receptor ST2 apresentam proteção contra a toxicidade provocada por APAP, investigamos o papel do sistema imunológico na progressão da lesão. Para isso, utilizamos um modelo de quimerismo induzido por irradiação gamma - que causa depleção de células da medula do animal receptor - com posterior transferência de medula de animais doadores, não irradiados. Dessa forma, o animal irradiado, ao receber medula, terá células do sistema imunológico iguais às do doador, sendo o restante do organismo – em linhas gerais – não alterado. Isso é um modelo muito difundido para investigar o papel diferencial do sistema imunológico em relação às demais células do organismo (por exemplo, dos hepatócitos).

Observamos que a lesão (níveis séricos de ALT) nos animais WT irradiados que receberam células de animais ST2^{-/-} foi significativamente menor em relação aos animais WT convencionais, tanto nos tempos iniciais da lesão (6 horas) quanto nos tempos finais (12 e 24h), ainda que não tenha sido observada diferença estatística no tempo de 12h (FIG. 6A). A quantificação direta de neutrófilos por imagem confirma que há menor infiltrado dessas células nos tempos de 12 e 24 horas após APAP nos animais WT irradiados que receberam células de animais ST2^{-/-} (FIG. 6B). De maneira interessante, após a depleção animais ST2^{-/-} não sobrevivem à transferência de medula proveniente de animais WT, sem qualquer tratamento com APAP (FIG. 6C). Mas, após o repovoamento total, e então tratamento com APAP, observamos que tanto animais ST2^{-/-} quanto os animais WT que receberam medula desses animais, apresentaram maiores taxas de sobrevivência que os animais WT (FIG. 6D). Após 6-12 horas de APAP, foi possível observar infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA intravascular no fígado de camundongos WT, ST2^{-/-} e WT irradiados que receberam de medula deficiente em ST2. Entretanto, após 24 horas, tanto o número de neutrófilos quanto a deposição de DNA diminuem em camundongos ST2^{-/-} e WT que receberam medula de ST2^{-/-}, permanecendo elevados em camundongos WT, com acúmulo nas zonas de necrose (FIG. 6E). Logo, a substituição de células da medula de um animal selvagem por células deficientes em ST2 recaptula o fenótipo do animal deficiente em ST2.

