

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

Tese de Doutorado

Produção de Interferon do tipo I por células não-parenquimais hepáticas aumenta a necrose induzida por Paracetamol.

Alan Moreira de Araújo

Tese de Doutorado

Produção de Interferon do tipo I por células não-parenquimais hepáticas aumenta a necrose induzida por Paracetamol.

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro de 2018

Alan Moreira de Araújo

Produção de Interferon do tipo I por células não-parenquimais hepáticas aumenta a necrose induzida por Paracetamol.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do departamento de Morfologia, do Instituto e Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Gustavo Batista de Menezes

Co-Orientador: André Gustavo de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Gustavo, por ter me acolhido no seu grupo, por ter me ensinado a ser um profissional melhor, não só com palavras, mas com exemplos. Por ter me ensinado a reconhecer o meu valor e por ter me ensinado o que é fazer ciência de verdade.

Agradeço ao meu co-orientador, André, por ter aceitado participar dessa jornada comigo, por todos os conselhos e por ter me mostrado que é possível atingir meus objetivos se tiver persistência e determinação .

Agradeço a todos(as) amigos(as) do CGB, por me acolherem, por toda a ajuda que nunca negaram e por transformarem o nosso laboratório no melhor lugar do mundo para trabalhar.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos na minha vida e por todas as oportunidades de crescimento.

Agradeço a minha esposa Nicolli por todo amor e por acreditar em mim sempre. Sem ela eu certamente não teria chegado até aqui.

Agradeço a minha família por todo o apoio e incentivo, especialmente minha mãe, meu pai, minha irmã e minha avó. Por todo o esforço para me ajudar chegar até aqui e por continuar me dando todo o auxílio nessa caminhada.

E por fim, agradeço por todos os que mandam boas energias para mim e torcem pela minha felicidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA	10
1.1. O FÍGADO	10
1.2. LESÃO HEPÁTICA AGUDA CAUSADA POR MEDICAMENTO	13
1.3. SENSORES DE DNA CITOPLASMÁTICOS.....	16
1.4. STING.....	18
1.5. AIM2	21
1.6. TLR9.....	24
1.7. DNA SENSING NO FÍGADO	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	29
3.2. MODELO DE LESÃO HEPÁTICA	29
3.3. DOSAGEM DE ALT.....	30
3.4. HISTOLOGIA.....	30
3.5. MICROSCOPIA INTRAVITAL	30
3.6. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS.....	31
3.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS HEPÁTICAS	32
3.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	
33	
3.8.1. EXTRAÇÃO DE RNA.....	33
3.8.2. SÍNTESE DE CDNA.....	33
3.8.3. PCR QUANTITATIVO (qPCR)	33
3.9. CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. INDUÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA AGUDA ESTÉRIL E DEPOSIÇÃO DE	
DNA NO FÍGADO.	38
4.2. OS SENSORES DE DNA SÃO DIFERENTEMENTE EXPRESSOS NAS	
POPULAÇÕES HEPÁTICAS.....	40
4.3. AS EXPRESSÕES DOS SENSORES DE DNA DIVERGEM NAS	
POPULAÇÕES HEPÁTICAS DURANTE A LESÃO ESTÉRIL.	43

4.4. AS CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS PRODUZEM IFN I DURANTE A LESÃO HEPÁTICA ESTÉRIL.	46
4.5. AS CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS PRODUZEM IFN I NA LESÃO HEPÁTICA ESTÉRIL DEVIDO À PRESENÇA DE DNA INTRAVASCULAR.....	49
4.6. A PRODUÇÃO DE IFN I AGRAVA A LESÃO HEPÁTICA	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2 – Absent in melanoma (sensor de DNA)

ALT – Alanina aminotransferase

APAP – *Acetaminophen*; Paracetamol

ASC - Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase activation and recruitment domain (componente do inflamassoma)

BSA – Albumina sérica bovina

CDN – dinucleotídeo cíclico

CEUA – Comitê de ética em experimentação Animal da UFMG

cGAMP – cGMPcAMP dinucleotídeo cíclico

cGAS - GMP-AMP cíclico sintase (sensor de DNA)

Ct – *Threshold cycle*

CyTOF – citometria de massas

DAI (ou ZBP1) - Z-DNA binding protein 1 (sensor de DNA)

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

DDX41 - DEAD-Box Helicase 41 (sensor de DNA)

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

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNA-PK - DNA-dependent Protein Kinase (sensor de DNA)

FHA – Falência Hepática Aguda

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSH – Glutathiona reduzida

H&E – Hematoxilina e Eosina

HEP – Hepatócitos

HBV – vírus da hepatite B

HCV – vírus da hepatite C

HMGB1 – *High-motility group box 1*

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

IFI16 (ou p204) - Interferon-Inducible Protein (sensor de DNA)

IFN I – Interferon do tipo I

IFNAR – receptor de interferon tipo I

IL- – Interleucina

IRF3 - Interferon Regulatory Factor 3

IRF7 - Interferon Regulatory Factor 3

IVM – Microscopia intravital Confocal

KC – Célula de Kupffer

LPS – Lipopolissacarídeo

LSEC – Célula endotelial sinusoidal do fígado

MYD88 - myeloid differentiation primary response protein 88

NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonaimina

NF-κB – Fator de transcrição nuclear

NK – Célula *natural killer*

NKT – Célula *natural killer T*

NPC – células não-parenquimais

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

RNA – Ácido ribonucleico

STING – Stimulator of Interferon Genes (sensor de DNA)

TAA – *Thioacetamide*; Tioacetamida

TBK1 – tank-binding kinase 1

TLR – Receptor tipo-toll

TLR9 – Toll-like receptor 9

WT – *Wild-type*; Tipo selvagem

1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

1.1. O FÍGADO

O fígado é um dos maiores órgãos sólidos no organismo, compreendendo aproximadamente 2% do peso corporal total em humanos e 5% em camundongos. Anatomicamente, situa-se quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. É revestido pelo peritônio em quase toda a sua extensão, formando uma cápsula de tecido conjuntivo, também conhecida como cápsula de Glisson (Vollmar & Menger, 2009). O fígado é um órgão altamente vascularizado cujo aporte sanguíneo é feito principalmente pela veia porta, que traz o sangue venoso pouco oxigenado e rico em nutrientes provenientes do intestino, e pela artéria hepática (ramo do tronco celíaco), que supre o órgão com sangue rico em oxigênio. Aproximadamente 80% do sangue chega ao fígado pela veia porta, o que confere a esse órgão uma posição estratégica no corpo, visto que ele funciona como um filtro de tudo que é absorvido no intestino. A perfusão sanguínea no interior do órgão é feita dentro de vasos sanguíneos fenestrados do tipo sinusóide, sob baixa pressão e tensão de oxigênio. A dupla irrigação confere a ele alta capacidade metabólica e heterogeneidade funcional (Jenne & Kubes, 2013; Vollmar & Menger, 2009).

A unidade estrutural básica deste órgão possui forma hexagonal e é o lóbulo hepático. É formado a partir de septos de tecido conjuntivo provenientes da cápsula de Glisson e contém placas paralelas de hepatócitos entremeadas por capilares sinusoides. Os hepatócitos correspondem a 80% das células

hepáticas e realizam quase todas as funções metabólicas e secretoras do órgão. No centro de cada lóbulo encontra-se a veia centrolobular e nos “vértices” dos lóbulos encontram-se os espaços-porta, que são constituídos pela tríade de ramos da veia porta, artéria hepática e ducto biliar. O Fluxo sanguíneo ocorre do espaço porta em direção à veia centrolobular, de maneira que todo sangue é drenado para fora do órgão pela veia cava (Vollmar & Menger, 2009). As células endoteliais hepáticas (LSECs) são muito diferentes das células endoteliais convencionais, pois são bastante delgadas e não possuem membrana basal. Além disso, possui fenestras amplas e sem diafragmas, o que confere à microcirculação desse órgão um caráter especial de troca de substância com o parênquima, de maneira a permitir que os hepatócitos mantenham contato direto com macromoléculas e células carregadas pelo sangue. (DeLeve, 2013). Dentro dos sinusóides hepáticos reside os macrófagos residentes hepáticos, também conhecidos como células de Kupffer (KCs). Essas células estão em contato direto com o fluxo sanguíneo e, por isso, são capazes de fazer fagocitose direta de elementos da microcirculação hepática. As KCs e LSECs formam juntas o maior sistema retículo endotelial do corpo, cuja função é capturar micro-organismos, antígenos e células que precisam ser eliminados da circulação. Dessa maneira, as KCs agem como um filtro contra agentes da microbiota e LPS que possam, por ventura, atravessar a barreira intestinal e atingir a circulação. (Dixon, Barnes, Tang, Pritchard, & Nagy, 2013; Jenne & Kubes, 2013). Além dos macrófagos residentes e das LSECs, o fígado possui uma população muito variada de células residentes não-parenquimais (NPCs), como células dendríticas, células de Ito, além de linfócitos T, B, NK e NKT (Jenne & Kubes,

2013). Um estudo recente do nosso grupo combinou citometria de massas (CyTOF) e microscopia intravital para identificar as diferentes populações não-parenquimais hepáticas. Foram encontradas quatro populações distintas de células dendríticas residentes. É bem provável que essas células residam no espaço subcapsular e no tecido conjuntivo que circunda os grandes vasos, uma vez que o perfil transcricional e a morfologia dessas células são bem semelhantes ao das células dendríticas do baço (David et al., 2016).

O fígado desempenha mais de 100 papéis diferentes, incluindo funções endócrinas, exócrinas e metabólicas, a maioria das quais é realizada pelos hepatócitos. Essa grande diversidade funcional faz com que o fígado desempenhe um papel vital no organismo, mas o que torna esse órgão único é a capacidade regenerativa conferida pelos hepatócitos. Estima-se que o tempo de vida de um hepatócito seja entre 200 e 300 dias, logo, em um indivíduo adulto saudável, a frequência de células em qualquer etapa do ciclo de divisão celular é menor que 0,1% (Fausto & Campbell, 2003). No entanto, após hepatectomia parcial, por exemplo, procedimento no qual 2/3 do fígado são cirurgicamente removidos, observa-se uma intensa proliferação de hepatócitos que regeneram a massa e a função do órgão em um curto período de tempo (Fausto & Campbell, 2003). Além da grande plasticidade funcional dos hepatócitos requerida para a manutenção da homeostase e da capacidade regenerativa, essas células também são caracterizadas por alta variação no conteúdo nuclear. Nesse sentido, as alterações nucleares mais comuns em hepatócitos são a poliploidia, aumento no número de cópias do conjunto de cromossomos em uma célula, e a aneuploidia, definida como o ganho ou perda de cromossomos individuais (Duncan, 2013).

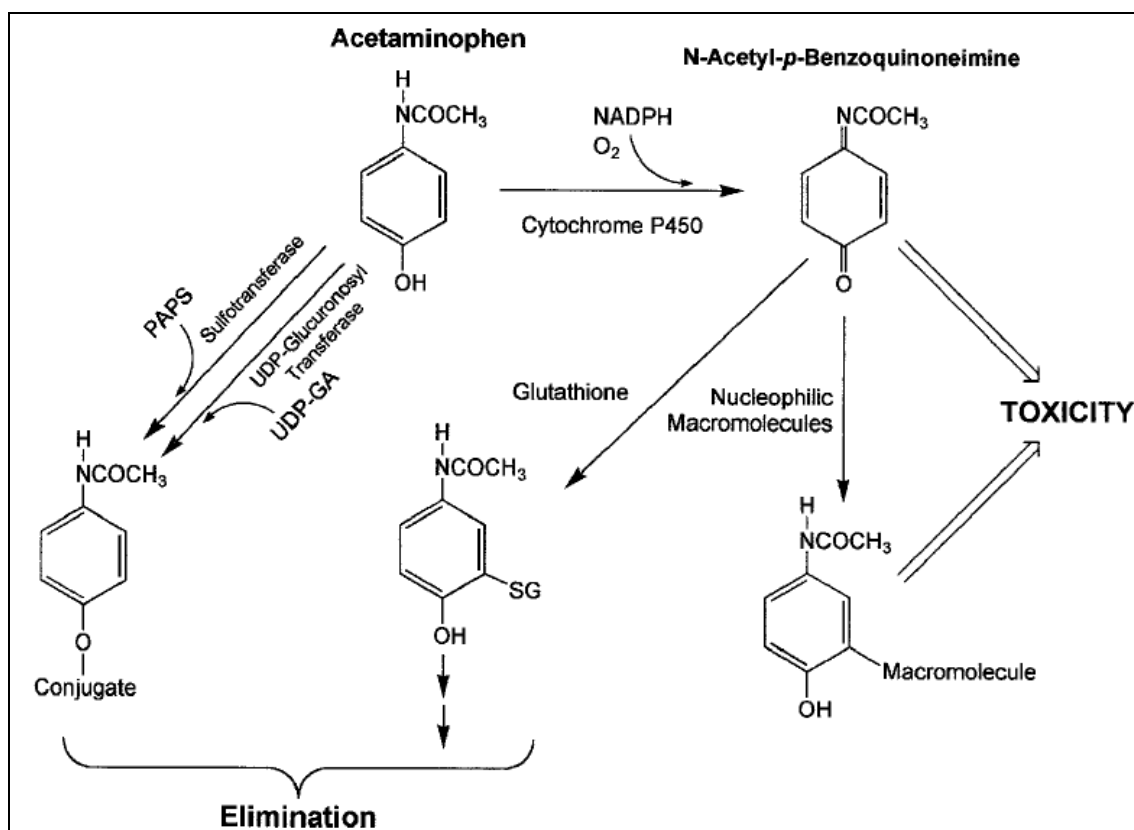
1.2. LESÃO HEPÁTICA AGUDA CAUSADA POR MEDICAMENTO

Dada a relevância do fígado e de seus componentes celulares, é de se imaginar que as patologias que acometem o órgão sejam de grande importância médica e frequentemente coloquem as vidas dos indivíduos em risco. A etiologia das doenças hepáticas é bastante variada, podendo ser de origem infecciosa (hepatites virais), metabólica (Doença de Wilson), provocada pela ingestão de drogas (Álcool e paracetamol) etc. Embora o fígado apresente grande capacidade regenerativa, lesões agudas muito intensas comprometem o funcionamento do órgão, podendo inclusive levar à falência hepática aguda (FHA) (Bernal, Auzinger, Dhawan, & Wendon, 2010).

