

Universidade Federal De Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

**A importância da sobrevivência prolongada de neutrófilos nas zonas
necróticas para o reparo tecidual e resolução da inflamação hepática**

Matheus Silvério De Mattos

Belo Horizonte

2021

Matheus Silvério De Mattos

**A importância da sobrevivência prolongada de neutrófilos nas zonas
necróticas para o reparo tecidual e resolução da inflamação hepática**

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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia
Celular

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista
De Menezes

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal De Minas Gerais**

2021

043

Mattos, Matheus Silvério de.

A importância da sobrevivência prolongada de neutrófilos nas zonas necróticas para o reparo tecidual e resolução da inflamação hepática [manuscrito] / Matheus Silvério de Mattos. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

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

1. Biologia Celular. 2. Doença Hepática Induzida por Drogas. 3. Neutrófilos. 4. Inflamação. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
MATHEUS SILVÉRIO DE MATTOS**

232/2021
entrada
1º/2017
2017671023

Às **quatorze horas** do dia **22 de março de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**A IMPORTÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA PROLONGADA DE NEUTRÓFILOS NAS ZONAS NECRÓTICAS PARA O REPARO TECIDUAL E RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	Aprovado
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	Aprovado
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	Aprovado
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	Aprovado
Dr. Thiago Mattar Cunha	USP	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de março de 2021.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador) _____

Dr. Enrrico Bloise _____

Dr. André Gustavo de Oliveira _____

André Gustavo de Oliveira

Dr. Flávio Almeida Amaral _____

Dr. Thiago Mattar Cunha _____

Thiago M. Cunha

Fernanda RCL Almeida

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

**E o medo é um fantasma que nos assombra
Correndo à frente do tempo para ceifar nossos sonhos**

Agradecimentos

Agradeço à minha família, por todo o apoio, compreensão e incentivo. Especialmente à minha **mãe**, por todo o companheirismo e por ser minha confidente, meu exemplo e minha inspiração. À minha **irmã**, pelas constantes palavras de amor. E à minha esposa, **Hémilly**, pelo companheirismo, apoio e por nunca me deixar duvidar de que é possível.

Ao meu orientador, **Gustavo Menezes**, por ter me acolhido e confiado em mim. Por todo o esforço para me ajudar nessa jornada sempre dando exemplos de como me tornar um profissional melhor.

A todos os amigos do CGB, que me acolheram e sempre me ajudaram em todos os momentos, tornando o laboratório como uma segunda casa.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e a todos os professores que o integram.

À agência de fomento **CAPES**.

A busca pelo conhecimento é um caminho árduo, impossível de ser trilhado sozinho. Sem o respectivo apoio de cada um, eu não conseguiria realizar esse trabalho. Portanto, deixo aqui o meu agradecimento a todos vocês que fizeram parte dessa conquista.

Muito Obrigado!

Sumário

Lista de abreviações	vi
Lista de ilustrações e figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	12
1.1 - Fígado: Estrutura e heterogeneidade funcional	12
1.2 - Lóbulo hepático	14
1.3 - Imunologia hepática: da homeostase a inflamação	16
1.4 - Lesão hepática aguda	18
1.5 - Paracetamol: farmacologia e toxicidade	19
1.6 - Inflamação aguda	22
1.7 - Neutrófilo	23
1.8 - O nascimento do neutrófilo	24
1.9 - Granulopoiese em neutrófilos	26
1.10 - Mecanismos de recrutamento de neutrófilos	28
1.11 – Neutrófilos e a resolução da inflamação	30
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
3.1 – Objetivo geral	33
3.2 – Objetivos específicos	33
4. Material e Métodos	34
4.1 – Animais	34
4.2 – Modelo de lesão hepática aguda	34
4.3 – Ensaio de atividade da Alanina Aminotransferase (ALT)	34
4.4 – Análise histológica	35
4.5 – Isolamento de células não parenquimais (NPCs)	35
4.6 – Análise diferencial dos leucócitos hepáticos	35
4.7 – Citometria de fluxo	36
4.8 – Purificação de neutrófilos por microbeads magnéticas	36
4.9 – Extração de mRNA e PCR em tempo real	37