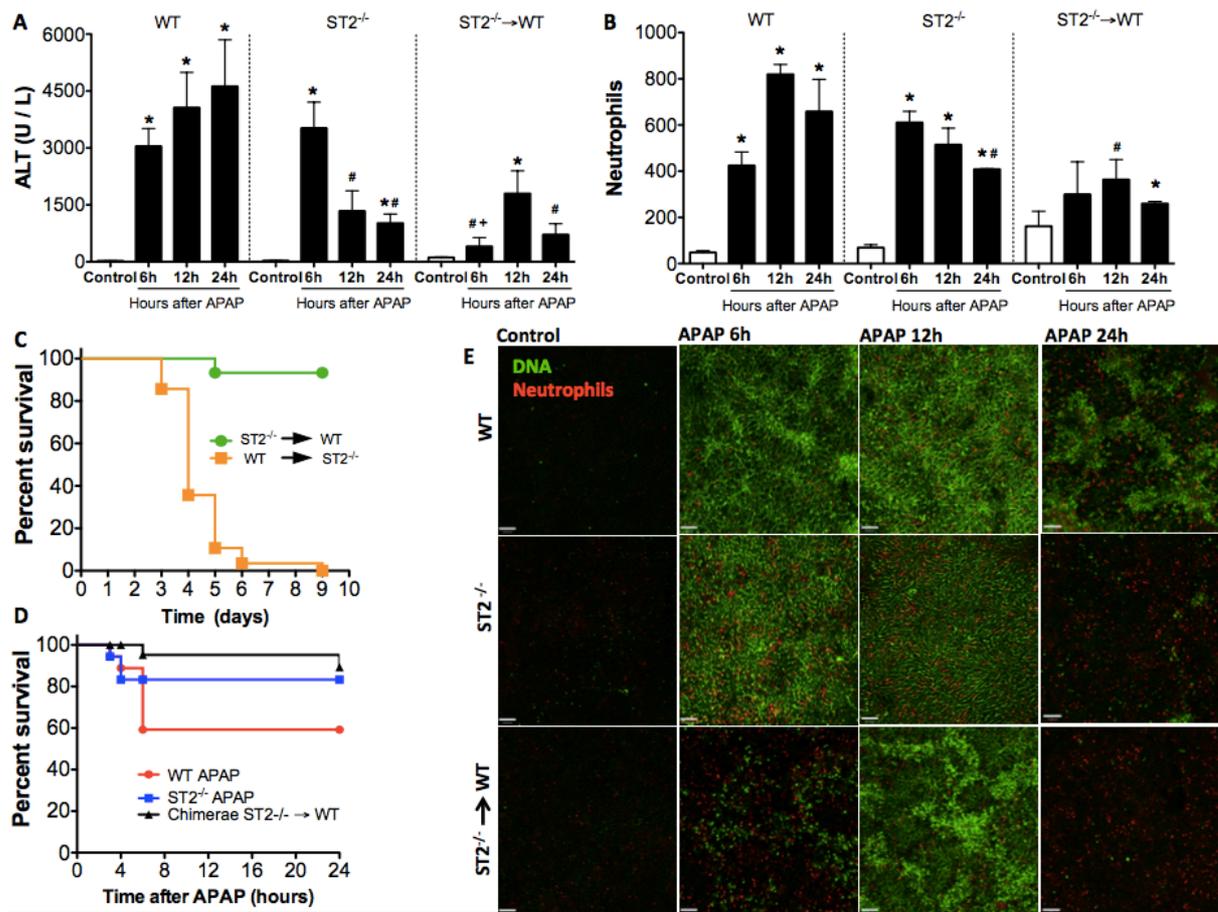


Figura 6. Transferência de medula óssea de camundongos ST2^{-/-} protege camundongos WT contra lesão hepática induzida por APAP, além de reduzir a infiltração de neutrófilos e deposição de DNA no fígado. (A) Curva de tempo-resposta (ALT) confirma lesão hepática por APAP (600 mg / kg). **(B)** Quantificação direta de neutrófilos. **(C)** Taxa de mortalidade em resposta à radiação e transferência de medula e **(D)** Taxa de mortalidade em resposta à sobredose de APAP. **(E)** Curva tempo-resposta de infiltração de neutrófilos e deposição de DNA em resposta à sobredose de APAP. Anticorpo anti-GR1 foi usado para marcação de neutrófilos (em vermelho). DNA extravascular / Necrose foi marcada com Sytox-green. Escala: 120 µm. * indica significância estatística em relação ao controle; # indica significância estatística em relação ao grupo WT correspondente, + indica significância estatística em relação ao grupo ST2^{-/-} correspondente (teste t Student; $p < 0,05$). Número de animais por grupo ≥ 5 .

4.7 Hepatócitos e células não-parenquimais hepáticas expressam elevados níveis de IL-33 após desafio por APAP

A IL-33 é também descrita como uma proteína presente constitutivamente no núcleo de células, e é essencial que seja liberada ou secretada para que se ligue ao seu receptor ST2, desempenhando assim sua função de “alarmina” (SCHMITZ *et al.*, 2005; ZHAO & HU, 2010). Após estímulo, diferentes populações celulares são capazes de liberar ou secretar IL-33, por vias distintas, ainda que essas fontes e estímulos não estejam claramente definidos (ZHAO & HU, 2010). Por exemplo, durante a hepatite induzida por concanavalina A (ConA) e Poly(I:C), hepatócitos aumentam a expressão de IL-33 (ARSHAD *et al.* 2011; 2012a; 2013) sugerindo que há ativação de vias inflamatórias também em células não-imunes. Dessa forma, investigamos quais seriam as fontes de IL-33, quais as possíveis células responsáveis por detectar e responder à presença de IL-33, e a provável ativação de vias mediadas pela interação com ST2. Primeiramente, isolamos hepatócitos de camundongos não tratados e tratados com APAP, e observamos por imunofluorescência o aumento de IL-33 nessas células 6 horas após tratamento com APAP (FIG. 7A-B). Embora não tenha sido observado aumento significativo da proteína nas dosagens por ELISA (FIG. 7C), observamos aumento significativo da expressão de *Il33* por qPCR também no tempo de 6 horas após APAP (FIG. 7D). Tendo confirmado o papel de hepatócitos enquanto fontes celulares de IL-33, investigamos se outras populações celulares hepáticas seriam também fontes de IL-33. Para isso, isolamos células não-parenquimais hepáticas, também de animais tratados e não tratados com APAP, e observamos que essas células também expressam níveis mais altos de *Il33* nos tempos de 6 e 24 horas após tratamento com APAP (FIG. 7E), embora em níveis mais baixos que os hepatócitos. Confirmando então que tanto hepatócitos, quanto células não-parenquimais, expressam IL-33, o próximo passo foi investigar quais dessas populações expressavam ST2. Avaliamos então hepatócitos e células não-parenquimais hepáticas de animais não tratados, e observamos a elevada expressão gênica de *Il1rl1* (ST2) por pelas células não parenquimais (FIG. 7F), em que inferimos que são essas as células responsáveis por responder à liberação de IL-33.