A intoxicação por paracetamol (em inglês, acetaminophen ou APAP) é a principal causa de FHA nos Estados Unidos e Europa, chegando a ser responsável por aproximadamente 50% dos casos de FHA e com taxas de mortalidade chegando a 30% (Lee, 2007). No geral, o uso terapêutico do APAP é seguro, entretanto o abuso de medicamento (10-15g pro adulto e 150mg/Kg para crianças) torna-se tóxico para o fígado (Chun, Tong, Busuttil, & Hiatt, 2009). A lesão hepática por APAP pode ser dividida em duas fases: a primeira, onde o medicamento é metabolizado pelo hepatócito e causa a toxicidade, e a segunda, pela ação o sistema imune frente os produtos liberados pela necrose de hepatócitos. Durante a lesão tóxica, o hepatócito sofre estresse metabólico e acaba perdendo a capacidade de fazer o controle osmótico da célula, que em última análise causa o rompimento da membrana plasmática e subsequente liberação do conteúdo celular (Liu, Govindarajan, & Kaplowitz, 2004; Liu, Han, Gunawan, & Kaplowitz, 2006).

Inicialmente, o APAP é absorvido no intestino em até duas horas após a ingestão e segue para o fígado. Lá, aproximadamente 90% é metabolizado através das enzimas glicuronil transferases e sulfotransferases, sendo em seguida excretado na urina. Apenas uma pequena fração, em torno de 5-10%, é metabolizada no hepatócito pelo citocromo p450 transformado em N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI). O NAPQI é reduzido pelo antioxidante glutathione (GSH) e é excretada logo em seguida (**Figura A**). O Problema surge quando doses tóxicas de APAP são ingeridas e as quantidades de NAPQI que são formadas superam se tornam superiores à capacidade antioxidante da célula, o que leva à depleção de GSH e consequente oxidação de biomoléculas, proteínas mitocondriais e membranas (Larsen & Wendon, 2014). Dentre as principais alterações vistas nas células, destaca-se aumento no volume mitocondrial e fragmentação do DNA (Chun et al., 2009; James, Mayeux, & Hinson, 2003; Larsen & Wendon, 2014).

Figura A.



Metabolismo do APAP e formação do NAPQI nos hepatócitos.

Possíveis vias de metabolização do APAP: glicuronil transferases, sulfotransferases e citocromo p450. Em casos de overdose, os níveis de NAPQI excedem a capacidade antioxidante de GSH e o resultado é a oxidação das macromoléculas. Adaptado de (James et al., 2003).

A disfunção mitocondrial e o aumento de permeabilidade de membrana e culminam na necrose oncótica do hepatócito e subsequente liberação do conteúdo intracelular para o meio externo. A partir desse momento inicia-se a segunda fase da lesão hepática que será mediada pelo sistema imune. As moléculas liberadas durante a necrose são chamadas de Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês, Danger-associated molecular patterns, DAMPs) e podem ser consideradas mediadores inflamatórios, pois desencadeiam uma resposta robusta do sistema imune. Dentre os diversos DAMPs liberados durante a lesão hepática induzida por droga (DILI), destaca-

se o DNA (Ju, 2012; Marques et al., 2012; Marques et al., 2015b; Martin-Murphy, Holt, & Ju, 2010).

Um estudo recente do nosso grupo mostrou que ocorre uma massiva deposição intravascular de DNA durante a lesão hepática aguda induzida por paracetamol, que até então nunca havia sido descrita. Além disso, hepatócitos primários cultivados na presença de APAP apresentaram intenso trânsito de vesícula contendo material genético, que também foram encontrados no sobrenadante (Marques et al., 2015b). Essas descobertas trouxeram à luz novos insights sobre DILI e abriram o leque de possibilidades de estratégias terapêuticas.

1.3. SENSORES DE DNA CITOPLASMÁTICOS

Os sensores citoplasmáticos de DNA permitem aos diferentes tipos celulares detectarem a presença de uma miríade de patógenos intracelulares, uma vez que muitos usam DNA como carreador de sua informação genética, mas também introduzem um grande risco de reconhecimento do DNA próprio e o consequente desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias (Dempsey & Bowie, 2015; Paludan & Bowie, 2013) As vias ativadas pelos sensores de DNA podem ser didaticamente divididas em três grupos: o primeiro, é formado pelos receptores semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-like receptors*; TLR) dos quais o único representante é o TLR9. O TLR9 é geralmente encontrado nos compartimentos endossomais e sinaliza pela via myeloid differentiation primary response protein 88 (MYD88) e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon do tipo I (IFN I). Eles são expressos principalmente em células Dendríticas plasmocitóides (pDCs) e linfócitos B (Pelka, Shibata, Miyake, & Latz, 2016). Já o segundo grupo, descoberto

recentemente, inclui receptores responsáveis pelo reconhecimento de DNA no citoplasma que se acredita estarem presentes em praticamente qualquer tipo celular. Eles possuem em comum a via de sinalização pelo adaptador central STING. Fazem parte desse segundo grupo, os receptores GMP-AMP cíclico sintase (cGAS), Z-DNA binding protein 1 (ZBP1 ou DAI), Interferon-Inducible Protein (IFI16), DEAD-Box Helicase 41 (DDX41) e DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK). As respostas ativadas por essa via incluem a produção de (IFN I) e citocinas pró-inflamatórias (Wu & Chen, 2014). O terceiro grupo é representado pela proteína AIM2, que ao se associar à molécula de DNA tem a capacidade de formar complexos chamados de inflamassoma e induzir a liberação de IL-1 β e IL-18 (Szabo & Petrasek, 2015). Dentre os sensores citosólicos de DNA supracitados, apenas o TLR9, o AIM2 e o eixo cGAS/STING, por serem expressos quase que ubiquamente pelas células, possuem um conjunto robusto de dados na literatura sobre seus papéis no combate a infecções e envolvimento nas patogêneses de variadas doenças. Até o presente momento, o DAI se mostrou funcional apenas em fibroblastos, o que sugere que esse sensor de DNA é exclusivo desse tipo de celular. Além disso, ainda não ficou claro o papel do DAI in vivo, uma vez que os estudos foram feitos apenas com cultura de células (Takaoka et al., 2007; Unterholzner et al., 2010; Wang et al., 2008). Nessa mesma linha, originalmente O DNA-PK é conhecido pela sua habilidade de reparar regiões de ruptura no DNA nuclear, entretanto alguns trabalhos recentes mostraram que ele pode ter a função de DNA sensor em fibroblastos e que a sua deleção leva a uma diminuição na produção de IFN I mediante infecção por vírus (Ferguson, Mansur, Peters, Ren, & Smith, 2012; Peters et al., 2013). O IFI16 (o ortólogo em camundongos

chama-se p204), por sua vez, está envolvido no combate a infecções virais e parece ter desenvolvido um mecanismo para diferenciar o DNA próprio do não próprio, pois muitas vezes atua dentro do núcleo das células (Stratmann, Morrone, van Oijen, & Sohn, 2015; Unterholzner et al., 2010; Zhao et al., 2015) DDX41 está diretamente envolvido em diversas funções na célula, como metabolismo de RNA e crescimento celular, porém também já foi descrito como sensor de DNA presente em células dendríticas mieloides sinalizando diretamente via STING. Todavia, ainda não está claro na literatura o funcionamento do DDX41 como sensor e nem como ele atua no reconhecimento do DNA (Jiang, Zhu, Liu, & Ouyang, 2017; Zhang et al., 2011).

1.4. STING

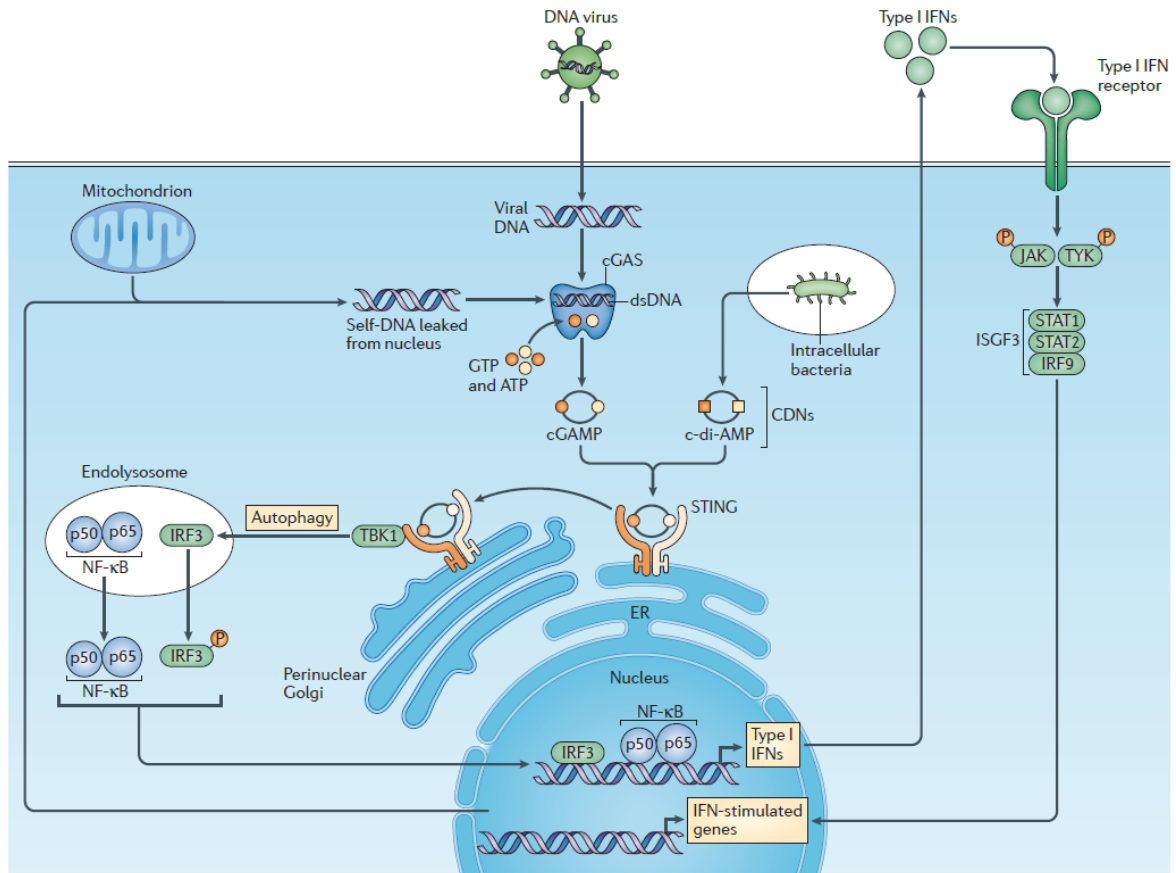
STING (do inglês, *Stimulator of Interferon Genes*) é uma proteína transmembranar encontrada associada ao retículo endoplasmático que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e Interferon tipo I (IFN I) na presença de DNA citosólico, seja ele próprio ou derivado de patógenos (Ishikawa & Barber, 2008; Ishikawa, Ma, & Barber, 2009) . Essa proteína contém 379 aminoácidos e é expressa em células de diversas linhagens, como epiteliais e hematopoiéticas. A ativação de STING na célula acontece devido à invasão de vírus ou alguns tipos de bactérias ou após transfecção de DNA. Homólogos da proteína STING são encontrados desde organismos primitivos, como plantas, fungos, cnidários e insetos, entretanto ainda não se sabe se ela exerce a mesma função de combate a patógenos, como acontece nos vertebrados (Barber, 2015).

Ainda que a sinalização por STING possa acontecer pela associação direta com o DNA (Abe et al., 2013), a via mais comum é através da ligação com

dinucleotídeos cíclicos (CDNs). Assim, O DNA citosólico se liga a uma enzima citosólica chamada GMP-AMP cíclico sintase (cGAS) que, na presença de ATP e GTP, irá sintetizar um dinucleotídeo chamado de cGAMP. Dessa forma, o cGAS age de forma sinérgica com STING, de maneira que um reconhece o DNA citoplasmático e sintetiza moléculas que ativam o outro. O cGAS é o sensor de DNA, enquanto que o STING é o sensor de dinucleotídeos cíclicos (Burdette et al., 2011). Já foi mostrado que o silenciamento de cGAS diminui drasticamente a produção de IFN I após transfecção de DNA, mostrando o papel de sensor de DNA exercido por essa enzima. No mesmo estudo, foi mostrado que o silenciamento de STING também reduz a produção de IFN I, mostrando que o eixo cGAS/STING constitui uma única via (Sun, Wu, Du, Chen, & Chen, 2013).

Um dinucleotídeo cíclico interage com duas moléculas de STING, formando um complexo que é deslocado do retículo endoplasmático e é realocado nas regiões perinucleares do aparelho de golgi, onde liga-se à proteína TBK1 (Tank-Binding Kinase 1). Em seguida, o complexo STING/TBK1 é endereçado ao compartimento endolisossomal e lá promove a fosforilação de dois fatores e transcrição: o Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) e o Nuclear Factor kB (NF-kB). Por sua vez, esses fatores de transcrição se deslocam para o núcleo e dão início à transcrição de IFN I e citocinas pró-inflamatórias. Depois disso, o complexo STING/TBK1 é rapidamente degradado no endolisossomo (Saitoh et al., 2009) (**Figura B**).