4.10 – Microscopia confocal intravital (IVM)	37
4.11 – Depleção de células de Kupffer	38
4.12 – Análise de imagens e <i>tracking</i> de neutrófilos.....	39
4.13 – Transferência adotiva de neutrófilos	39
4.14 – Ensaio de depuração do verde de indocianina (ICG)	39
4.15 – Dosagem de citocinas e quimiocinas.....	39
4.16 – Análise estatística	40
5. Resultados	41
5.1 – A necrose hepática causa a substituição das células mononucleares residentes por infiltrado neutrofílico	41
5.2 – O egresso de células Ly6G ⁺ da medula óssea suporta o tráfego de neutrófilos através do sangue até a sua infiltração no fígado durante as fases iniciais da necrose hepática	46
5.3 – A lesão hepática aguda induz alterações no perfil de expressão gênica em neutrófilos no fígado e em compartimentos remotos.....	48
5.4 – Neutrófilos que migram para o fígado após a necrose hepática permanecem viáveis durante todo o curso da resposta inflamatória	53
5.5 – Neutrófilos acumulam preferencialmente dentro das zonas de necrose e patrulham hepatócitos mortos	56
5.6 – Transferência adotiva de neutrófilos hepáticos extraídos no momento da resolução da resposta inflamatória, induz redução da inflamação e dano tecidual	62
5.7 – Sumário dos resultados	65
6. Discussão.....	66
7. Conclusão	75
8 – Produções bibliográficas durante o período do doutorado	76
9 - Referências	78
10 – Anexo 1	83

Lista de abreviações

Actb – Beta actina

ALT – Alanina aminotransferase

APAP – *Acetaminophen* (Paracetamol)

BSA – Albumina sérica bovina

CEUA- Comitê de ética no uso de animais

CLL – Lipossomos de clodronato

Ct – *Cycle threshold*

DAMP – *Damage-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado ao dano)

DILI – *Drug induced liver injury* (Lesão hepática induzida por drogas)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FHA – Falência hepática aguda

GSH – Glutathiona reduzida

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

H&E – Hematoxilina e Eosina

i.p. – Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso

IL – Interleucina

IVM – Microscopia intravital

LHA – Lesão hepática aguda

LSECs – Célula endotelial sinusoidal do fígado

Na₂HPO₄ – Monoidrogenofosfato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

OPD – 0-fenilenodiamina dicloridrato

NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonaimina

PAMPs - Padrões moleculares associado a patógenos

PBS – Tampão salina-fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

TLR – Receptor do tipo toll

mRNA – ácido ribonucleico (RNA mensageiro)

Lista de ilustrações e figuras

Ilustração 1: Aporte sanguíneo do fígado.....	13
Ilustração 2: Estrutura do lóbulo hepático.	15
Ilustração 3: Células hepáticas e suas funções imunes.	18
Ilustração 4: Biotransformação do APAP.	22
Ilustração 5: A granulopoiese em neutrófilos.....	27
Ilustração 6: Mecanismos de recrutamento de neutrófilos para os tecidos.	30
Figura 1: Lesão hepática induzida por APAP leva à substituição das células mononucleares por infiltrado neutrofílico.....	44
Figura 2: O egresso de células Ly6G+ da medula óssea, suporta o tráfego de neutrófilos através do sangue até a sua infiltração final no fígado durante as fases iniciais da necrose hepática.	47
Figura 3: Avaliação da expressão gênica de neutrófilos extraídos da medula óssea e sangue periférico.	50
Figura 4: Avaliação da expressão gênica de neutrófilos extraídos do fígado ao longo da lesão hepática induzida por APAP.	52
Figura 5: Neutrófilos permanecem viáveis no fígado durante todas as fases da lesão hepática induzida por APAP.	55
Figura 6: Microscopia intravital das zonas necróticas no fígado após lesão induzida por sobredose de APAP.....	57
Figura 8: Análise da morfologia e comportamento dos neutrófilos dentro das áreas de necrose.....	60
Figura 9: Avaliação do perfil transcricional de neutrófilos até 72 horas após APAP.....	63
Figura 10: Transferência adotiva de neutrófilos resolutivos induz a redução da inflamação e lesão hepática.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Receptores essenciais para as funções dos neutrófilos.....	25
Tabela 2: Lista de primers utilizados nesse trabalho.....	38

Resumo

Acetaminofeno (APAP) é um anti-inflamatório não esteroideal seguro em doses terapêuticas, no entanto, a sobredose desse fármaco leva ao desenvolvimento de lesão hepática aguda devido a morte de hepatócitos por necrose oncótica. APAP é um dos principais fármacos que levam a insuficiência hepática aguda em países desenvolvidos, contribuindo para milhares de casos clínicos que requerem transplante de fígado. A morte dos hepatócitos por necrose, gera um estímulo inflamatório estéril e neutrófilos são rapidamente recrutados para o local. Devido ao seu potencial de causar dano tecidual colateral, o neutrófilo é classicamente visto como uma célula instável que pode amplificar a lesão hepática induzida por APAP. No entanto, nos últimos anos, diversos trabalhos têm demonstrado que neutrófilos podem participar da resolução da inflamação. **Objetivo:** Avaliar a dinâmica e alterações transcricionais em neutrófilos no fígado, medula óssea e sangue durante as fases de lesão e reparo do tecido hepático após insulto por APAP, bem como o comportamento desses leucócitos no local da lesão, correlacionando esses achados com o potencial papel dos neutrófilos na resolução da inflamação. **Delineamento experimental:** A lesão hepática aguda foi induzida por sobredose de APAP (600mg/Kg), por via oral, em camundongos C57BL/6 fêmeas. Avaliamos alterações no perfil transcricional, sobrevivência, bem como a dinâmica do neutrófilo no tecido hepático, medula óssea e na circulação. Por microscopia confocal intravital, avaliamos a localização exata e o comportamento desses leucócitos na lesão. **Resultados e conclusão:** Nós demonstramos que neutrófilos permanecem viáveis por longos períodos após a lesão hepática, patrulham avidamente hepatócitos mortos e aumentam a expressão de genes pró-resolutivos, incluindo *Tgf-β*, *Il1r2* e *Fpr2*. Ainda, demonstramos que a transferência adotiva de neutrófilos resolutivos, extraídos do fígado 72 horas após o desafio com APAP, para animais nos estágios iniciais da lesão (6 horas após APAP), reduziu de forma significativa a lesão hepática. Portanto, fornecemos novas evidências de que os neutrófilos podem ter participação ativa na resolução da inflamação e, conseqüentemente, no reparo tecidual. **Palavras-chave:** Neutrófilos; Resolução da inflamação; Lesão estéril; Reparo tecidual; Necrose hepática