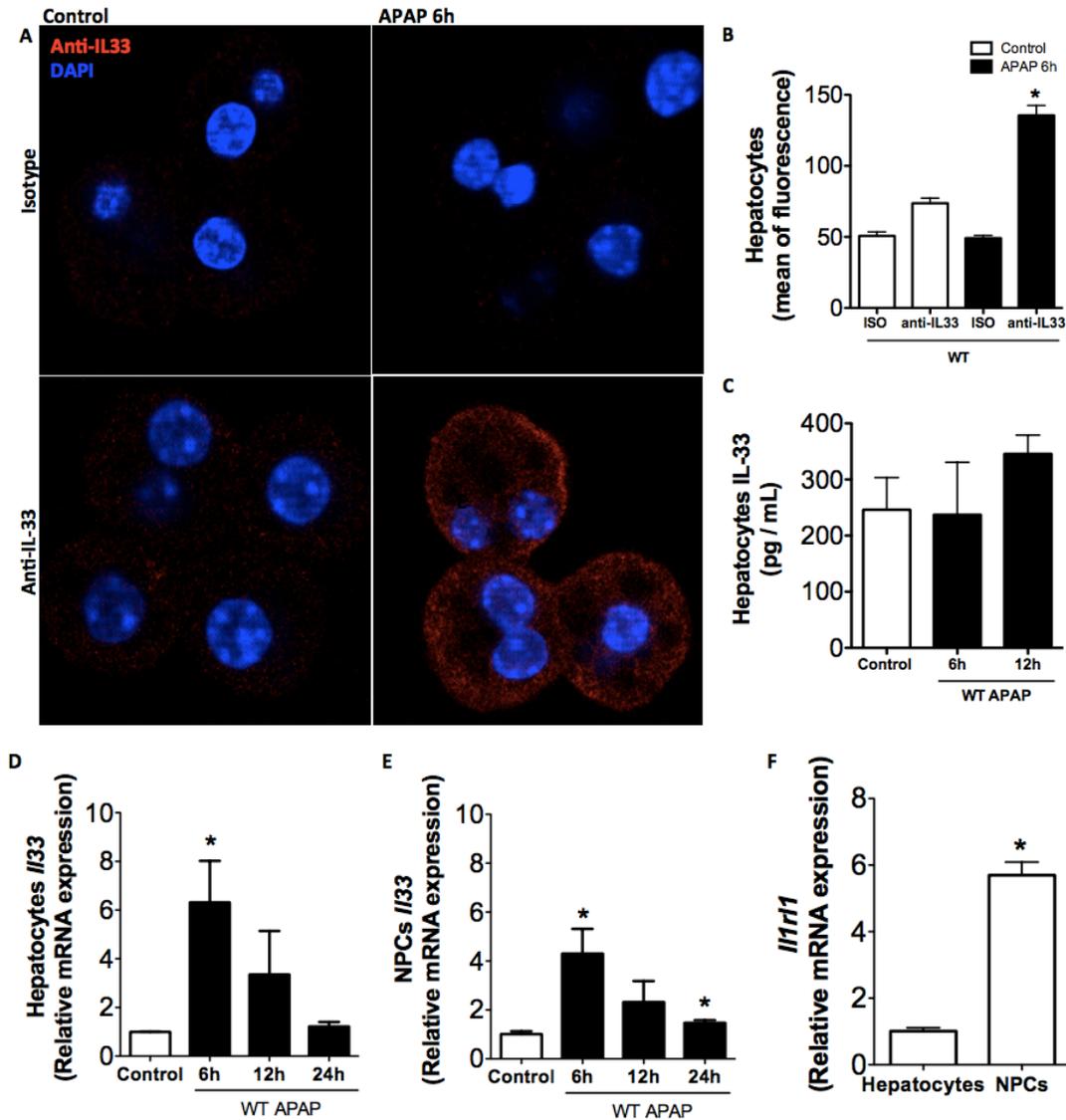


Figure 7. Sobredose de APAP aumenta expressão de IL-33 tanto em hepatócitos quanto em células não-parenquimais hepáticas (NPCs), mas NPCs são as principais responsáveis pela expressão de ST2. (A) Imunofluorescência de hepatócitos isolados de animais tratados e não tratados com APAP. DAPI foi utilizado para marcação nuclear (em azul). Marcação específica de IL-33 (em vermelho) foi confirmada pela marcação negativa dos isotipos controles. **(B)** Quantificação de fluorescência em (A) mostra aumento de IL-33 em hepatócitos isolados após tratamento com APAP. **(C)** Dosagem por ELISA de IL-33 em hepatócitos isolados. Avaliação da expressão gênica por qPCR confirma expressão de *Il33* em **(D)** hepatócitos e **(E)** NPCs isolados de animais tratados e não tratados com APAP, e **(F)** expressão de *Il1r1* em hepatócitos e NPCs isolados. * indica significância estatística em relação ao controle (teste *t* Student; $p < 0,05$).

4.8 Dentre as células não parenquimais hepáticas, os neutrófilos são as principais células presentes no fígado quando há aumento na expressão de IL-33

Uma vez que observamos aumento na expressão de IL-33 em células não – parenquimais hepáticas após o desafio com APAP, e que esse aumento era coincidente com o aumento da lesão, nosso próximo passo foi investigar quais os principais tipos celulares que poderiam estar relacionados com esse aumento. Observamos, por citometria de fluxo, aumento de células CD3⁺ 6 horas após o desafio com APAP, mas com diminuição das mesmas a níveis basais com 12 horas de tratamento (FIG. 8A). Observamos, ainda, diminuição de células F4/80⁺ (FIG. 8B), e aumento do infiltrado de células Ly6G⁺ (FIG. 8C), com o decorrer do tempo pós-APAP, o que nos leva a acreditar que os principais leucócitos responsáveis pela expressão de IL-33 são neutrófilos.

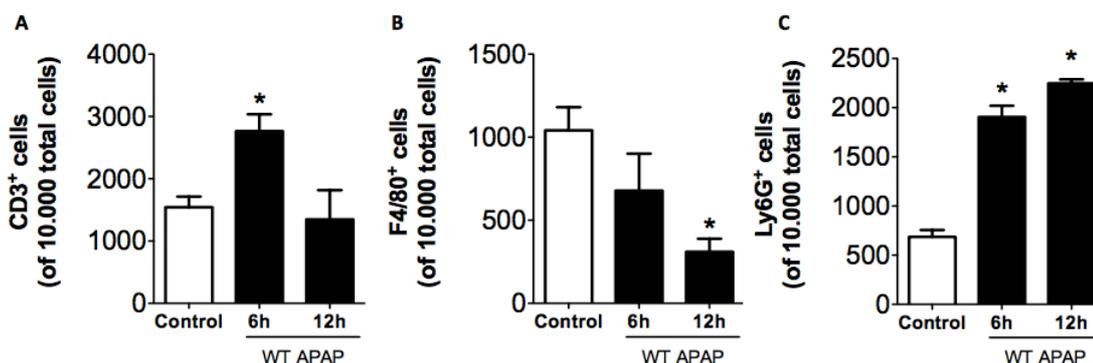


Figura 8. APAP induz aumento no infiltrado de leucócitos, que são constituídos principalmente por células Ly6G⁺. Citometria de fluxo de NPCs hepáticas isoladas apontam diminuição de células (A) CD3⁺ e (B) F4/80⁺, e um acúmulo proeminente de células (C) Ly6G⁺ após sobredose de APAP. * indica significância estatística em relação ao controle (teste *t* Student; *p* < 0,05).