Figura B.



Processo de sinalização da via cGAS/STING. Retirado de (Barber, 2015).

A ativação de STING está associada à invasão de patógenos intracelulares. Vírus de DNA, como adenovírus (Lam, Stein, & Falck-Pedersen, 2014), retrovírus, como HIV (Gao et al., 2013) e bactérias, como a *L. monocytogenes* (Woodward, Iavarone, & Portnoy, 2010). Entretanto, o eixo cGAS/STING pode também ser ativado na ausência de patógenos, como no caso de doenças autoimunes e câncer. Doenças como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, nas quais o indivíduo apresenta altos níveis de anticorpos antinucleares e nucleossomas circulantes, são exemplos em que patogênese é derivada da ativação inapropriada do STING nas células do sistema imune e

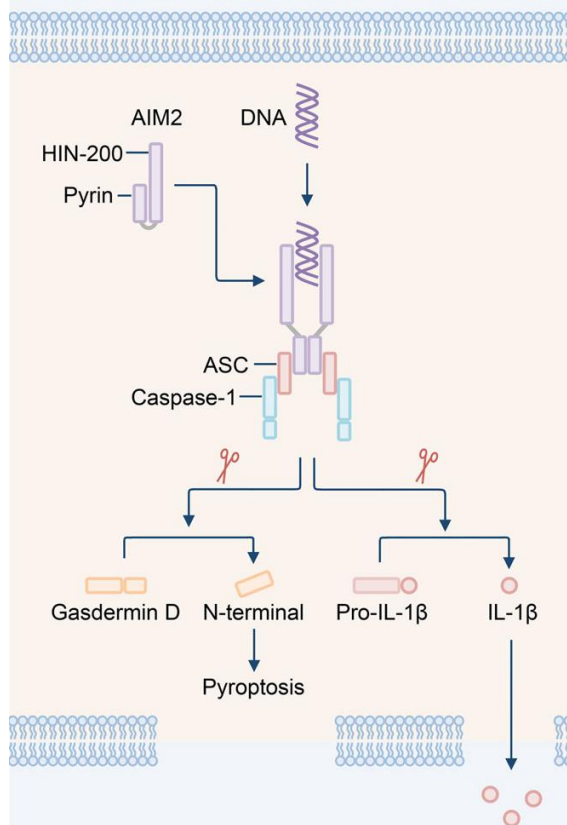
consequente aumento dos níveis de citocinas no sangue (Janko et al., 2008; Nagata & Kawane, 2011). No trabalho de (Ahn et al., 2014), foi utilizado animais *Tmem173* KO (STING KO), que são resistentes ao modelo de câncer de pele induzido pela substância DMBA. Entretanto, eles passam a desenvolver o tumor quando recebem transplante de medula óssea de camundongos selvagens (WT). Nesse trabalho, os autores mostram que o tumor só consegue se desenvolver a partir do momento em que as células do sistema imune retomam a capacidade de sensing DNA e passam a produzir IFN I e citocinas pró-inflamatórias, logo eles concluem que a fagocitose dos queratinócitos que estão em processo de necrose ou apoptose é capaz de desencadear a produção de IFN I e citocinas pró-inflamatórias mediadas por STING nas células do sistema imune. Outros estudos também já mostraram a relação entre fagocitose e ativação de STING. Células dendríticas podem produzir IFN I via STING após a fagocitose de células tumorais e assim melhorar a resposta antitumoral pelas células T (Woo et al., 2014). Macrófagos de Animais DNase II $-/-$ são incapazes de digerir o DNA de células fagocitadas, o que leva a uma robusta produção de IFN I e morte antes mesmo do nascimento. A depleção do gene que codifica o receptor de interferon tipo I (IFNAR) reverte o genótipo letal e permite que o animal se desenvolva até a fase adulta (Ahn, Gutman, Saijo, & Barber, 2012).

1.5. AIM2

AIM2 (Absent In Melanoma 2) é um sensor de DNA citosólico que é ativado por moléculas de DNA de qualquer origem. Essa proteína contém um domínio C-terminal HIN-200 que se liga ao DNA e outro domínio N-terminal Pyrin que se liga a uma proteína citoplasmática chamada de ASC (Apoptosis-associated

Speck-like protein containing a Caspase activation and recruitment domain) (Hornung et al., 2009). Após associar-se à ASC, o complexo cliva a caspase1, que por sua vez inicia a maturação das citocinas pró-inflamatórias pró- IL-1 β em IL-1 β e pró-IL-18 em IL-18. O AIM2 pode ainda se oligomerizar no citoplasma e formar um complexo chamado de *Inflamassoma* (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri, Yu, Datta, Wu, & Alnemri, 2009). Esse fenômeno é facilmente observável em macrófagos e células dendríticas (Belhocine & Monack, 2012). A ativação desse complexo se associa à outra proteína diferente da caspase1, chamada gasdermina, que é clivada e seus fragmentos formam poros na membrana plasmática. Esse processo pode resultar em um tipo de morte celular chamado de piroptose (He et al., 2015) (**Figura C**). A piroptose é um processo altamente controlado na célula e pode ser evitada pela degradação do inflamassoma por autofagia (Shi et al., 2012).

Figura C.



Bases moleculares para a ativação do AIM2 inflamassoma. Retirado de (Man, Karki, & Kanneganti, 2016)

O AIM2 é muito importante no combate a diversos patógenos intracelulares, entretanto vale a pena destacar aqui um mecanismo sinérgico entre AIM2 e o eixo cGAS/STING no combate à bactéria *Francisella novicida* e *Francisella tularensis* LVS: essas duas espécies são conhecidas por escapar do vacúolo tanto em macrófagos, quanto em células dendríticas. Ao escapar, elas são percebidas por STING e a transcrição de IFN I é prontamente iniciada. Uma vez liberado, o IFN I estimula de maneira autócrina a própria célula e induz produção de proteínas que vão fazer a lise intracelular de bactérias, o que leva à liberação de DNA no citosol e a uma potente ativação do inflamassoma (Belhocine & Monack, 2012; Jones et al., 2010). Assim como o eixo cGAS/STING, o AIM2 tem papel fundamental no reconhecimento de DNA viral. Um estudo comparativo entre pacientes com hepatite B em diferentes fases mostrou uma correlação entre os pacientes que se encontravam na fase aguda da doença e altos níveis de expressão de AIM2 nos leucócitos do sangue periférico (Wu et al., 2013). Outro estudo com pacientes comparou a expressão de AIM2 em biópsias de fígado de pacientes com hepatite B (HBV) e C (HCV) e observou que a expressão estava significativamente aumentada nos pacientes com HBV (~90%) em comparação com pacientes com HCV (~9%), o que pode estar associado com o perfil pró-inflamatório observado em pacientes com HBV (Han et al., 2015).

O AIM2 também desempenha um papel importante na Em casos de lesão estéril por liberação de DNA no citosol ou incapacidade de degradação após fagocitose. Estudos feitos em pacientes com Lupus Sistêmico Eritematoso (SLE) mostraram aumento de expressão de AIM2 em macrófagos de pacientes

do sexo masculino, o que pode estar relacionado com a patogênese e gravidade da doença associadas ao sexo (Yang, Huang, & Chiang, 2015). Outro estudo mostrou que pacientes com Psoríase apresentam altos níveis de expressão de AIM2 nos queratinócitos e que isso se deve à presença de DNA citosólico (Dombrowski et al., 2011). No mesmo caso descrito no item anterior sobre os animais DNase II^{-/-} IFNAR^{-/-} mostrou como o genótipo reverteu a mortalidade, entretanto todos os animais acabam apresentando poliartrite na idade adulta, uma vez que a incapacidade de digerir o DNA permanece e isso continua gerando efeitos colaterais, como produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células para as articulações. Em um trabalho muito interessante, o genótipo DNase II^{-/-} IFNAR^{-/-} AIM2^{-/-} conseguiu prevenir não só o desenvolvimento de poliartrite e o infiltrado inflamatório, como também a ativação do inflamassoma e a consquente produção de citocinas pró-inflamatórias. O mesmo perfil foi encontrado em animais DNase II^{-/-} IFNAR^{-/-} STING^{-/-} também utilizados nesse trabalho (Baum et al., 2015). É importante notar que AIM2 e STING estão muitas vezes envolvidos na patogênese das mesmas doenças, tendo em vista a similaridade de funções.

1.6. TLR9

A primeira proteína descrita como sensor de DNA citoplasmático foi o Receptor do tipo toll 9 (TLR9) (Hemmi et al., 2000). O TLR9 consegue reconhecer motivos CpG não metilados em DNA de dupla fita, padrão que normalmente é encontrado em bactérias, uma vez que o DNA dos vertebrados possui poucos motivos CpG e estes geralmente são metilados (Krieg, 2002). O TLR9 é o único dos sensores de DNA que não é encontrado livre no citoplasma

sendo normalmente localizado nos endossomos, entretanto já foi descrita a presença de TLR9 na membrana plasmática de pDCs, linfócitos B e neutrófilos. Ele é preferencialmente expresso por pDCs, mas também é encontrado em muitas células da linhagem mieloide e de outros tecidos. A ativação da via de TLR9 culmina na fosforilação dos fatores de transcrição Fator Regulador de Interferon 7 (IRF7) e Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e na produção de Interferon do tipo I (IFN I) e citocinas pró-inflamatórias (O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013).

A sinalização por TLR9 tem papel na patogênese de doenças que desenvolvem anticorpos contra o próprio DNA, como é o caso de algumas formas de Lupus Sistêmico Eritematoso (Decker, Singh-Jasuja, Haager, Kotter, & Rammensee, 2005). De forma curiosa, animais triplo KO DNase1^{-/-}-IFNAR^{-/-}-TLR9^{-/-} não apresentaram nenhuma melhora no quadro de poliartrite, entretanto não foi possível identificar a presença anticorpos contra o próprio DNA nesses animais (Baum et al., 2015).

1.7. DNA SENSING NO FÍGADO

Apesar dos recentes avanços no entendimento dos sensores citosólicos de DNA, existem poucos estudos investigando as vias de DNA sensing nas células hepáticas em contexto estéril. A maioria dos estudos investiga a importância das vias nas infecções virais. No estudo (Thomsen et al., 2016) foi mostrado que os hepatócitos de camundongos e de humanos não expressam STING. Além disso, estas células falharam em produzir IFN I mediante infecção por vírus da hepatite B (HBV) e transfeção de DNA. Ainda, que o controle do HBV só foi possível após a restituição do STING nos hepatócitos através de um vetor viral. Um estudo *in vitro* que utilizou uma co-cultura de hepatócitos e

macrófagos mostrou que a replicação de HBV é atenuada quando os macrófagos são tratados com DMXAA, uma droga que ativa STING, e passam a produzir grandes quantidades de IFN I (Guo et al., 2015). Um estudo muito interessante mostrou a influência do IFN I no agravamento da lesão hepática após infecção viral e que o bloqueio da sinalização de IFN diminui drasticamente a morte de hepatócitos. O vírus utilizado no estudo (vírus da coriomeningite linfocítica, LCMV) diminui a expressão de Superóxido Desmutase 1 (SOD1) e o hepatócito morre por estresse oxidativo. Apesar de não avaliar vias de sensing de DNA, o estudo mostra claramente que a produção de IFN I é derivada de células da linhagem hematopoiética e que a depleção de células de kupffer por lipossomos de clodronato diminui drasticamente a produção de IFN I e níveis de ALT (Bhattacharya et al., 2015).

No que diz respeito à lesão hepática estéril, dois trabalhos mostraram a importância do TLR9 na lesão hepática aguda por APAP (Imaeda et al., 2009; Marques et al., 2015b). Ambos os estudos utilizaram animais TLR9 $-/-$ e constataram uma diminuição significativa da lesão. Entretanto, no trabalho mais recente de Marques e colaboradores ficou claro que os animais TLR9 $-/-$ apresentam neutrófilos incapazes de chegar às regiões de necrose, uma vez que o TLR9 encontra-se localizado na membrana plasmática dessas células e serve para guiá-las até locais de necrose. Além disso, neutrófilos de animais WT que foram incubados com DNA isolado do fígado foram incapazes de expressar IFN I. Outro ponto importante é que nesse mesmo trabalho foi mostrado que a DNase exibiu um efeito hepatoprotetor e diminuiu significativamente os níveis de ALT.

Levando-se em consideração que os hepatócitos estão expostos ao DNA próprio no citoplasma e ainda estão inseridos em um contexto pró-inflamatório onde há uma massiva deposição de DNA extravascular, esse estudo busca compreender o papel das vias de sensing citosólico de DNA durante a lesão hepática aguda por APAP. Esse quadro se torna ainda mais complexo quando levamos em consideração que tipos celulares diferentes, como células de Kupffer, neutrófilos e células dendríticas estão em contato com a mesma molécula e podem apresentar respostas distintas. Portanto, esse estudo é importante para entendermos, não somente o funcionamento básico do fígado, mas também como esse órgão procura se adaptar às mais diversas condições nas quais é exposto ao longo da vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar as vias de sensores de DNA no fígado e a participação destas, tanto na homeostase quanto, na lesão hepática aguda.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a expressão de sensores de DNA nas células hepáticas em condições fisiológicas;
- b) Avaliar a expressão de sensores de DNA nas células hepáticas em diferentes tempos durante lesão hepática;
- c) Verificar a expressão e produção de citocinas reguladas pelas vias de sensores de DNA nas células hepáticas;

d) Comparar a lesão hepática entre animais selvagens (WT) e *knockouts* para diferentes genes envolvidos no *sensing* de DNA citoplasmático;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, 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). Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas da Comissão de Ética de Uso Animal da UFMG (CEUA 377/2016).