Abstract

Acetaminophen (APAP) is a non-steroidal anti-inflammatory drug safe when used in therapeutical dosage. However, overdosage of this drug causes hepatocytes death by oncotic necrosis. APAP overdosage is the leading cause of acute liver failure in developed countries, contributing for millions of liver transplant cases. Hepatocytes death by necrosis culminates in the release of damage-associated molecular patterns into tissue, triggering inflammatory response and the consequent recruitment of neutrophils into the liver. Due its potential to cause collateral damage, neutrophil is classically perceived as an unstable cell, which are responsible to amplify APAP-induced liver injury. However, liver tissue repair is coincident with the maintenance of neutrophils at the inflammatory site during all stages of tissue repair. **Objective:** To evaluate neutrophil dynamics and transcriptional changes at liver, bone marrow and peripheral blood during all phases of APAP-induced liver injury and tissue repair, as well as to evaluate neutrophil behavior at necrotic sites, stressing out the potential role of neutrophils in resolution of inflammation and tissue repair. **Experimental design:** APAP-induced liver injury was performed by the administration of 600 mg/Kg of APAP, oral route, in female C57BL/6. We assessed neutrophil transcriptional changes, survival and its dynamics at necrotic liver, bone marrow and peripheral blood. Using intravital microscopy, we evaluated the neutrophil behavior within necrotic sites. **Results and conclusion:** We found that neutrophils remained viable during longer periods following liver damage, because they avidly patrolled necrotic areas and up-regulated pro-resolutive genes, including *Tgfb*, *Il1r2*, and *Fpr2*. Adoptive transference of resolute neutrophils harvested from livers at 72 h after injury to mice at the initial phases of injury (6 h after APAP) significantly rescued organ injury. Thus, we provide novel insights on the role of neutrophils not only in the injury amplification, but also in the resolution phases of inflammation.

Keywords: Neutrophil; resolution of inflammation; sterile injury; tissue repair; liver necrosis

1. Introdução

1.1 - Fígado: Estrutura e heterogeneidade funcional

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo, podendo compreender até 2% do peso corporal em humanos e 5% em camundongos (Dancygier 2010). Anatomicamente, localiza-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. O fígado é revestido pelo peritônio em quase toda a sua extensão, e é envolvido externamente por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo, denominada de **cápsula de Glisson**, que se torna espessa no hilo, região por onde penetram vasos sanguíneos e saem ductos hepáticos e vasos linfáticos (Vollmar and Menger 2009). O fígado é altamente vascularizado, possuindo fluxo sanguíneo de aproximadamente 1,8 litros de sangue por minuto e aporte sanguíneo duplo, recebendo sangue venoso (rico em nutrientes e pouco oxigenado) além de ser irrigado por sangue arterial, rico em oxigênio (Dancygier 2010). Aproximadamente 20% do volume de sangue que irriga o fígado, chega através da artéria hepática (ramo do tronco celíaco) e 80% chega através da veia porta que, por sua vez, drena o intestino e outros órgãos viscerais (Ben-Moshe and Itzkovitz 2019). Portanto, o fígado é um órgão de interface entre o trato digestivo e a circulação sanguínea sistêmica (**Ilustração 1**). Dessa forma, por receber o sangue que drena o trato gastrointestinal, o fígado funciona como uma espécie de filtro, realizando imunovigilância de tudo que é absorvido pelo intestino, controlando quaisquer macromoléculas ou antígenos que poderão, ou não, atingir a circulação sistêmica (Ben-Moshe and Itzkovitz 2019).