4.9 Neutr3filos, mas n3o macr3fagos, est3o envolvidos na progress3o da les3o hep3tica dependente de IL-33

Para dissecar o papel diferencial desempenhado por neutr3filos e macr3fagos na progress3o da les3o hep3tica dependente de IL-33, depletamos esses dois tipos celulares. A deple3o de neutr3filos utilizando anticorpo anti-GR1 suprimiu o desenvolvimento da les3o hep3tica induzida por APAP, sendo o oposto observado quando macr3fagos hep3ticos s3o depletados com CLL. Observamos significativa redu3o de ALT, bem como diminu3o da atividade de MPO, nos animais com deple3o de neutr3filos (FIG. 9A-B). Isso sugere que enquanto c3lulas residentes possam ter um papel regulat3rio, as c3lulas infiltradas durante o pico da les3o – em especial, neutr3filos – podem agravar o quadro lesivo. Observamos que o perfil de express3o de IL-33 coincide com as deple3es utilizadas, em que observamos diminu3o da express3o de g3nica de //33 no f3gado (FIG. 9D) e soro (FIG. 9E), refor3ando a ideia de que neutr3filos, mas n3o macr3fagos, t3m influ3ncia direta na progress3o da les3o hep3tica dependente de IL-33.

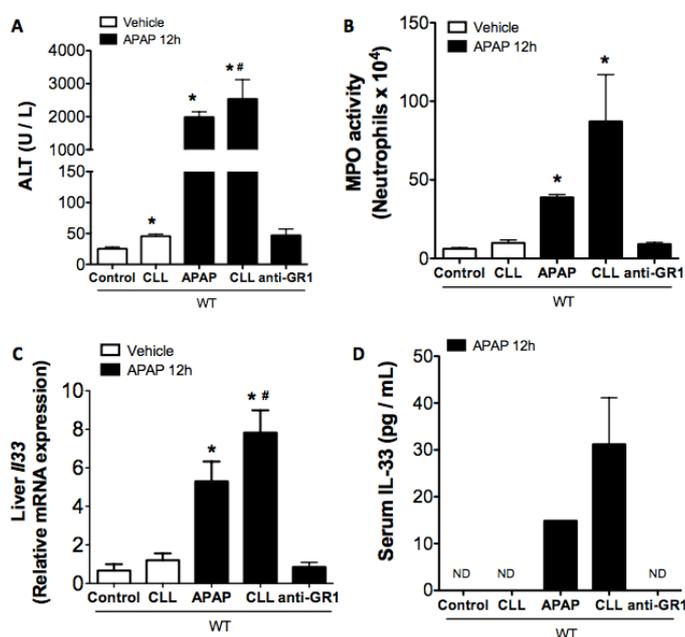


Figura 9. Libera3o de IL-33 e conseq3ente les3o hep3tica envolve participa3o de neutr3filos, mas n3o de macr3fagos. (A) ALT e **(B)** atividade de MPO no f3gado. **(C)** Express3o hep3tica de //33 e **(D)** n3veis s3ricos de IL-33 s3o reduzidos em camundongos com deple3o de neutr3filos, mas n3o de macr3fagos. ND, n3o detectado. * indica signific3ncia estat3stica em rela3o ao controle; # indica signific3ncia estat3stica em rela3o ao grupo controle-ve3culo correspondente (teste *t* Student; *p* < 0,05). N3mero de animais por grupo \geq 5.

DISCUSSÃO

A incidência de doenças hepáticas tem aumentado por todo o mundo, sendo um grave problema por poder levar à falência hepática aguda. Dentre essas drogas, o paracetamol (APAP) é um dos principais agentes, sendo apenas ele responsável por metade dos casos de falência hepática aguda nos EUA e Reino Unido (BERNAL & WENDON, 2013; VINKEN *et al.*, 2013). Durante a DILI, a morte de hepatócitos por necrose oncótica leva à liberação de moléculas intracelulares capazes de causar um intenso processo inflamatório (DAMPs), e que podem amplificar a lesão tecidual causada inicialmente pelo medicamento (CHEN & NUNEZ, 2010). Trabalho recente do nosso grupo de pesquisa demonstra que a liberação de DAMPS está diretamente ligada ao agravamento da lesão hepática induzida por droga (MARQUES *et al.*, 2015a). Dessa forma, a determinação dos DAMPs relevantes para a lesão hepática e o estabelecimento de estratégias para bloquear sua atividade ou reconhecimento pelo sistema imune poderiam representar estratégias promissoras na redução da gravidade da DILI.