3.2. MODELO DE LESÃO HEPÁTICA

Os camundongos foram submetidos ao jejum de 15 horas e então tratados por via oral (gavagem) com APAP dissolvido em salina estéril aquecida (600 mg/kg). Os 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. DOSAGEM DE ALT

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*.

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; Marques et al., 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 Velocity (PerkinElmer).

3.6. ISOLAMENTO DE HEPATÓCITOS PRIMÁRIOS

Com o objetivo de avaliar o perfil transcricional dos hepatócitos frente ao desafio com paracetamol, animais foram tratados com paracetamol e hepatócitos primários foram isolados em tempos diferentes após o tratamento. Como controle, isolamos hepatócitos de animais tratados apenas com o veículo (salina).

Inicialmente, os 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. Um cateter 16G foi introduzido na porção inferior da veia cava e a 50 ml da solução-tampão Hanks A foi bombeada por uma bomba de perfusão para o interior do fígado a fim de limpar o sangue do interior dos vasos. Imediatamente após o início da perfusão, a veia cava inferior foi seccionada para que a solução pudesse sair do corpo do animal após passar pelo fígado. Após o término dos 50 ml de Hanks A, 25 ml da solução-tampão Hanks B, contendo Colagenase tipo VIII (800 mg/L; Sigma-Aldrich), foi bombeada para o interior do órgão. 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 µM e levada para centrifugação a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi resuspendido em 50 mL de meio Williams e levado novamente para centrifugação a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pellet de hepatócitos resuspendido em 10 ml e, por fim, levado

para a contagem na câmara de Neubauer. A viabilidade das células foi avaliada usando o método de exclusão de azul de trypan.

3.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS HEPÁTICAS

Para a obtenção de células não-parenquimais hepáticas, os camundongos foram anestesiados e os fígados removidos, cortados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo contendo meio RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino e colagenase tipo VIII (1 mg/mL; Sigma-Aldrich). Para que a colagenase pudesse agir na sua máxima eficiência, toda a mistura foi mantida sob agitação constante, a 37°C, por uma hora. Após o término, a suspensão foi centrifugada a 300 x g, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* de células foi resuspendido em uma solução de PBS 1x contendo EDTA 2mM e BSA 0,5% e novamente levado para a centrifugação a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. Dessa vez, o sobrenadante resultante foi coletado e levado para mais uma etapa de centrifugação a 60 x g, 4°C, por 3 minutos. Novamente, o sobredanante resultante foi coletado e filtrado em *cell strainer* de 70 µm (Becton-Dickinson). Em seguida, o filtrado foi levado para uma nova centrifugação a 300 x g, 4°C, por 5 minutos e o pellet resultante foi tratado com uma solução de ACK 1x (Cloreto de amônio 150mM, Bicarbonato de potássio 10mM e EDTA dissódico 1mM) para fazer a lise das hemácias. Por fim, a viabilidade das células foi checada usando azul de trypan. Nesse isolado de células foram então empregadas, isoladamente, as técnicas de Citometria de fluxo e qPCR.

3.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

3.8.1. EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA foi extraído de diferentes tipos de amostra e utilizado para avaliação por PCR em tempo real (qPCR). Para fazer a extração no fígado, nós utilizamos aproximadamente 50 mg de tecido, enquanto que, para os hepatócitos, foi utilizado 02×10^6 células. No caso das não parenquimais, o mínimo aceitável para a extração foi de 01×10^5 células.

A extração de RNA foi realizada segundo o protocolo descrito pelo Aurum Total™ RNA Fatty and Fibrous Kit (BioRad). Ao final da extração, concentração de RNA foi determinada no espectrofotômetro (Nano Drop® ND-1000, EUA) a 260 e 280 nm. As amostras foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.8.2. SÍNTESE DE CDNA

Para síntese do cDNA, utilizamos o kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad) seguindo o protocolo do fabricante. Para hepatócitos e células não-parenquimais, foi utilizado 0,2µg de RNA para a síntese de cDNA. Brevemente, a reação foi submetida a etapas de aquecimento e resfriamento na seguinte ordem: 5 minutos a 25°C , 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C . O cDNA produzido foi armazenado à temperatura de -20°C .

3.8.3. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

3.8.3.1. 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*, *Actb*, *Hprt* e *Sdha*), o *Gapdh* mostrou-se o melhor normalizador, tanto para os genes avaliados nas amostras de fígado total, hepatócitos e células não-parenquimais. O teste para escolha do normalizador foi feito no programa NormFinder (Andersen, Jensen, & Orntoft, 2004).

3.8.3.2. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se 5µL de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad), 2µL de H₂O para PCR, 1µL de cada iniciador (5µM) e 1µL de cDNA. O volume final em cada poço foi de 10µL. O protocolo foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, o passo inicial foi de 30 segundos a 98°C para a ativação da enzima, seguido de 15 segundos a 95°C para desnaturação e, então, 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. Essas etapas foram repetidas por 40 ciclos e, ao fim destes, a curva de melting foi obtida. Em cada placa havia um controle negativo, constituído por 5 µL de SYBR Green SuperMix, 3µl de H₂O e 5µM de cada iniciador.

As sequências dos iniciadores para os genes relacionados foram:

Genes	Iniciadores	Sequência
Gapdh	Foward	5'AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 3'
	Reverse	5'TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'
Rpl4	Foward	5'CCGTCCCCTCATATCGGTGTA 3'
	Reverse	5'GCATAGGGCTGTCTGTTGTTTTT 3'

18s	Foward	5'CGTTCCACCAACTAAGAACG 3'
	Reverse	5'CTCAACACGGGAAACCTCAC 3'
Mb21d1 (cGAS)	Foward	5'GAGGCGCGGAAAGTCGTAA 3'
	Reverse	5'TTGTCCGGTTCCTTCCTGGA 3'
Tmem173 (STING)	Foward	5'GGTCACCGCTCCAAATATGTAG 3'
	Reverse	5'CAGTAGTCCAAGTTCGTGCGA 3'
Aim2	Foward	5'GTCACCAGTTCCTCAGTTGTG 3'
	Reverse	5'CACCTCCATTGTCCCTGTTTTAT 3'
Ifna4	Foward	5'TGATGAGCTACTACTGGTCAGC 3'
	Reverse	5'GATCTCTTAGCACAAGGATGGC 3'
Ifnb1	Foward	5'TGAATGGAAAGATCAACCTCACCTA 3'
	Reverse	5'CTCTTCTGCATCTTCTCCGTCA 3'
Il1b	Foward	5'GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT 3'
	Reverse	5'ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT 3'
Cxcl10	Foward	5'CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC 3'
	Reverse	5'GGCTCGCAGGGATGATTTCAA 3'
Rsad2 (Viperin)	Foward	5'TGCTGGCTGAGAATAGCATTAGG 3'
	Reverse	5'GCTGAGTGCTGTTCCCATCT 3'
Isg15	Foward	5'GGTGTCCGTGACTAACTCCAT 3'
	Reverse	5'TGGAAAGGGTAAGACCGTCCT 3'
Usp18	Foward	5'TTGGGCTCCTGAGGAAACC 3'
	Reverse	5'CGATGTTGTGTAACCAACCAGA 3'
Irf7	Foward	5'GAGACTGGCTATTGGGGGAG 3'
	Reverse	5'GACCGAAATGCTTCCAGGG 3'
Sod1	Foward	5'AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC 3'

	Reverse	5'CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG 3'
--	---------	------------------------------

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 gene de referência de 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 calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram obtidos no Bio-Rad SFX Manager Software e analisados no Prism 6.0. 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

O heatmap foi feito no programa MeV (Chu, Gottardo, Raftery, Bumgarner, & Yeung, 2008).

3.9. CITOMETRIA DE FLUXO

As células não-parenquimais foram lavadas com uma solução de PBS 1x contendo EDTA 2mM e BSA 0,5% para bloquear ligações inespecíficas. As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 488nm e a emissão foi capturada num filtro específico pra YFP 540/20. Foram lidas 50.000 células de cada amostra no citômetro Accuri C6.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de normalidade para as amostras foi feito pelo teste Shapiro-Wilk. A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste t de Student. A comparação entre mais de dois grupos foi feita pelo teste One-way ANOVA e Múltiplos testes t . Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm), e são referentes a experimentos contendo no mínimo 04 animais. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$. Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism 6 (San Diego, California).

4. RESULTADOS

4.1. INDUÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA AGUDA ESTÉRIL E DEPOSIÇÃO DE DNA NO FÍGADO.

O nosso modelo de inflamação baseia-se na overdose de paracetamol (APAP), que causa lesão hepática aguda estéril nos camundongos por necrose oncótica dos hepatócitos. Para avaliar a lesão hepática nós utilizamos o ensaio de dosagem de alanina aminotransferase (ALT), como mostrado na **Figura 1a**, além da análise histológica para visualização das áreas de necrose através da coloração hematoxilina e eosina (HE) (**Figura 1b**). Neste modelo de lesão aguda nós observamos uma taxa de sobrevivência de, aproximadamente, 60% vinte e quatro horas após o tratamento com APAP (**figura 1c**).

Durante a lesão hepática por paracetamol observa-se um fenômeno de deposição de DNA no espaço intravascular tão cedo quanto 06 horas após a administração de APAP (**figura 1d**) e este fenômeno se prolonga por, pelo menos, 24 horas após o tratamento com a droga.

Figure 1

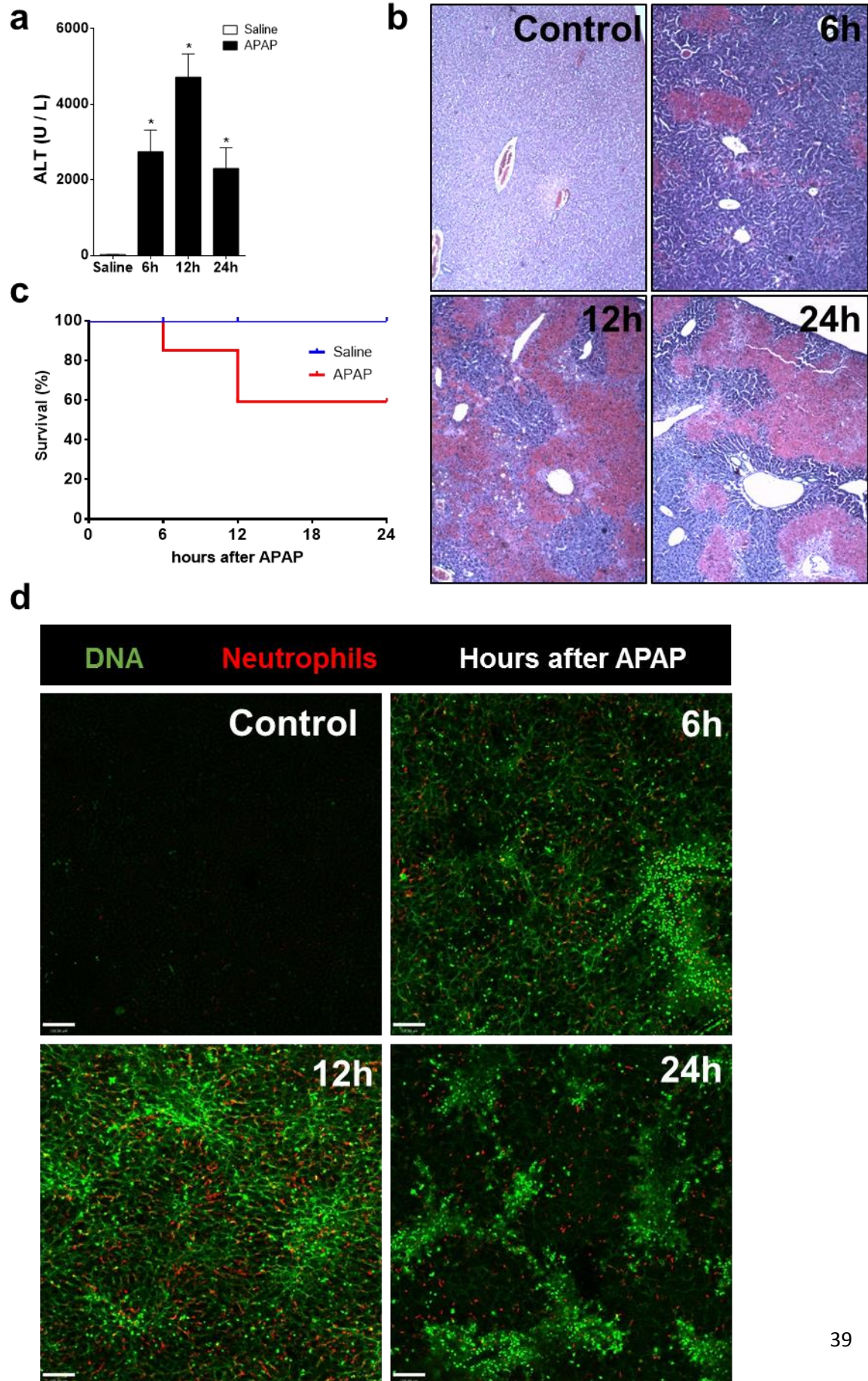


Figure 1 Deposição de DNA no fígado durante a lesão causada por APAP. **(a)** Dosagem de ALT para avaliar a lesão hepática nos pontos de 6, 12 e 24 horas após a administração de APAP. **(b)** Histologia do fígado nos diferentes tempos de lesão; coloração HE; aumento de 4x. **(c)** Curva de sobrevivência nos diferentes tempos após a lesão hepática. **(d)** Microscopia confocal intravital de fígado nos diferentes tempos após a lesão; verde: Sytox green; vermelho: Ly6G; escala = 300 μ m; aumento 10x. (Mean \pm SEM; n=4); *p \leq 0.05.