O fígado desempenha mais de 100 funções conhecidas, incluindo metabolismo de macronutrientes, regulação do volume sanguíneo, homeostase da glicose, homeostase de lipídeos e colesterol (Ben-Moshe and Itzkovitz 2019). Ainda, o fígado é responsável por realizar intrincados processos de detoxificação, funções exócrinas através da produção de bile e funções endócrinas através da liberação de hormônios (Ben-Moshe and Itzkovitz 2019). Em adição, o fígado é um importante sítio de síntese proteica, produzindo grande parte das proteínas circulantes no sangue como albumina e fatores de coagulação, e dando suporte ao sistema imune através da síntese de proteínas de fase aguda e do sistema complemento (Gebhardt 1992).

Essa heterogeneidade funcional do fígado é espelhada por sua composição celular. O fígado é composto por diversos tipos celulares de diferentes origens embriológicas (Godoy et al. 2013). Cada uma dessas células possui funções únicas que atuam em sinergismo para regular as funções hepáticas em múltiplos níveis. A principal célula que constitui o fígado é o hepatócito: célula parenquimal hepática que constitui 80% da sua massa e 60% do total de células que compõem o fígado (Godoy et al. 2013). Em adição, o fígado possui uma grande diversidade de células não parenquimais (NPCs), que inclui células endoteliais, células estreladas, colangiócitos, células de Kupffer e outras células imunes que dão suporte às funções dos hepatócitos (Ben-Moshe and Itzkovitz 2019). Todas essas células que constituem o fígado não se organizam como uma massa uniforme de células. Ao invés disso, os hepatócitos e as células não parenquimais se organizam em unidades anatômicas denominadas **lóbulos hepáticos**.

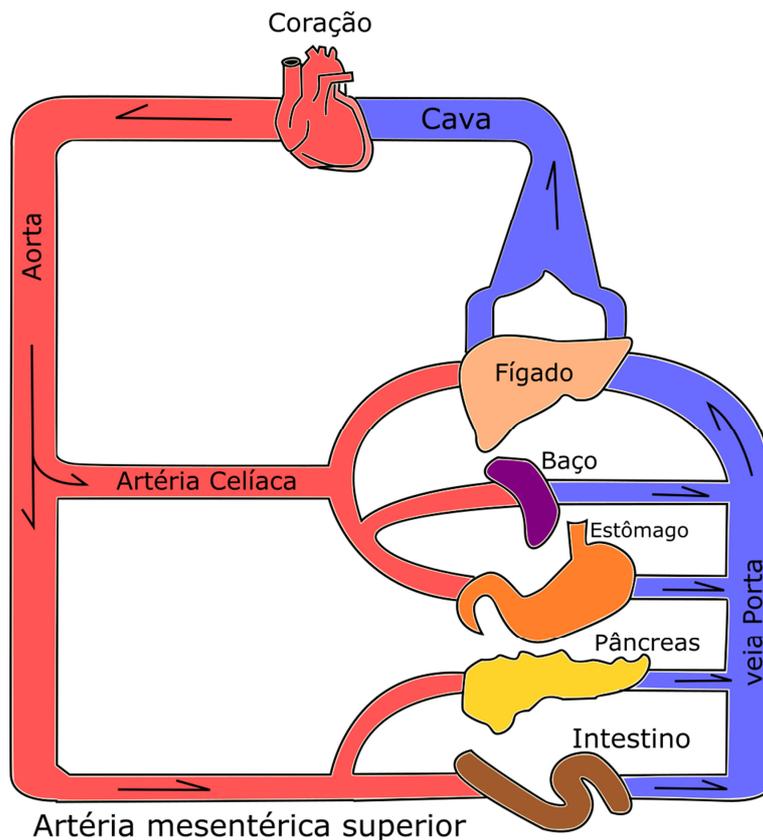


Ilustração 1: Aporte sanguíneo do fígado. O fígado possui irrigação sanguínea dupla, sendo 20% sangue arterial proveniente da artéria hepática (ramo da artéria celíaca) e 80% de sangue venoso, proveniente da veia porta que, por sua vez, drena intestino, pâncreas, estômago e baço. Adaptado de (Dancygier 2010).

1.2 - Lóbulo hepático

O lóbulo hepático é a unidade estrutural básica do fígado. Em cortes histológicos, os lóbulos hepáticos possuem formato hexagonal podendo medir, aproximadamente, 1 mm de diâmetro em humanos e 0,5 mm em camundongos (Teutsch 2005). Os lóbulos hepáticos são separados entre si por septos de tecido conjuntivo oriundos da cápsula de Glisson, que recebe o nome de **placa limitante**, sendo mais evidente em alguns animais como, por exemplo, suínos e equinos, enquanto em humanos e camundongos esse tecido conjuntivo é muito delgado, o que dificulta o estabelecimento do limite exato entre um lóbulo hepático e os adjacentes (Teutsch 2005). A partir da placa limitante, principalmente nos vértices dos lóbulos hepáticos, podemos observar a presença de vasos e nervos. Esta região é denominada **espaço porta** e contém um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta, um ducto biliar e vasos linfáticos (**Ilustração 2**).