Iniciamos nosso estudo com a utilização de um modelo de lesão hepática aguda, induzida por sobredose de paracetamol. Nesse modelo, os animais são deixados de 12 a 15 horas em jejum antes da administração do APAP, de forma a direcionar o tipo de morte dos hepatócitos para a necrose. Já foi demonstrado que animais deixados em jejum apresentam *per se* menores níveis de GSH e ATP no fígado, permitindo que os hepatócitos entrem de fato em necrose, caso contrário, haveria condições energéticas suficientes para que essa morte fosse direcionada para apoptose, o que levaria a uma menor lesão tecidual e inflamação (ANTOINE *et al.*, 2010; MACGILL & JAESCHKE, 2013). Em nosso estudo é importante que os hepatócitos entrem de fato em necrose pois esse tipo de morte expõem conteúdos intracelulares ao meio extracelular, que é exatamente o alvo de nosso estudo: como os conteúdos intracelulares são capazes de amplificar um dano inicial induzido pela droga. Após a administração de sobredose de APAP, o que pudemos observar é que há desenvolvimento de lesão hepática grave, o que pode ser constatado pelos elevados níveis de ALT, pela extensão da necrose observada por histologia, e pelo percentual de mortalidade observada nos animais. Interessantemente, animais deficientes para o receptor ST2 apresentaram queda em todos esses parâmetros,

mesmo após a utilização de 600 mg / kg de paracetamol, dose mais alta testada, capaz de induzir não apenas lesão, como também altas taxas de mortalidade (FIG 1A-D). A redução desses parâmetros, juntamente à diminuição dos níveis de CXCL1 e CXCL2 (FIG. 4A-C), são indicativos claros do abrandamento da lesão em camundongos deficientes para o eixo IL-33 / ST2.

Vários estudos têm relacionado a liberação de IL-33 à atenuação ou piora do dano hepático durante modelos de lesão hepática (MARVIE *et al.*, 2009; SAKAY *et al.*, 2012; ARSHAD *et al.*, 2012a). **Porém, em nenhum destes estudos, o envolvimento de IL-33 na patogênese da lesão hepática medicamentosa por paracetamol – o quadro mais frequente no mundo – havia sido investigado.** Dessa forma, propusemos estudar se frente à necrose de hepatócitos induzida por droga, em um contexto estéril, essa liberação de IL-33 estaria envolvida no processo inflamatório amplificador da lesão hepática durante a lesão induzida por APAP. Ao traçarmos a cinética de liberação de IL-33 durante a progressão da lesão, pudemos observar que ocorre um pico de liberação de IL-33 após 6 horas o desafio com APAP, que é coincidente com o início da lesão. Um indicativo de que a IL-33 pode ter papel fundamental na progressão é o fato de que animais deficientes para o seu receptor, mesmo apresentando os níveis de IL-33 também elevados, não apresentam o mesmo perfil de lesão, uma vez que não são capazes de detectá-la (FIG. 1E-F).

Trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa comprovam que durante a lesão hepática induzida por sobredose de APAP há desestabilização dos hepatócitos, com rompimento de membrana e liberação de DNA para o meio extracelular. Com isso, há aumento do recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão, com amplificação da mesma (MARQUES *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2015a). Em adição a isso, já foi demonstrado que, em neutrófilos, a IL-33 é capaz de prevenir a regulação negativa de CXCR2, e ativar a quimiotaxia induzida pela ativação de TLR4 (ALVES-FILHO *et al.*, 2010). Considerando a contribuição da deposição de DNA e do infiltrado de neutrófilos para a progressão da lesão hepática, fica clara a participação do eixo IL-33 / ST2 nesse fenômeno. Ao utilizar camundongos ST2^{-/-} observamos significativa redução dos depósitos de DNA, bem como do infiltrado de neutrófilos (FIG. 3A-C). O que é condizente com os níveis reduzidos de CXCL1 e CXCL2 encontrados nesses mesmos animais (FIG. 4A-C).

Tendo demonstrado claramente a existência de um fenótipo protegido nos

animais ST2^{-/-}, foi necessário avaliar se ambos animais WT e ST2^{-/-} eram igualmente capazes de metabolizar APAP, o que os tornaria susceptíveis à toxicidade pelo metabólito gerado, demonstrando assim que a proteção observada é decorrente da ausência do receptor, e não de uma possível incapacidade metabólica. Uma vez que os níveis de GSH hepáticos são depletados ao reagirem com o metabólito tóxico NAPQI (HINSON *et al.*, 2010), nossa estratégia foi dosar esses níveis de GSH após 2 horas o desafio com APAP. Dessa forma, mostramos igual redução de GSH em ambos os animais, comprovando que a proteção observada nos animais ST2^{-/-} não é de origem metabólica. No entanto, é interessante observar que mesmo a depleção de GSH sendo a mesma em ambas as linhagens, os níveis de ALT nos animais deficientes para ST2 são 3 vezes mais altos nesse mesmo tempo avaliado, reforçando a ideia de que a lesão inicial é de origem tóxica, mas o agravamento da mesma é mediado pela ativação do sistema imune e, ainda, é IL-33 / ST2 dependente (FIG. 2A-B).