4.2. OS SENSORES DE DNA SÃO DIFERENTEMENTE EXPRESSOS NAS POPULAÇÕES HEPÁTICAS.

Durante a lesão hepática por APAP o DNA sem comporta como um DAMP e exerce um papel pró-inflamatório, uma vez que intensifica o influxo de neutrófilos para a lesão (Marques et al., 2015b). Entretanto, o ambiente hepático é bastante heterogêneo e para melhor compreender a contribuição do DNA para o agravamento da lesão, nós decidimos avaliar o envolvimento, não só das células imunes, mas também dos hepatócitos no curso da lesão, uma vez que estas células apresentam DNA aberrante no citoplasma quando tratadas com altas doses de APAP (Marques et al., 2015b).

A fim de entender como o fígado lida com esse excesso de DNA aberrante que aparece, tanto no ambiente extracelular, como no intracelular, nós decidimos separar as populações de células que compõem o fígado em dois grupos e avalia-las quanto à sua capacidade de responder à DNA (**Figura 2a**). O primeiro grupo foi composto exclusivamente de células parenquimais, ou seja, hepatócitos, que compõem ~80% da massa do órgão. O segundo grupo é composto de células não-parenquimais (NPC), em sua maioria células imunes residentes, como Kupffers, linfócitos, células NK, células dendríticas e, no caso de lesão, neutrófilos. Em seguida. Isolamos os dois grupos de células de animais saudáveis (n=4) e avaliamos a expressão gênica dos principais

sensores de DNA e das citocinas associadas à ativação dessas vias (**figura 2b e 2c**).

Quando comparamos os grupos em relação à expressão das vias de sensores de DNA em condições fisiológicas, observamos que as estão significativamente mais expressas nas NPCs do que nos hepatócitos (**figura 2b**) Com exceção do *aim2*, que é ~12 vezes mais expresso nas NPCs, todos os outros sensores estão ao menos 30 vezes mais expressos do que nos hepatócitos. Em contrapartida, os hepatócitos expressam naturalmente mais Interferon do tipo I, tanto o alpha quanto o beta, enquanto os níveis de *Il1b* não apresentaram diferenças significativas entre as duas populações (**figura 2c**). Dessa forma, concluímos que, em condições normais, as NPCs estão mais capacitadas para detectar o DNA do que os hepatócitos.

Figure 2

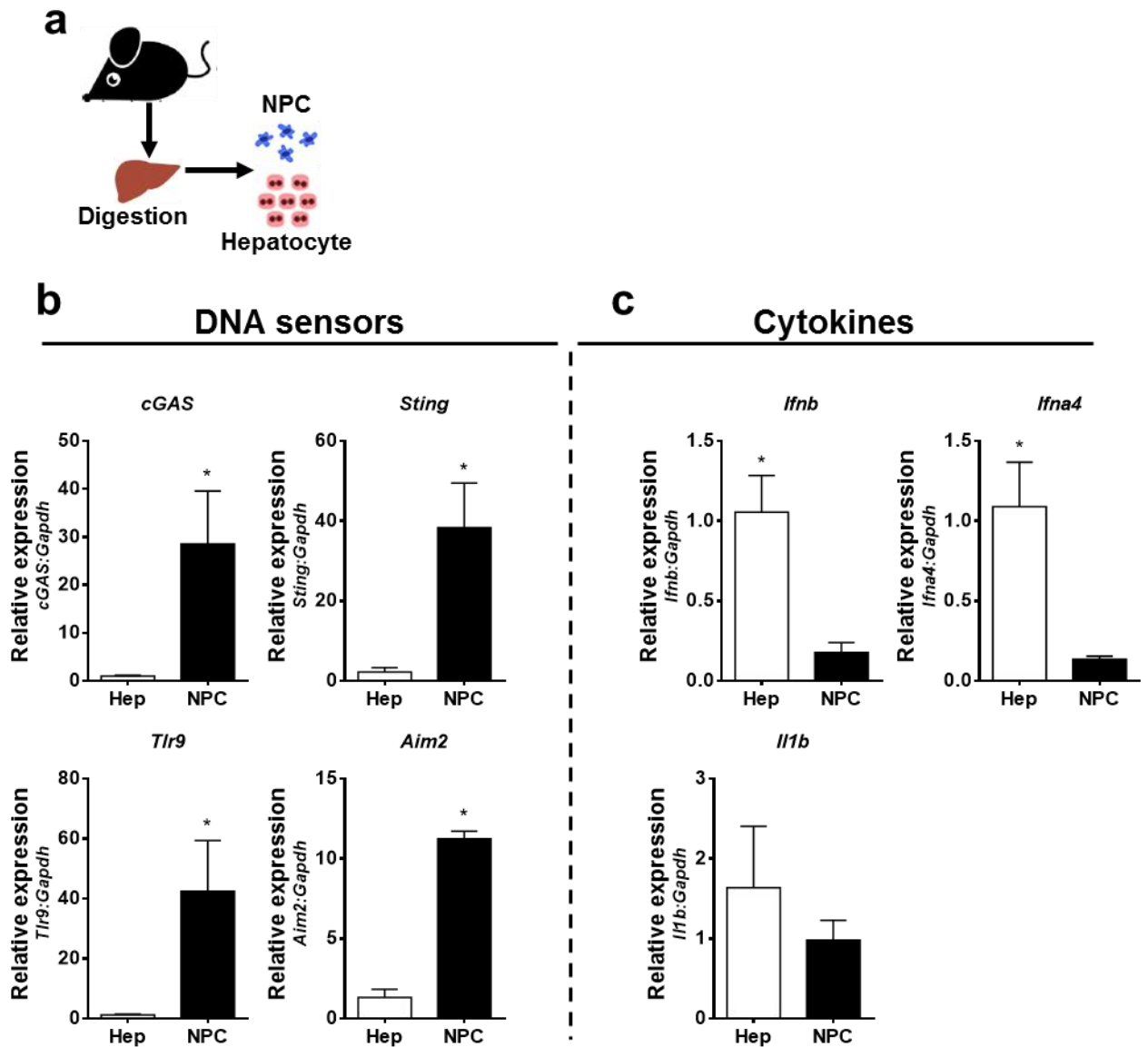


Figura 2 Avaliação da expressão de sensores de DNA em diferentes populações de células hepáticas. **(a)** Esquema mostrando isolamento de dois grupos de células hepáticas, parenquimais (hepatócitos) e não-parenquimais (NPCs), em animais saudáveis. **(b)** Comparação da expressão gênica de diferentes sensores de DNA e citocinas entre as duas populações; a expressão relativa foi feita utilizando o hepatócito como referência. (Mean \pm SEM; n=4); *p \leq 0.05 em comparação com os hepatócitos.

4.3. AS EXPRESSÕES DOS SENSORES DE DNA DIVERGEM NAS POPULAÇÕES HEPÁTICAS DURANTE A LESÃO ESTÉRIL.

Em seguida, Nós nos perguntamos como estavam as expressões dos sensores de DNA e das citocinas após a administração de APAP. Para isso nós tratamos os animais (n=4) com APAP e avaliamos a expressão gênica nas duas populações ao longo do tempo **(figura 3a)**.

Com exceção do *Sting* que teve a sua expressão significativamente aumentada no ponto de 12 horas após a administração de APAP, todos os sensores de DNA sofreram *downregulation* em todos os tempos avaliados **(figura 3b)**. As NPCs, por sua vez, apresentaram aumento na expressão gênica, com destaque para o ponto de 12 horas, em que os níveis dos sensores *Sting*, *Tlr9* e *Aim2* estavam significativamente aumentados em relação ao grupo controle (salina) **(figura 3b)**. O *cGas* foi o único que não apresentou aumento significativo, ainda que tenha mostrado um aumento de ~4 vezes 12 horas após a indução da lesão **(figura 3b)**.

A produção de citocinas associadas ao sensing de DNA acompanhou as variações que ocorreram em ambas populações. Nos hepatócitos, observamos uma diminuição quase que indetectável da expressão de IFN I alpha e beta, enquanto os níveis de Il1b aumentaram significativamente 12 horas após a administração de APAP **(figura 3c)**. Nas NPCs, todas as citocinas tiveram as suas expressões aumentadas significativamente 12 horas após o tratamento **(figura3c)**.

Com exceção do *Sting* e do *Il1b*, todos os outros genes avaliados sofreram *downregulation* nos hepatócitos, entretanto todos os genes avaliados estavam aumentados nas NPCs, sendo que o único que não apresentou aumento significativo no ponto de 12 horas foi o cGas. Esse panorama fica melhor evidenciado no *heatmap* comparando as variações das expressões ao longo do tempo entre NPCs e hepatócitos (**figura 3d**).

Ainda que exista a evidência do aumento das expressões gênicas, ainda é necessário confirmar a produção das citocinas, uma vez que a transcrição gênica pode não se confirmar em tradução.

Figure 3

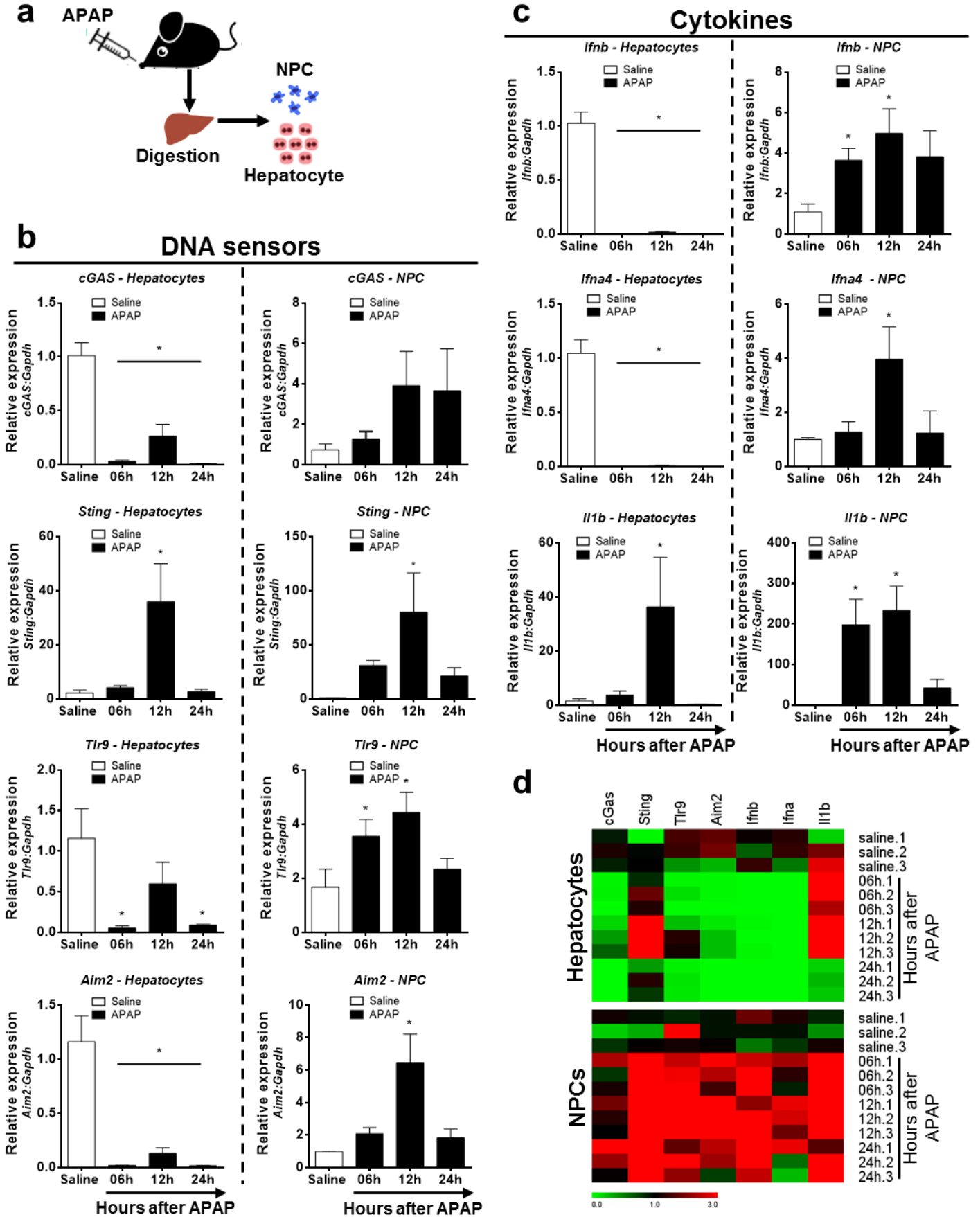


Figura 3 Avaliação da expressão de sensores de DNA em diferentes populações hepáticas durante a lesão por APAP. **(a)** Esquema mostrando isolamento de dois grupos de células hepáticas, parenquimais (hepatócitos) e não-parenquimais (NPCs), em animais tratados com APAP (600mg/kg). **(b)** e **(c)** Comparação da expressão gênica de diferentes sensores de DNA e citocinas nos dois grupos de células após a indução da lesão hepática; a expressão relativa foi feita utilizando a população controle (salina) de cada grupo como referência. **(d)** Heatmap mostrando as variações nas expressões gênicas em diferentes tempos após a indução da lesão hepática; verde = diminuição da expressão; preto = não houve variação; vermelho = aumento da expressão. (Mean±SEM; n=4); *p ≤ 0.05 em comparação com os hepatócitos.