Os hepatócitos se organizam radialmente no lóbulo hepático, arranjados em formato de cordões de células direcionadas da periferia do lóbulo em direção ao centro. Os cordões de hepatócitos são separados por vasos **sinusóides**, que são formados a partir de ramificações da veia porta. Os sinusóides também se distribuem da periferia do lóbulo em direção ao centro, onde se encontram e se fundem para dar origem à **veia centrolobular (Ilustração 2)**. Portanto, o fluxo sanguíneo no lóbulo hepático flui da sua periferia para centro, em direção à veia centrolobular (DeLeve 2013). Sinusóides hepáticos possuem formato irregular e são compostos por uma camada de células endoteliais fenestradas. Além disso, as células endoteliais são separadas dos hepatócitos por uma lâmina basal descontínua e um espaço denominado **espaço de Disse** (DeLeve 2013). Essa organização das células endoteliais hepáticas confere à microcirculação do fígado uma ótima troca de macromoléculas com o seu parênquima, garantindo que hepatócitos tenham fácil acesso às macromoléculas carregadas pelo sangue (DeLeve 2013). Quando um cordão de hepatócitos se encontra com outro cordão adjacente, eles podem dar origem ao **ducto biliar**. O fluxo da bile, no entanto, ocorre no sentido oposto ao do sangue, ou seja, da região central em direção ao espaço porta (DeLeve 2013).

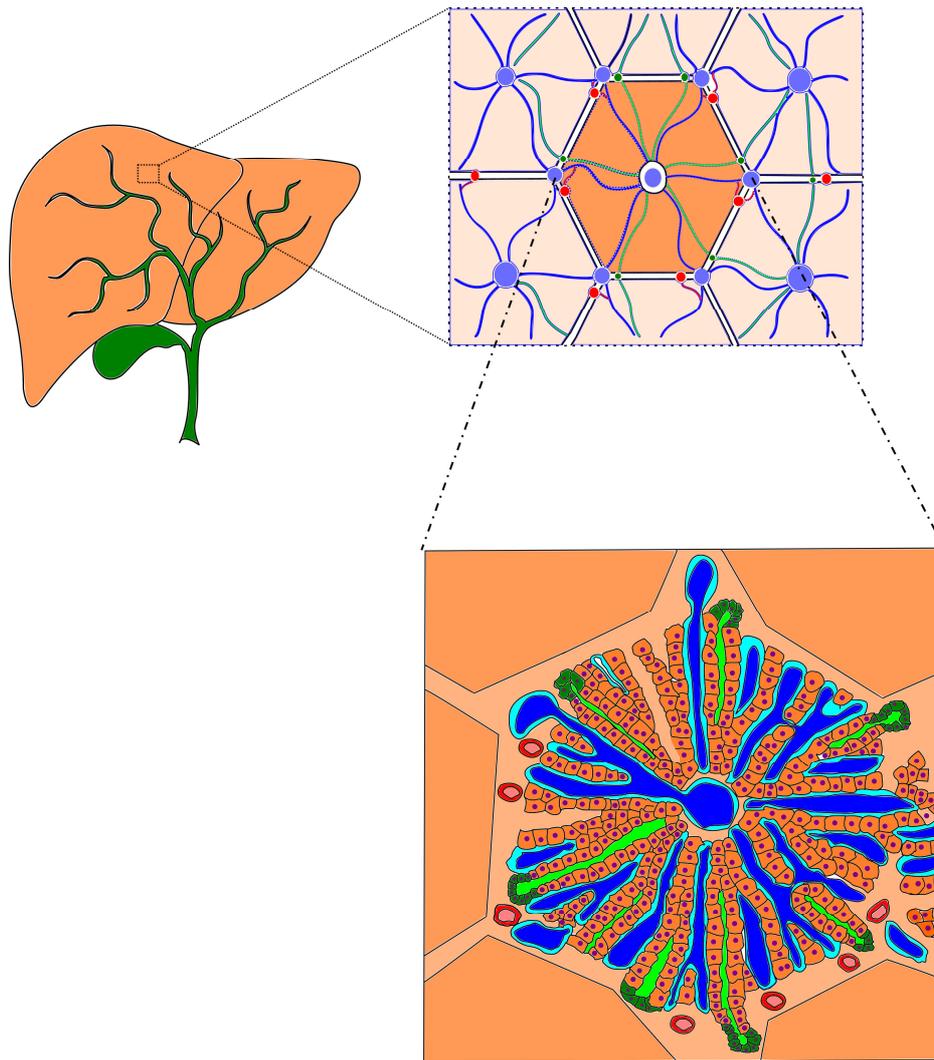


Ilustração 2: Estrutura do lóbulo hepático. O lóbulo hepático possui formato de uma coluna hexagonal, sendo separado pelos lóbulos adjacentes por uma fina camada de tecido conjuntivo. Nos vértices dos lóbulos hepáticos, se encontram ramos da veia porta (azul) e artéria hepática (vermelho), bem como ductos biliares (verde). Essa região é denominada espaço porta. Os hepatócitos se organizam de forma radial, arranjados como cordões de células.