Como já mencionado, a necrose de hepatócitos induzida pela toxicidade de APAP leva à liberação de moléculas intracelulares, como produtos mitocondriais e quimiocinas (CHEN & NUNEZ, 2010; MARQUES *et al.*, 2012). Essas moléculas intracelulares, os DAMPs, causam um intenso processo inflamatório, com acúmulo especialmente de neutrófilos, que podem amplificar a lesão causada inicialmente pelo medicamento (MARQUES *et al.*, 2015a). Nessa linha de raciocínio, é factível supor que uma célula com as características tão particulares como o hepatócito – que 25% do seu peso é devido ao DNA nuclear e possui cerca de 3000 mitocôndrias – seria uma rica fonte de DAMPs após a sua necrose induzida por APAP. Tendo isso em vista, e considerando o fato de que animais deficientes para o receptor ST2 apresentam proteção contra a toxicidade provocada por APAP, investigamos o papel do sistema imune na progressão da lesão. Para tanto, utilizamos um protocolo de geração de quimeras em que há emprego de irradiação gamma, causando depleção de células da medula, com posterior transferência de medula entre animais WT e ST2^{-/-}. Assim, teríamos animais em que as células não imunes seriam originalmente WT, mas com células imunes deficientes para ST2. Complementarmente, a estratégia oposta também foi empregada: animais com todas as células não imunes sendo deficientes em ST2, mas agora com células imunes que expressam o receptor. Quando desafiamos esses animais com APAP, agora já totalmente repovoados com as medulas transferidas, o que observamos é que um animal WT

que recebeu a medula de outro animal ST2^{-/-}, responde como um animal ST2^{-/-} naive, com redução de todos os parâmetros indicativos de lesão hepática como níveis de ALT, infiltrado de neutrófilos e deposição de DNA. Esses achados, em conjunto, reforçam a ideia de que **o sistema imune tem papel fundamental no agravamento da lesão induzida pelo APAP, e que o eixo IL-33 / ST2 é crucial para a progressão da lesão inflamatória disparada pela necrose** (FIG. 6A-E).

A localização nuclear da IL-33 foi observada em 2007 (CARRIERE *et al.*, 2007), sendo expressa constitutivamente nos núcleos das células endoteliais, e nas células epiteliais dos tubos digestório e respiratório (LEFRANÇAIS & CAYROL, 2012). Em camundongos a expressão de IL-33 endotelial parecia estar restrita ao tecido adiposo, aparelho reprodutor de fêmeas e fígado (PICHERY *et al.*, 2012). No entanto, além dos hepatócitos, são encontradas no fígado outro grande grupo de células, que são as células não-parenquimais. Entre essas células se destacam linfócitos, KCs, células dendríticas, e também neutrófilos, especialmente durante a DILI. A grande questão era diferenciar o papel desses dois grandes grupos celulares hepáticos no desenvolvimento da lesão, e a relação entre eles e a ação da IL-33. O primeiro passo foi o isolamento de hepatócitos primários, um protocolo já descrito e bem estabelecido pelo nosso grupo para estudo da toxicidade por APAP (VINKEN *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2015a). Mas ao contrário de uma cultura convencional, onde os hepatócitos são desafiados isoladamente após o isolamento, nesse estudo os hepatócitos foram isolados de animais que – *in vivo* – sofreram o desafio com APAP. Ou seja, as células hepáticas, imunes ou não, experimentam o contexto necrótico-inflamatório antes de serem isoladas. Utilizando duas técnicas diferentes, imunofluorescência e PCR, nós observamos que hepatócitos são capazes de produzir IL-33 após o desafio com APAP (FIG. 7A-D) e, mais uma vez, tanto a visualização por imunofluorescência, quanto o pico de expressão de *IL33*, são condizentes com o aumento da IL-33 observada no fígado 6 horas após APAP (FIG. 1E). Em linha com esses dados, ao isolarmos também células não-parenquimais, comprovamos que essas células também estão envolvidas na expressão de IL-33 após o desafio com APAP (FIG. 7E). No entanto, é essencial que a IL-33 liberada sinalize via ST2 para induzir respostas celulares (LEFRANÇAIS & CAYROL, 2012). Por isso, o próximo passo foi investigar qual tipo celular poderia ser o sensor de IL-33, indicado pela expressão de ST2. E o que observamos foi que, embora tanto hepatócitos quanto células não-parenquimais sejam células capazes de produzir IL-

33, a expressão de ST2 pelas células não-parenquimais era significativamente maior, colocando as células imunes hepáticas como as principais candidatas a sensores de IL-33 (FIG. 7F).

Durante a DILI, há consideráveis alterações nas populações celulares encontradas no fígado. Assim, além da morte de hepatócitos, o estresse e dano pelo qual o órgão passa provoca também alteração das populações de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, presentes no fígado. Ao isolarmos esses três tipos celulares, observamos que após APAP há depleção de células F4/80⁺ e aumento de células Ly6G⁺, mostrando que neutrófilos são as principais células presentes no fígado durante a DILI (FIG. 8B-C). Vale a pena mencionar que nosso grupo já demonstrou que a sobredose de APAP – *per se* – causa depleção de células de Kupffer (DAVID *et al.*, 2016), sendo essas necessárias para a regeneração do fígado através da produção de diversos mediadores inflamatórios, como IL-6 e TNF. A produção de TNF, por exemplo, é necessária para iniciar a proliferação de hepatócitos (HINSON *et al.*, 2010), subsidiando nossa observação que no pico da necrose por APAP há diminuição dos níveis de TNF hepáticos (FIG. 5A). Considerando isso, junto ao fato de que os sensores de IL-33 são células do sistema imune (FIG. 7F), poderia ser esperado que essas alterações interferissem na cinética de liberação e *sensing* de IL-33. Neste trabalho demonstramos que a depleção de KCs – mas não de neutrófilos – aumenta a gravidade da lesão hepática em relação a um animal não depletado (FIG 9A). Interessantemente, ao depletarmos KCs, mesmo com grande aumento da lesão por APAP, vimos que tanto a expressão hepática, quanto os níveis séricos de IL-33 não diminuem. No entanto, depletando neutrófilos, além de haver diminuição da lesão, há também redução drástica tanto da expressão hepática, quanto dos níveis séricos de IL-33 (FIG. 9C-D). A reunião desses dados coloca o neutrófilo que infiltra no fígado após a lesão tóxica por APAP como um possível maestro da exarcebação inflamatória mediada pelo eixo IL-33/ST2, função até então geralmente atribuída a células residentes, como os macrófagos.