4.4. AS CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS PRODUZEM IFN I DURANTE A LESÃO HEPÁTICA ESTÉRIL.

Para confirmar que está ocorrendo a produção de IFN I nós recorremos a duas estratégias diferentes: a primeira foi avaliar a produção por citometria e a segunda foi avaliar se a sinalização estaria ocorrendo no ambiente hepático após o tratamento com APAP.

Dessa forma, isolamos hepatócitos nos tempos de 6, 12 e 24 horas após a administração de APAP (**figura 4a**) (n=4) e avaliamos a expressão de *Cxcl10*, *Rsd2* (*Viperin*) e *Isg15*, genes sabidamente regulados por IFN I (**Figura 4b**). Todos os genes estavam significativamente aumentados nos hepatócitos 12 horas após o tratamento com APAP. O *Cxcl10* apresentou um aumento de ~50 vezes, enquanto o gene *Viperin* aumentou ~15 vezes e o *Isg15*, por sua vez, aumentou ~6 vezes (**figura 4b**). Além disso, como o ponto de 12 horas após a indução da lesão mostrou-se crítico, nós isolamos NPCs de animais *Ifnb*^{YFP/YFP} (n=4) para avaliar a produção de IFN-β por citometria (**figura 4c**). O animal *Ifnb*^{YFP/YFP} possui o mRNA bicistrônico, ou seja, uma única fita de mRNA é capaz de dar origem a duas proteínas distintas. Assim, o IFN-β produzido é

funcional e pode ser secretado, enquanto que a célula que produz fica marcada com a proteína YFP.

Como mostrado na **figura 4d**, existe uma produção basal de IFN- β pelas NPCs, contabilizando ~10% das células. Entretanto, a produção aumenta nos animais tratados com APAP, passando a apresentar ~15% das células produzindo IFN- β . Juntos, esses dados confirmam que há a produção e sinalização de IFN I durante a lesão aguda estéril causada por APAP.

Figure 4

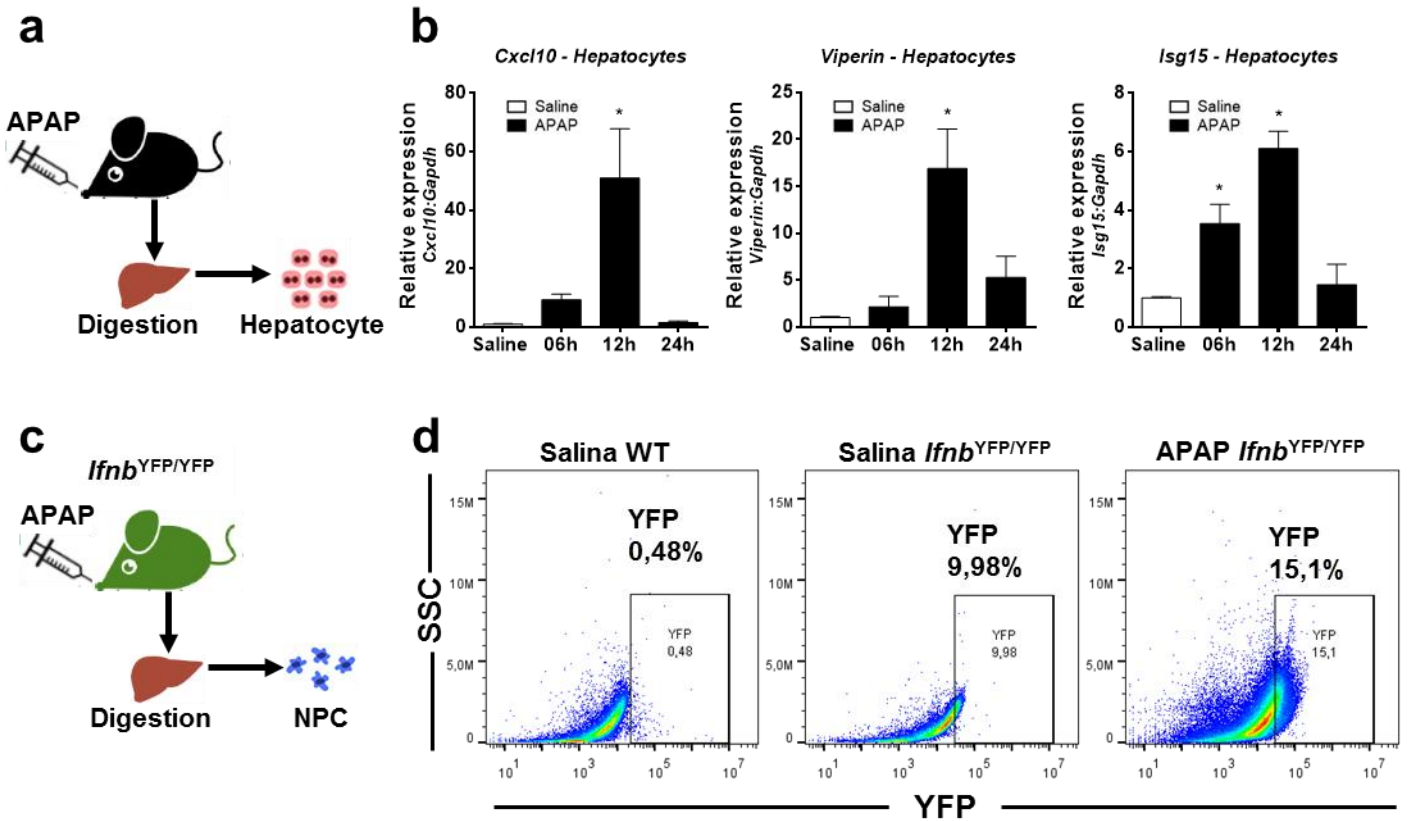


Figura 4 Produção de IFN I no fígado durante a lesão por APAP. **(a)** Esquema mostrando o isolamento das células parenquimais (hepatócitos) em animais tratados com APAP (600mg/kg). **(b)** Avaliação da expressão dos genes regulados por IFN I em hepatócitos após a indução da lesão hepática; a expressão relativa foi feita utilizando os hepatócitos controle (salina) como referência. **(c)** Esquema mostrando o isolamento das células não-parenquimais de animais *Ifnb^{YFP/YFP}* 12 horas após o tratamento com APAP (600mg/Kg). **(d)** Citometria para a avaliação da produção de IFN I por células não-parenquimais hepáticas. (Mean±SEM; n=4); *p ≤ 0.05 em comparação com os hepatócitos controle.

4.5. AS CÉLULAS NÃO-PARENQUIMAIS PRODUZEM IFN I NA LESÃO HEPÁTICA ESTÉRIL DEVIDO À PRESENÇA DE DNA INTRAVASCULAR.

Para saber se o aumento das expressões de sensores de DNA e a produção de IFN I estão associados com a presença de DNA intravascular, nós decidimos tratar os animais com injeção endovenosa de DNase (1000U/L) nos tempos de 06, 12 e 24 horas após a administração de APAP (**figura 5a**). Os animais foram tratados no ponto inicial de 06 horas para que a lesão pudesse acontecer antes do início da administração da DNase.

Uma vez que o tempo de 12 horas após APAP foi o ponto que apresentou os níveis mais significativos de expressão de sensores de DNA e de produção de IFN I, este também foi o ponto escolhido para a coleta das NPCs do grupo tratado com DNase (**figura 5a**). Nós observamos uma diminuição significativa dos níveis de expressão de todos os sensores de DNA quando comparados com o grupo controle (salina), com exceção do *cGas*, que também manteve os níveis baixos de expressão, porém sem significância estatística. Todos os genes retornaram aos níveis de expressão de animais saudáveis (**figura 5b**) (* significativo quando comparado com o grupo salina e # quando comparado com o grupo tratado com Dnase).

Os genes regulados por IFN I também apresentaram expressões reduzidas nos hepatócitos do grupo tratado com DNase. Os genes *Cxcl10*, *Viperin* e *Isg15* estavam significativamente menos expressos quando comparados com o grupo tratado somente com APAP (**figura 5c**). Os níveis de ALT também

estavam significativamente reduzidos no grupo tratado com Dnase, o que caracteriza menos hepatócitos morrendo por necrose (**figura 5d**).

As NPCs isoladas de animais *Ifnb*^{YFP/YFP} tratados com DNase produzem menos IFN- β 12 horas após a indução da lesão hepática e apresentam, aproximadamente, os mesmos níveis de animais controle (**figura 5e**). Juntos, estes dados mostram que o aumento das expressões de sensores de DNA, a produção de IFN I e a posterior sinalização nos hepatócitos estão diretamente associadas à presença do DNA intravascular na lesão hepática estéril.

Figure 5

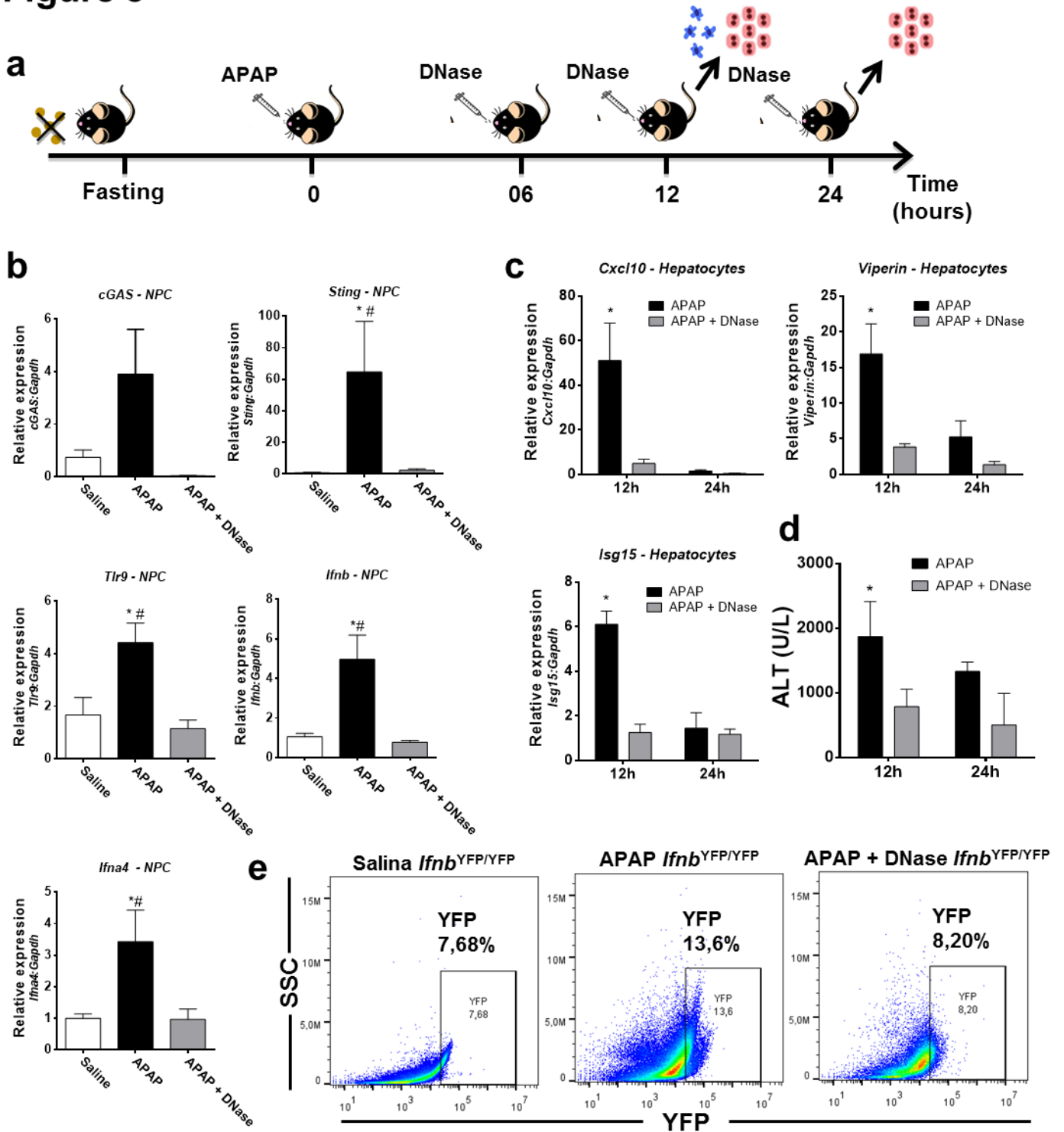


Figura 5 Tratamento com DNase após indução de lesão hepática. **(a)** Esquema mostrando os pontos de tratamento com APAP (600mg/kg) e DNase (1000U/L) nos animais ao longo do tempo. **(b)** Comparação da expressão gênica de diferentes sensores de DNA e citocinas nas células não-parenquimais hepáticas, entre os grupos tratados e não-tratados com DNase. As células foram coletadas 12 horas após a administração de APAP (600mg/kg) e a expressão relativa foi feita utilizando as NPCs controle (salina) como referência. **(c)** Avaliação da expressão dos genes regulados por IFN I em hepatócitos, nos grupos tratados e não-tratados com DNase. As células foram coletadas 12 e 24 horas após a administração de APAP (600mg/kg) e a expressão relativa foi feita utilizando os hepatócitos do grupo tratado somente com APAP como referência. **(d)** Dosagem de ALT para avaliar a lesão hepática nos pontos de 12 e 24 horas após o tratamento com DNase. **(e)** Citometria para a avaliação da produção de IFN I por células não-parenquimais hepáticas, nos grupos tratados e não-tratados com DNase. As células foram coletadas de animais *Irf1*^{YFP/YFP} 12 horas após a administração de APAP (600mg/kg). (Mean±SEM; n=4);* e # = p ≤ 0.05.