1.3 - Imunologia hepática: da homeostase a inflamação

A despeito de suas funções metabólicas, o fígado também possui diversas funções imunológicas. Possui posicionamento anatômico estratégico para detectar patógenos que entram no organismo pelo intestino. Em verdade, o fígado contém a maior coleção de células fagocíticas do corpo e, sua estrutura, permite o completo acesso desses fagócitos à circulação, favorecendo a detecção, captura e depuração de bactérias, vírus e macromoléculas (Kubes and Jenne 2018). A subdivisão da veia porta em milhares de vasos sinusóides, no fígado, reduz consideravelmente a velocidade do fluxo sanguíneo. Nesse sentido, a velocidade do fluxo sanguíneo nos sinusóides hepáticos é aproximadamente metade da observada nos demais leitos capilares, maximizando a probabilidade de que um patógeno ou macromolécula seja detectada pelo sistema imune hepático (Oda, Yokomori and Han 2003).

No lúmen dos sinusóides hepáticos, ancorados às células endoteliais, são encontrados os macrófagos residentes do fígado, denominados **células de Kupffer**. Células de Kupffer constituem até 90% da população total de macrófagos em humanos e representam, aproximadamente, 30% de todas as NPCs do fígado (Bilzer, Roggel and Gerbes 2006). As células de Kupffer são equipadas com um extenso repertório de receptores de reconhecimento de padrão, receptores para complemento e receptores Fc, através dos quais eles podem reconhecer e fagocitar patógenos, moléculas ou células velhas presentes na circulação (Robinson, Harmon and O'Farrelly 2016). Dessa forma, juntamente com as células endoteliais hepáticas, as células de Kupffer formam o maior sistema retículo endotelial do organismo, cuja principal função é capturar patógenos, antígenos e células velhas que precisam ser eliminadas da circulação (Dixon et al. 2013). O fígado é constantemente bombardeado com produtos bacterianos derivados da microbiota presente no intestino, bem como diversos produtos oriundos da dieta com potencial de desencadear uma resposta inflamatória. Desse modo, as células de Kupffer precisam discriminar quando uma resposta imune deve ser iniciada ou não e, por isso, são parte integral da função de imunotolerância e imunovigilância realizada pelo fígado.

O espectro completo de células imunes que residem no fígado ainda não é completamente conhecido. No entanto, além das células de Kupffer, o fígado

possui células dendríticas e uma diversa população de células linfoides como, por exemplo, células NK, iNKT, linfócitos T, linfócitos B, dentre outros (Robinson et al. 2016, Nakagaki et al. 2018) (**Ilustração 3**). Essa população de células imunes residentes possui papel chave na manutenção da homeostase hepática. Além das células imunes residentes, o rápido recrutamento de neutrófilos e monócitos é parte integral da imunologia hepática.

Embora o fígado seja descrito como um órgão imunologicamente tolerante, é evidente que, sob o devido estímulo, o fígado é capaz de gerar uma rápida e robusta resposta imune. Esse equilíbrio entre imunotolerância e a capacidade de montar uma resposta inflamatória robusta, é mediada por diversas interações que ocorrem entre as populações de células imunes residentes e as células que são recrutadas para o fígado (Kubes and Jenne 2018). Essa equalização balanceada da resposta imune hepática é essencial para a homeostase do fígado. Em situações em que a resposta imune é ativada de modo inapropriado ou mantida de maneira crônica, ocorre o surgimento de patologias hepáticas. Por outro lado, a falha em montar uma resposta inflamatória eficiente, pode resultar no estabelecimento de infecções sistêmicas virais e bacterianas (Kubes and Jenne 2018). A ativação da resposta imune no fígado é multifatorial, mas podemos destacar a **lesão hepática aguda** como um evento comum em iniciar uma resposta imune no fígado.