CONCLUSÕES

- 1) O eixo IL-33 / ST2 participa da porção imunomediada da amplificação da lesão hepática;
- 2) Hepatócitos não são responsáveis pelo *sensing* de IL-33 liberada durante a necrose;
- 3) Células imunes não-parenquimais são os principais candidatos a sensores de IL-33 liberada ou produzida durante a necrose por APAP;
- 4) Dentre essas células não-parenquimais hepáticas, neutrófilos infiltrados durante a lesão parecem ser os principais carreadores e sensores de IL-33 liberada pela morte de hepatócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-FILHO, J.C.; SÔNEGO, F.; SOUTO, F.O.; FREITAS, A.; VERRI JR, W.A. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature Medicine*, v. 16, n. 6, p. 708-713, 2010.

AMARAL, S. S.; OLIVEIRA, A. G.; MARQUES, P. E.; QUINTAO, J. L.; PIRES, D. A. et al. Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. *Cell Commun Signal*, v. 11, n. 1, p. 10, 2013.

ANTONIADES, C.G.; QUAGLIA, A.; TAAMS, L.S.; MITRY, R.R.; HUSSAIN, M. et al. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. *Hepatology*, v. 56, n. 2, p. 735-46, 2012.

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.

ARSHAD, M.I.; RAUCH, M.; L'HELGOUALC'H, A.; JULIA, V.; LEITE-DE-MORAES, M.C. et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur. J. Immunol*, v. 41, p. 2341–2348, 2011.

ARSHAD, M.I.; PIQUET-PELLORCE, C.; L'HELGOUALC'H, A.; RAUCH, M.; PATRAT-DELON, S. et al. TRAIL But Not FasL and TNF α , Regulates IL-33 Expression in Murine Hepatocytes During Acute Hepatitis. *Hepatology*, v. 56, n. 6, p. 2353-2362, 2012a.

ARSHAD, M.I.; PIQUET-PELLORCE, C.; SAMSON, M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver Intern*, p. 1200-1212, 2012.

ARSHAD, M.I.; PATRAT-DELON, S.; PIQUET-PELLORCE, C.; L'HELGOUALC'H, A.; RAUCH, M. et al. Pathogenic mouse hepatitis virus or Poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis. *PLOS One*, v. 8, n. 9, p. 1-10 e74278, 2013.

BAEKKEVOLD, E.S.; ROUSSIGNÉ, M.; YAMANAKA, T.; JOHANSEN, F.E.; JAHNSEN, F.L. et al. Molecular Characterization of NF-HEV, a Nuclear Factor Preferentially Expressed in Human High Endothelial Venules. *American Journal of Pathology*, v. 163, n. 1, p. 69-79, 2003.

BALMER, M. L.; SLACK, E.; DE GOTTARDI, A.; LAWSON, M. A.; HAPFELMEIER, S. et al. 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. 237-266, 2014.

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.

- BESSA, J.; MEYER, C.A.; MUDRY, M.C.V.; SCHLICHT, S.; SMITH, S.H. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun*, v. 55, p. 33-41, 2014.
- CARRIERE, V.; ROUSSEL, L.; ORTEGA, N.; LACORRE, D.A.; AMERICH, L. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *PNAS*, v. 104, n.1, p. 282-287, 2007.
- CAYROL, C.; GIRARD, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, n. 22, p. 9021-9026, 2009.
- CHACKERIAN, A.A.; OLDHAM, E.R.; MURPHY, E.E.; SCHMITZ, J.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R.A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*, v. 179, p. 2551-2555, 2007.
- CHAMBERS, J.W.; LOGRASSO, P.V. Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation. *J Biol Chem*, v. 286, n. 18, p. 16052-16062, 2011.
- CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 12, p. 826-837, 2010.
- CHUN, L.J.; TONG, M.J.; BUSUTTIL, R.W., HIATT, J.R. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *J Clin Gastroenterol*, v. 43, n. 4, p. 342-349, 2009.
- CRUZ, L. N.; GUERRA, M. T.; KRUGLOV, E.; MENNONE, A.; GARCIA, C. R. et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. *Hepatology*, v. 52, n. 1, p. 327-337, 2010.
- DAVID, B.A.; REZENDE, R.M.; ANTUNES, M.M.; SANTOS, M.M.; FREITAS-LOPES, M.A. et al. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology*, v. 151, n. 6, p. 1176-1191. 2016.
- DUNCAN, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol*, v. 24, n. 4, p. 347-356, 2013.
- GARLANDA, C.; DINARELLO, C.A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, 2013.
- HARDMAN, C.S.; PANOVA, V.; MCKENZIE, A.N.J. IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur J Immunol*, v. 43, p. 488-498, 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.
- IMAEDA, A. B.; WATANABE, A.; SOHAIL, M. A.; MAHMOOD, S.; MOHAMADNEJAD, M. et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*, v. 119, n. 2, p. 305-314, 2009.