4.6. A PRODUÇÃO DE IFN I AGRAVA A LESÃO HEPÁTICA

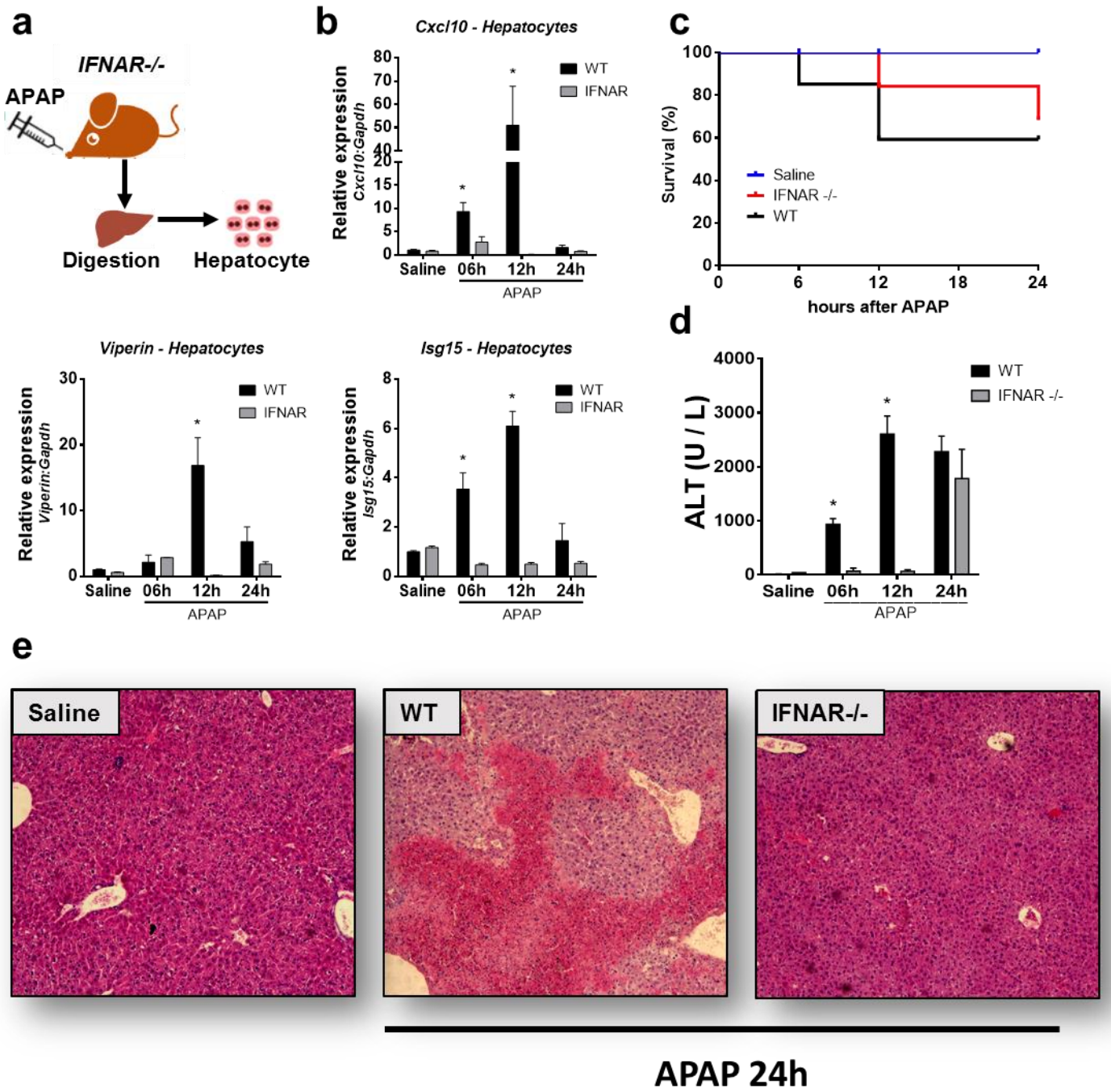
Para saber se a produção e sinalização de IFN I durante a lesão hepática estão diretamente envolvidas no agravamento da lesão hepática estéril, nós tratamos animais *IFNAR*^{-/-} com APAP e isolamos hepatócitos para avaliar a expressão de genes regulados por IFN I (**figura 6a**).

As expressões de *Cxcl10*, *Viperin* e *Isg15* estão reduzidas nos hepatócitos de animais *IFNAR*^{-/-} tratados com APAP em todos os tempos avaliados, sendo que a redução foi significativa nos tempos de 06 e 12 horas para os genes *Cxcl10* e *Isg15* e apenas no ponto de 12 horas para o gene *Viperin* (**figura 6b**). Todas as comparações foram feitas em relação aos hepatócitos do grupo WT tratado com APAP.

Além disso, os animais *IFNAR*^{-/-} tiveram uma taxa de sobrevivência de ~70%, enquanto a dos animais WT foi de ~60% (**figura 6c**) e apresentaram

níveis significativamente menores de ALT nos tempos de 06 e 12 horas após o tratamento com APAP (**figura 6d**). Entretanto, apesar de os níveis de ALT dos animais *IFNAR* ^{-/-} terem sido menores no tempo de 24h em comparação aos animais WT, eles aumentaram em comparação aos tempos de 06 e 12 horas do próprio grupo *IFNAR* ^{-/-}. Apesar disso, a histologia dos animais *IFNAR* ^{-/-} apresentou menos pontos de necrose do que a histologia dos animais WT no tempo de 24 horas após a administração de APAP (**figura 6e**).

Figure 6



5. DISCUSSÃO

A lesão hepática estéril induzida por droga tem aumentado nos últimos anos, principalmente nos países desenvolvidos, onde a venda indiscriminada de remédios que não exigem prescrição médica tem levado ao uso abusivo de medicamentos, principalmente como forma de a automedicação (Bernal & Wendon, 2013). No caso do APAP, a lesão hepática ocorre, primeiramente, pela toxicidade da droga e, em um segundo momento, pelo infiltrado inflamatório que ocorre devido à liberação de DAMPs (Kubes & Mehal, 2012).

A liberação de DNA na corrente sanguínea ou sua deposição nos tecidos tem sido o fator chave que desencadeia ou agrava diversas doenças, como Lupus, artrite e outras doenças autoimunes (Jakobs, Perner, & Hornung, 2015; Means et al., 2005; Nagata & Kawane, 2011). Durante a lesão hepática por APAP, ocorre a liberação e deposição de DNA no ambiente intra-hepático e o hepatócito parece ser a principal fonte desse DNA, pois hepatócitos primários de camundongos cultivados com APAP apresentam vesículas no seu citoplasma contendo ácido nucleico (Marques et al., 2015b). Em condições normais, o DNA se encontra compartimentalizado no núcleo e nas mitocôndrias, entretanto, quando ocorre o extravasamento ou liberação para o citoplasma, pode ser reconhecido por sensores de DNA citoplasmáticos e desencadear uma resposta pró-inflamatória através da produção de interferon do tipo I e citocinas pró inflamatórias (Dombrowski et al., 2011; Paludan & Bowie, 2013; Wu & Chen, 2014). O excesso de células em processo de morte celular também podem desencadear a produção de interferon do tipo I nas células fagocíticas (Ahn et al., 2012; Ahn et al., 2014; Woo et al., 2014). As vias

de sensores de DNA podem ser separadas em STING-dependentes ou independentes. Até o momento, apenas a via do TLR9 e do AIM2 foram descritas como STING-independentes, pois respondem por outra via que não envolve a sinalização para a proteína STING. Por isso, optamos por avaliar o eixo já bem descrito do cGas-STING, além das outras vias independentes. Como o fígado é um órgão bastante heterogêneo, decidimos estudar a sua população de células residentes separadamente em dois grupos: parenquimais (hepatócitos) e não-parenquimais (NPC). Quando nós comparamos os dois grupos, observamos que as NPCs estão muito mais capacitadas do que os hepatócitos para fazer o sensing de DNA visto que os níveis de expressão nos hepatócitos são drasticamente inferiores aos das NPCs. O hepatócito murinho tem, naturalmente, baixas quantidades de STING e cGAS, e a depleção destes genes não aumenta a suscetibilidade ao vírus da hepatite B (HBV) (Thomsen et al., 2016). Além disso, os hepatócitos são células poliploides com grandes quantidades de mitocôndria no seu citoplasma e frequentemente sofrem perda de cromossomo durante a divisão celular, pois as fibras do fuso não conseguem se conectar à todos os centrômeros (Duncan, 2013; Duncan et al., 2012). Portanto, parte de seu material genético fica fora do núcleo após o término da divisão celular, fenômeno conhecido como “lagging chromosome”, e a presença destes sensores em níveis elevados poderia desencadear uma resposta pró-inflamatória indevida.

Durante a lesão por APAP, os hepatócitos reduzem a expressão dos sensores de DNA a níveis significativamente menores do que os encontrado em condições fisiológicas, o que sugere que a ativação das vias de sensores de DNA pode não ser benéfico para a célula, reforçando os argumentos

apresentados no parágrafo anterior. Surpreendentemente, foi observado um aumento significativo nos níveis de expressão de *Sting* 12 horas após a administração do APAP, porém esse aumento não se refletiu no aumento concomitante da expressão de *Ifnb* e *Ifna*. O *Sting*, por si só, não é um sensor de DNA propriamente dito, mas sim um adaptador central presente no retículo endoplasmático e o aumento dos seus níveis na célula pode não ser suficiente para desencadear uma resposta, visto que ele geralmente necessita de um sinal enviado por outro sensor de DNA ou por bactérias (Barber, 2014; Sun et al., 2013; Woodward et al., 2010). Além disso, a transcrição de *Sting* pode ser regulada por IFN I (Liu et al., 2016; Ma et al., 2015), o que corrobora com nossos dados sobre a produção de IFN I por outras células durante a lesão hepática estéril. Paradoxalmente, ainda que o *Aim2* nos hepatócitos tenha sofrido downregulation em todos os tempos avaliados, a expressão de *I11b* apresentou aumento significativo no tempo de 12 horas pós APAP. A transcrição de *I11b* pode ser desencadeada por diversos DAMPs além do DNA e é regulado pelo fator de transcrição NF- κ B. No nosso estudo a sua regulação mostrou-se independente da regulação do *Aim2*. As NPCs aumentaram as expressões de todos os sensores de DNA significativamente 12 horas pós APAP, com exceção do *cGas*, bem como de todas as citocinas. Apesar de não ter sido significativo, o *cGas* teve sua expressão aumentada em ~4 vezes e esse aumento se manteve 24 horas pós APAP. O aumento da expressão de *I11b* foi significativo já no tempo de 06 horas pós APAP e não refletiu o padrão de aumento observado no *Aim2*, o que mostra que outras vias estão regulando esse aumento.

A produção de IFN I pelas NPCs foi confirmada por citometria de fluxo, através de animais *Ifnb*^{YFP/YFP} tratados com APAP. O aumento da produção e IFN-B foi correspondente com aumento da expressão gênica 12 horas pós APAP. Além disso, os hepatócitos apresentaram aumento significativo nos genes regulados por IFN I 12 horas pós APAP. Assim, ficou mostrado que as NPCs estão produzindo IFN I e está havendo sinalização do tipo parácrina para os hepatócitos.

Quando administramos DNase nos animais previamente tratados com APAP, todos os parâmetros avaliados retornam a níveis similares aos de animais saudáveis. Isso mostra que o aumento da expressão dos sensores de DNA nas NPCs, bem como a produção de IFN I está diretamente relacionado com a deposição de DNA no fígado. Portanto, o DNA é o responsável pelo aumento de IFN I durante a lesão hepática. Além disso, os animais tratados com DNase apresentam menores níveis séricos de ALT, o que corresponde a menor quantidade de hepatócitos morrendo por necrose. Os animais foram tratados a partir de 06 horas após a administração de APAP, tempo suficiente para que a lesão, o infiltrado inflamatório, na sua maioria neutrófilos, e a deposição de DNA ocorressem.