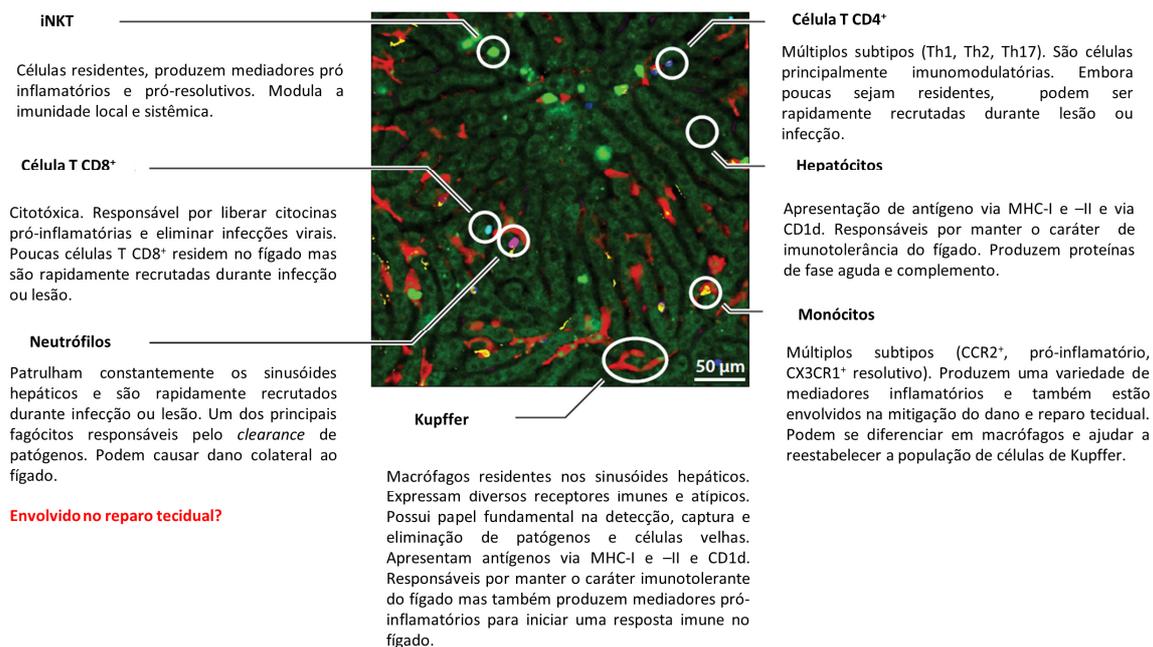


Ilustração 3: Células hepáticas e suas funções imunes. Imagem representativa das células imunes do fígado. iNKT é visualizada por CXCR6-GFP⁺ (verde claro). Hepatócitos são visíveis devido sua auto fluorescência quando incididos com laser 488 (verde escuro). Célula T CD8⁺ marcada com anti-CD8 (Ciano). Célula T CD4⁺ marcado com anti-CD4 (Azul). Neutrófilos marcados com anti-Ly6G (roxo). Células de Kupffer foram marcadas com anti-F4/80 (vermelho). Finalmente, monócitos foram identificados como CD11b⁺, F4/80⁻ e Ly6G⁻ (Amarelo). Adaptado de (Kubes and Jenne 2018).

1.4 - Lesão hepática aguda

A etiologia da lesão hepática aguda (LHA) é bastante diversa e pode ser causada devido a infecção por patógenos (hepatites virais), podem ter origem hereditária (doença de Wilson), metabólica (esteatose hepática), isquêmica ou devido a insultos causados pela biotransformação de fármacos (Bernal et al. 2010). Embora o fígado seja descrito como um órgão com grande capacidade regenerativa, uma lesão persistente pode comprometer o funcionamento hepático, gerar fibrose, câncer e levar à falência hepática aguda (FHA) (Kubes and Jenne 2018). Em verdade, o fígado é um órgão altamente suscetível a lesões necróticas. Seu posicionamento anatômico e função metabólica única, expõe o fígado à uma diversidade de toxinas, insultos provenientes da dieta,

álcool e vários fármacos com potencial hepatotóxico. Neste trabalho, no entanto, focaremos na **lesão hepática induzida por medicamentos**.

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de fármacos, principalmente aqueles administrados por via oral. Os subprodutos tóxicos produzidos pela biotransformação dessas substâncias, tornam o fígado um órgão muito suscetível a lesões e ao desenvolvimento de **hepatite medicamentosa** (European Association for the Study of the Liver. Electronic address et al. 2019). Hepatite medicamentosa ou do inglês, *Drug Induced Liver Injury* (DILI) é o segundo maior tipo de LHA grave em países desenvolvidos, sendo responsável por aproximadamente 15% dos casos, ficando atrás apenas da hepatite isquêmica (Breu et al. 2019). No entanto, DILI possui pior prognóstico, visto que é a causa mais comum de evolução de lesão hepática aguda para falência FHA, sendo responsável por 60% dos casos de FHA (Lee 2008). Dentre os fármacos com potencial hepatotóxico, **paracetamol** é o principal agente causador de hepatite medicamentosa.

1.5 - Paracetamol: farmacologia e toxicidade

Paracetamol ou Acetaminofeno (APAP), é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) descoberto na Alemanha em 1877 e sintetizado pela Bayer. No entanto, sua comercialização só ocorreu a partir dos anos 1955, vendido como um antipirético e analgésico para crianças sob nome registrado de “Tylenol, Elixir das crianças” (Brune, Renner and Tiegs 2015). Em relação à sua farmacodinâmica, APAP atua de modo semelhante aos demais AINEs, ou seja, através da inibição da atividade das enzimas ciclooxigenases (COX). Em seu trabalho laureado com o prêmio Nobel, Vane demonstrou que AINEs agem através da inibição da ação das enzimas COX e, conseqüentemente, inibem a produção de prostaglandinas (mediadores lipídicos pró-inflamatórios derivados do ácido araquidônico) (Vane 1971). Prostaglandinas são associadas ao desenvolvimento de hiperalgesia, febre e inflamação (Vane 1971). Portanto, AINEs, de um modo geral, possuem ação analgésica, antipirética e antiinflamatória. Quimicamente, APAP é um fenol (**Ilustração 4**) e grupamentos fenóis possuem, como característica geral, uma alta facilidade em sofrer oxidação. Essa oxidação, inclusive, é essencial para a ação do APAP em inibir

a atividade de COX-1 e COX-2, uma vez que ele acaba servindo como substrato para a ação peroxidase dessas duas enzimas (Graham et al. 2013).