- JAESCHKE, H.; WILLIAMS, C.D.; RAMACHANDRAN, A.; BAJT, M.L. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int*, v. 32, n. 1, p. 8-20, 2012.
- JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, v. 31, n. 12, p. 1499-1506, 2003.
- JENNE, C. N.; KUBES, P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*, v. 14, n. 10, p. 996-1006, 2013.
- KEARLEY, J.; SILVER, J.S.; SANDEN, C.; LIU, Z.; BERLIN, A.A. et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity* v. 42, p. 566–579, 2015.
- KRENKEL, O.; MOSSANEN, J.C.; TACKE, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surg Nutr*, v. 3, n. 6, p. 331-343, 2014.
- KUBES, P.; MEHAL, W.Z. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, v. 143, n. 5, p. 1158-1172, 2012.
- LARSEN, F.S.; WENDON, J. Understanding paracetamol-induced liver failure. *Intensive Care Med*, v. 40, n. 6, p. 888-890, 2014.
- LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E. et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, v. 42, n. 6, p. 1364-1372, 2005.
- LEE, W.M. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology*, v. 46, n. 4, p. 966–970. 2007.
- LEE, W. M. Acute liver failure. *Semin Respir Crit Care Med*, v. 33, n. 1, p. 36-45, 2012.
- LEE, W. Y.; MORIARTY, T. J.; WONG, C. H.; ZHOU, H.; STRIETER, R. M. et al. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat Immunol*, v. 11, n. 4, p. 295-302, 2010.
- LEFRANÇOIS, E.; CAYROL, C. Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur. Cytokine Netw*, v. 23, n. 4, p. 120-127, 2012.
- LEFRANÇOIS, E.; ROGA, S.; GAUTIER, V.; GONZALEZ-DE-PEREDO, A.; MONSARRAT, B. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *PNAS*, v. 109, n. 5, p. 1673-1678, 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.; GUNAVAN, B.; KAPLOWITZ, N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, v. 43, N. 6, p.1220–1230,

2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUEDDE, T.; KAPLOWITZ, N.; SCHWABE, R. F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*, v. 147, n. 4, p. 765-783, 2014.

LÜTHI, A.U.; CULLEN, S.P.; MCNEELA, E.A.; DURIEZ, P.J.; AFONINA, I.S. et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*, v. 31, p. 84-98, 2009.

MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; NOGUEIRA, L. L.; SORIANI, F. M. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*, v. 56, n. 5, p. 1971-1982, 2012.

MARQUES, P. E.; OLIVEIRA, A.G.; PEREIRA, R.V.; DAVID, B.A., GOMIDES, L.F. et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*, v. 61, n. 1, p. 348-60, 2015a.

MARQUES, P.E.; ANTUNES, M.M; DAVID, B.A.; PEREIRA, R.V.; MENEZES, G.B. Imaging liver biology *in vivo* using conventional confocal microscopy. *Nature Protocols*, v. 10, n. 2, p. 258-268, 2015b.

MARTIN-MURPHY, B.V.; HOLT, M.P.; JU, C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett*, v. 192, n. 3, p. 387-94, 2010.

MARVIE, P.; LISBONNE, M.; L'HELGOUALC'H, A.; RAUCH, M.; TURLIN, B. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med*, v. 14, n. 6B, p. 1726-1739, 2010.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B.; HIROTA, S. A.; SLABA, I. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, v. 330, n. 6002, p. 362-366, 2010.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology*, v. 151, n. 6, p. 1087–1095, 2016.

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.

MILLER, A.M. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond)*, p. 8-22. 2011.

MILLER, A.M; LIEW, L.Y. The IL-33/ST2 pathway: A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 131, p. 179–186, 2011.

MOLOFSKY, A.B.; SAVAGE, A.K.; LOCKSLEY, R.M. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity*, v. 42, p. 1005-1019, 2015.

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

PICHERY, M.; MIREY, E.; MERCIER, P.; LEFRANÇAIS, E.; DUJARDIN, A. et al. Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel *Il-33* -*LacZ* Gene Trap Reporter Strain. *J Immunol*, v. 188, p. 3488-3495, 2012.

PIRES, D. A.; MARQUES, P. E.; PEREIRA, R. V.; DAVID, B. A.; GOMIDES, L. F. et al. 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.

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.

SAKAI, N.; SWERINGEN, H.L.V.; QUILLIN, R.C.; SCHUSTER, R.; BLANCHARD, J. et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*, v. 56, n. 4, p. 1468-1478, 2012.

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

SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E. et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity*, v. 23, p. 479-490, 2005.

TALABOT-AYER, D.; LAMACCHIA, C.; GABAY, C.; PALMER, G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem*, v. 284, n. 29, p.19420-19426, 2009.

TALABOT-AYER, D.; MARTIN, P.; VESIN, C.; SEEMAYER, C.A.; VIGNE, S. et al. Severe Neutrophil-Dominated Inflammation and Enhanced Myelopoiesis in IL-33-Overexpressing CMV/IL33 Mice. *J Immunol*, v. 194, p. 750-760, 2015.

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.

TOMINAGA, S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Letters*, v. 258, n. 2, p. 301-304, 1989.

TOMINAGA, S.; KUROIWA, K.; TAGO, K.; IWAHANA, H.; YANAGISAWA, K. et al. Presence and Expression of a Novel Variant Form of ST2 Gene Product in Human Leukemic Cell Line UT-7/GM. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 264, n. 1, p. 14-18, 1999.

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, D. W.; YIN, Y. M.; YAO, Y. M. Advances in the management of acute liver failure. *World J Gastroenterol*, v. 19, n. 41, p. 7069-77, 2013.

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.

ZHAO, W.; HU, Z. The enigmatic processing and secretion of interleukin-33. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 7, p. 260-262, 2010.