Para entender a influência do IFN I na lesão hepática estéril, nós utilizamos animais que não possuem o receptor funcional para IFN I (*IFNAR* ^{-/-}). Assim como nos animais tratados com DNase, não houve aumento da expressão dos genes regulados por IFN I. Os níveis séricos de ALT também estavam significativamente menores nos animais *IFNAR* ^{-/-}, entretanto 24 horas pós APAP os animais sofreram uma divergência, de forma que metade apresentou baixos níveis de ALT e a outra metade apresentou níveis similares aos dos

animais WT. Portanto, a ausência IFN pode reduzir ou, pelo menos, atrasar a lesão hepática. Ainda, os animais *IFNAR*^{-/-} apresentaram taxas de sobrevivência de ~70%, 10% a mais do que animais WT. Em concordância com os nossos dados, (Bachmann, Waibler, Pleli, Pfeilschifter, & Muhl, 2017) mostrou que o IFN I agrava a lesão por APAP pois induz o aumento do estresse oxidativo devido à liberação de óxido nítrico nos hepatócitos. Mostra, também, que animais *IFNAR*^{-/-} exibem menor lesão hepática induzida por APAP no tempo de 24 horas. Contudo, os autores não encontraram aumento de expressão de *Irfn* nos tempos de 06 e 24 horas pós APAP e justificaram que os níveis basais de IFN I seriam suficientes para desencadear aumento de iNOS. O trabalho recente de (Bhattacharya et al., 2015) mostrou a relação entre a produção de IFN I e a morte de hepatócitos durante a hepatite viral, em que o aumento de IFN I no fígado causa *downregulation* de superóxido dismutase 1 (*Sod1*) e subsequente necrose de hepatócitos causada por estresse oxidativo. No nosso modelo, nós observamos aumento de expressão de *Sod1* em todos os tempos (dado não mostrado).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, mostramos que as populações residentes do fígado são muito distintas e respondem de maneira oposta a uma ameaça em potencial. Assim, mostramos que deposição de DNA intravascular induz a produção de IFN I pelas células não-parenquimais e que o aumento de IFN I agrava a lesão hepática. Não há dados na literatura que mostrem diretamente a produção de IFN I durante a lesão hepática causada por APAP. Esse trabalho mostra a importância de se estudar as populações separadamente e não somente o órgão como um todo e traz uma melhor compreensão de como o sistema imune pode estar amplificando a lesão hepática estéril.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., Harashima, A., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Morales, A., Ahn, J., Gutman, D., & Barber, G. N. 2013. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell*, 50(1): 5-15.
- Ahn, J., Gutman, D., Saijo, S., & Barber, G. N. 2012. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(47): 19386-19391.
- Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., & Barber, G. N. 2014. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat Commun*, 5: 5166.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Orntoft, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64(15): 5245-5250.
- Bachmann, M., Waibler, Z., Pleli, T., Pfeilschifter, J., & Muhl, H. 2017. Type I Interferon Supports Inducible Nitric Oxide Synthase in Murine Hepatoma Cells and Hepatocytes and during Experimental Acetaminophen-Induced Liver Damage. *Front Immunol*, 8: 890.
- Barber, G. N. 2014. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol*, 35(2): 88-93.
- Barber, G. N. 2015. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, 15(12): 760-770.
- Baum, R., Sharma, S., Carpenter, S., Li, Q. Z., Busto, P., Fitzgerald, K. A., Marshak-Rothstein, A., & Gravallese, E. M. 2015. Cutting edge: AIM2 and endosomal TLRs differentially regulate arthritis and autoantibody production in DNase II-deficient mice. *J Immunol*, 194(3): 873-877.
- Belhocine, K., & Monack, D. M. 2012. Francisella infection triggers activation of the AIM2 inflammasome in murine dendritic cells. *Cell Microbiol*, 14(1): 71-80.
- Bernal, W., Auzinger, G., Dhawan, A., & Wendon, J. 2010. Acute liver failure. *Lancet*, 376(9736): 190-201.
- Bernal, W., & Wendon, J. 2013. Acute liver failure. *N Engl J Med*, 369(26): 2525-2534.
- Bhattacharya, A., Hegazy, A. N., Deigendesch, N., Kosack, L., Cupovic, J., Kandasamy, R. K., Hildebrandt, A., Merkler, D., Kuhl, A. A., Vilagos, B., Schliehe, C., Panse, I., Khamina, K., Baazim, H., Arnold, I., Flatz, L., Xu, H. C., Lang, P. A., Aderem, A., Takaoka, A., Superti-Furga, G., Colinge, J., Ludewig, B., Lohning, M., & Bergthaler, A. 2015. Superoxide Dismutase 1 Protects Hepatocytes from Type I Interferon-Driven Oxidative Damage. *Immunity*, 43(5): 974-986.
- Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K. L., & Superti-Furga, G. 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*, 10(3): 266-272.
- Burdette, D. L., Monroe, K. M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J. S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Vance, R. E. 2011. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 478(7370): 515-518.
- Chu, V. T., Gottardo, R., Raftery, A. E., Bumgarner, R. E., & Yeung, K. Y. 2008. MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biol*, 9(7): R118.

- Chun, L. J., Tong, M. J., Busuttill, R. W., & Hiatt, J. R. 2009. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *J Clin Gastroenterol*, 43(4): 342-349.
- David, B. A., Rezende, R. M., Antunes, M. M., Santos, M. M., Freitas Lopes, M. A., Diniz, A. B., Sousa Pereira, R. V., Marchesi, S. C., Alvarenga, D. M., Nakagaki, B. N., Araujo, A. M., Dos Reis, D. S., Rocha, R. M., Marques, P. E., Lee, W. Y., Deniset, J., Liew, P. X., Rubino, S., Cox, L., Pinho, V., Cunha, T. M., Fernandes, G. R., Oliveira, A. G., Teixeira, M. M., Kubes, P., & Menezes, G. B. 2016. Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology*, 151(6): 1176-1191.
- Decker, P., Singh-Jasuja, H., Haager, S., Kotter, I., & Rammensee, H. G. 2005. Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol*, 174(6): 3326-3334.
- DeLeve, L. D. 2013. Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J Clin Invest*, 123(5): 1861-1866.
- Dempsey, A., & Bowie, A. G. 2015. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*, 479-480: 146-152.
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., & Nagy, L. E. 2013. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*, 3(2): 785-797.
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Goss, C., Anz, D., Simanski, M., Glaser, R., Harder, J., Hornung, V., Gallo, R. L., Ruzicka, T., Besch, R., & Schaubert, J. 2011. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Sci Transl Med*, 3(82): 82ra38.
- Duncan, A. W. 2013. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol*, 24(4): 347-356.
- Duncan, A. W., Hanlon Newell, A. E., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S. B., Thayer, M. J., Strom, S. C., & Grompe, M. 2012. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology*, 142(1): 25-28.
- Fausto, N., & Campbell, J. S. 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*, 120(1): 117-130.
- Ferguson, B. J., Mansur, D. S., Peters, N. E., Ren, H., & Smith, G. L. 2012. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*, 1: e00047.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J., & Alnemri, E. S. 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, 458(7237): 509-513.
- Gao, D., Wu, J., Wu, Y. T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., & Chen, Z. J. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*, 341(6148): 903-906.
- Guo, F., Han, Y., Zhao, X., Wang, J., Liu, F., Xu, C., Wei, L., Jiang, J. D., Block, T. M., Guo, J. T., & Chang, J. 2015. STING agonists induce an innate antiviral immune response against hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(2): 1273-1281.
- Han, Y., Chen, Z., Hou, R., Yan, D., Liu, C., Chen, S., Li, X., & Du, W. 2015. Expression of AIM2 is correlated with increased inflammation in chronic hepatitis B patients. *Virology*, 12: 129.
- He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., Yang, Z. H., Zhong, C. Q., & Han, J. 2015. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res*, 25(12): 1285-1298.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813): 740-745.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E., & Fitzgerald, K. A. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458(7237): 514-518.

- Imaeda, A. B., Watanabe, A., Sohail, M. A., Mahmood, S., Mohamadnejad, M., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., & Mehal, W. Z. 2009. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest*, 119(2): 305-314.
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 455(7213): 674-678.
- Ishikawa, H., Ma, Z., & Barber, G. N. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265): 788-792.
- Jakobs, C., Perner, S., & Hornung, V. 2015. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *PLoS One*, 10(6): e0131702.
- James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 31(12): 1499-1506.
- Janko, C., Schorn, C., Grossmayer, G. E., Frey, B., Herrmann, M., Gaipl, U. S., & Munoz, L. E. 2008. Inflammatory clearance of apoptotic remnants in systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmun Rev*, 8(1): 9-12.
- Jenne, C. N., & Kubes, P. 2013. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*, 14(10): 996-1006.
- Jiang, Y., Zhu, Y., Liu, Z. J., & Ouyang, S. 2017. The emerging roles of the DDX41 protein in immunity and diseases. *Protein Cell*, 8(2): 83-89.
- Jones, J. W., Kayagaki, N., Broz, P., Henry, T., Newton, K., O'Rourke, K., Chan, S., Dong, J., Qu, Y., Roose-Girma, M., Dixit, V. M., & Monack, D. M. 2010. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21): 9771-9776.
- Ju, C. 2012. Damage-associated molecular patterns: their impact on the liver and beyond during acetaminophen overdose. *Hepatology*, 56(5): 1599-1601.
- Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 20: 709-760.
- Kubes, P., & Mehal, W. Z. 2012. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 143(5): 1158-1172.
- Lam, E., Stein, S., & Falck-Pedersen, E. 2014. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *J Virol*, 88(2): 974-981.
- Larsen, F. S., & Wendon, J. 2014. Understanding paracetamol-induced liver failure. *Intensive Care Med*, 40(6): 888-890.
- Lee, W. M. 2007. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology*, 46(4): 966-970.
- Liu, Y., Goulet, M. L., Sze, A., Hadj, S. B., Belgnaoui, S. M., Lababidi, R. R., Zheng, C., Fritz, J. H., Olganier, D., & Lin, R. 2016. RIG-I-Mediated STING Upregulation Restricts Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol*, 90(20): 9406-9419.
- Liu, Z. X., Govindarajan, S., & Kaplowitz, N. 2004. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology*, 127(6): 1760-1774.
- Liu, Z. X., Han, D., Gunawan, B., & Kaplowitz, N. 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 43(6): 1220-1230.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Ma, F., Li, B., Yu, Y., Iyer, S. S., Sun, M., & Cheng, G. 2015. Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING. *EMBO Rep*, 16(2): 202-212.
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T. D. 2016. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol*, 46(2): 269-280.
- Marques, P. E., Amaral, S. S., Pires, D. A., Nogueira, L. L., Soriani, F. M., Lima, B. H., Lopes, G. A., Russo, R. C., Avila, T. V., Melgaco, J. G., Oliveira, A. G., Pinto, M. A., Lima, C. X., De Paula, A. M., Cara, D. C., Leite, M. F., Teixeira, M. M., & Menezes, G. B. 2012.

- Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*, 56(5): 1971-1982.
- Marques, P. E., Antunes, M. M., David, B. A., Pereira, R. V., Teixeira, M. M., & Menezes, G. B. 2015a. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc*, 10(2): 258-268.
- Marques, P. E., Oliveira, A. G., Pereira, R. V., David, B. A., Gomides, L. F., Saraiva, A. M., Pires, D. A., Novaes, J. T., Patricio, D. O., Cisalpino, D., Menezes-Garcia, Z., Leevy, W. M., Chapman, S. E., Mahecha, G., Marques, R. E., Guabiraba, R., Martins, V. P., Souza, D. G., Mansur, D. S., Teixeira, M. M., Leite, M. F., & Menezes, G. B. 2015b. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*, 61(1): 348-360.
- Martin-Murphy, B. V., Holt, M. P., & Ju, C. 2010. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett*, 192(3): 387-394.
- Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T., & Luster, A. D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest*, 115(2): 407-417.
- Nagata, S., & Kawane, K. 2011. Autoinflammation by endogenous DNA. *Adv Immunol*, 110: 139-161.
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(6): 453-460.
- Paludan, S. R., & Bowie, A. G. 2013. Immune sensing of DNA. *Immunity*, 38(5): 870-880.
- Pelka, K., Shibata, T., Miyake, K., & Latz, E. 2016. Nucleic acid-sensing TLRs and autoimmunity: novel insights from structural and cell biology. *Immunol Rev*, 269(1): 60-75.
- Peters, N. E., Ferguson, B. J., Mazzon, M., Fahy, A. S., Kryzstofinska, E., Arribas-Bosacoma, R., Pearl, L. H., Ren, H., & Smith, G. L. 2013. A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by a virus. *PLoS Pathog*, 9(10): e1003649.
- Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Kawai, T., Ishii, K., Takeuchi, O., Yoshimori, T., & Akira, S. 2009. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(49): 20842-20846.
- Shi, C. S., Shenderov, K., Huang, N. N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., Sher, A., & Kehrl, J. H. 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*, 13(3): 255-263.
- Stratmann, S. A., Morrone, S. R., van Oijen, A. M., & Sohn, J. 2015. The innate immune sensor IFI16 recognizes foreign DNA in the nucleus by scanning along the duplex. *Elife*, 4: e11721.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 339(6121): 786-791.
- Szabo, G., & Petrasek, J. 2015. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12(7): 387-400.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., & Taniguchi, T. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 448(7152): 501-505.
- Thomsen, M. K., Nandakumar, R., Stadler, D., Malo, A., Valls, R. M., Wang, F., Reinert, L. S., Dagnaes-Hansen, F., Hollensen, A. K., Mikkelsen, J. G., Protzer, U., & Paludan, S. R. 2016. Lack of immunological DNA sensing in hepatocytes facilitates hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 64(3): 746-759.
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R., & Bowie, A. G. 2010. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol*, 11(11): 997-1004.

- Vollmar, B., & Menger, M. D. 2009. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 89(4): 1269-1339.
- Wang, Z., Choi, M. K., Ban, T., Yanai, H., Negishi, H., Lu, Y., Tamura, T., Takaoka, A., Nishikura, K., & Taniguchi, T. 2008. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(14): 5477-5482.
- Woo, S. R., Fuertes, M. B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M. J., Leung, M. Y., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G. N., Fitzgerald, K. A., Alegre, M. L., & Gajewski, T. F. 2014. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity*, 41(5): 830-842.
- Woodward, J. J., Iavarone, A. T., & Portnoy, D. A. 2010. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, 328(5986): 1703-1705.
- Wu, D. L., Xu, G. H., Lu, S. M., Ma, B. L., Miao, N. Z., Liu, X. B., Cheng, Y. P., Feng, J. H., Liu, Z. G., Feng, D., Na, L., Li, W. Q., & Zhao, Y. R. 2013. Correlation of AIM2 expression in peripheral blood mononuclear cells from humans with acute and chronic hepatitis B. *Hum Immunol*, 74(5): 514-521.
- Wu, J., & Chen, Z. J. 2014. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, 32: 461-488.
- Yang, C. A., Huang, S. T., & Chiang, B. L. 2015. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology (Oxford)*, 54(2): 324-331.
- Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., & Liu, Y. J. 2011. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*, 12(10): 959-965.
- Zhao, H., Gonzalezgugel, E., Cheng, L., Richbourgh, B., Nie, L., & Liu, C. 2015. The roles of interferon-inducible p200 family members IFI16 and p204 in innate immune responses, cell differentiation and proliferation. *Genes Dis*, 2(1): 46-56.