Quanto a sua farmacocinética, APAP é um ácido fraco ($pK_a = 9,7$) e, por isso, é encontrado de forma não ionizada em pH fisiológico (Graham et al. 2013). Possui coeficiente de partição octanol/água de 3,2, o que indica que sua difusão passiva entre as células é provável. Além disso, o volume de distribuição do APAP é de aproximadamente 50 L, o que indica que o APAP se distribui pelo organismo sem ligação aparente a tecidos e proteínas plasmáticas (Graham et al. 2013). Essa falta de acúmulo do APAP em tecidos, juntamente com sua baixa ligação a proteínas plasmáticas, indica que a concentração de APAP utilizada em experimentos realizados *in vitro* possui correlação direta com suas concentrações *in vivo*. APAP possui alta biodisponibilidade quando administrado por via oral (aproximadamente 88%), sendo bem absorvido no intestino e atingindo seu pico de concentração plasmática dentro dos primeiros 90 minutos após a ingestão (Hodgman and Garrard 2012). Uma vez que o APAP não se liga amplamente a proteínas plasmáticas, possui meia vida de, aproximadamente, 1,5 – 2,5 horas quando administrado em dose terapêutica e de 4 – 8 horas em caso de superdosagem (McGill and Jaeschke 2013). O aumento da meia vida do APAP em casos de superdosagem, no entanto, ocorre devido à redução do seu metabolismo e consequente redução na sua taxa de depuração (McGill and Jaeschke 2013).

A biotransformação do APAP ocorre, principalmente, no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. Em dosagem terapêutica, cerca de 50 – 60% do APAP é convertido a glicuronídeos inativos, através da ação de enzimas glucoronil transferases, e cerca de 30 – 40% é conjugado a sulfatos pela ação das enzimas sulfotransferases (Mazaleuskaya et al. 2015). Entre 5 – 10% do APAP é metabolizado pela via do citocromo P-450 e menos de 5% é excretado diretamente na urina como conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico (Mazaleuskaya et al. 2015). Embora seja seguro em doses terapêuticas (~4 g/dia em adultos), em casos de sobredosagem a via de sulfatação e, posteriormente, a via de glicuronidação se tornam saturadas e a quantidade de APAP que passa a ser metabolizada pela via do citocromo P-450 aumenta consideravelmente (Mazaleuskaya et al. 2015). De um modo geral, a biotransformação de

substâncias pela via do citocromo P-450 ocorre em uma reação de duas etapas, sendo que a primeira etapa consiste em uma reação de oxidação, gerando um composto intermediário tóxico. Na segunda fase, esse composto intermediário é rapidamente conjugado à glutatona, resultando em um composto inerte. A isoforma mais importante do citocromo P-450 na biotransformação do APAP é a CYP2E1, embora a CYP3A4 e CYP1A2 também estejam envolvidas (James, Mayeux and Hinson 2003). A CYP2E1 realiza a hidroxilação do APAP dando origem ao composto intermediário N-acetil-p-amino-benzoquinonaimina (NAPQI), que é altamente reativo e, por isso, tóxico (James et al. 2003). A segunda fase da reação envolve a conjugação do NAPQI ao grupo sulfidril presente na glutatona (**Ilustração 4**). No entanto, o estoque de glutatona é limitado e, em casos de sobredose de APAP, o estoque de glutatona é esgotado e o NAPQI passa a reagir com proteínas dos hepatócitos, incluindo proteínas mitocondriais (Yoon et al. 2016, Hodgman and Garrard 2012, Mazaleuskaya et al. 2015). Como consequência, ocorre a redução na produção de energia, bem como a perda de proteínas envolvidas no controle de íons, gerando um estresse oxidativo e a consequente morte dos hepatócitos por necrose oncótica (Yoon et al. 2016).

A morte de hepatócitos por necrose é um evento abrupto, em que a célula não tem tempo ou energia para clivar e empacotar seu conteúdo intracelular em vesículas, como ocorre na apoptose (James et al. 2003). Dessa forma, a membrana plasmática perde sua integridade e o conteúdo intracelular é exposto no tecido onde, agora, passa a agir como padrão molecular associado ao dano (DAMPs) e atua como potente indutor da **inflamação aguda** (Marques et al. 2012).

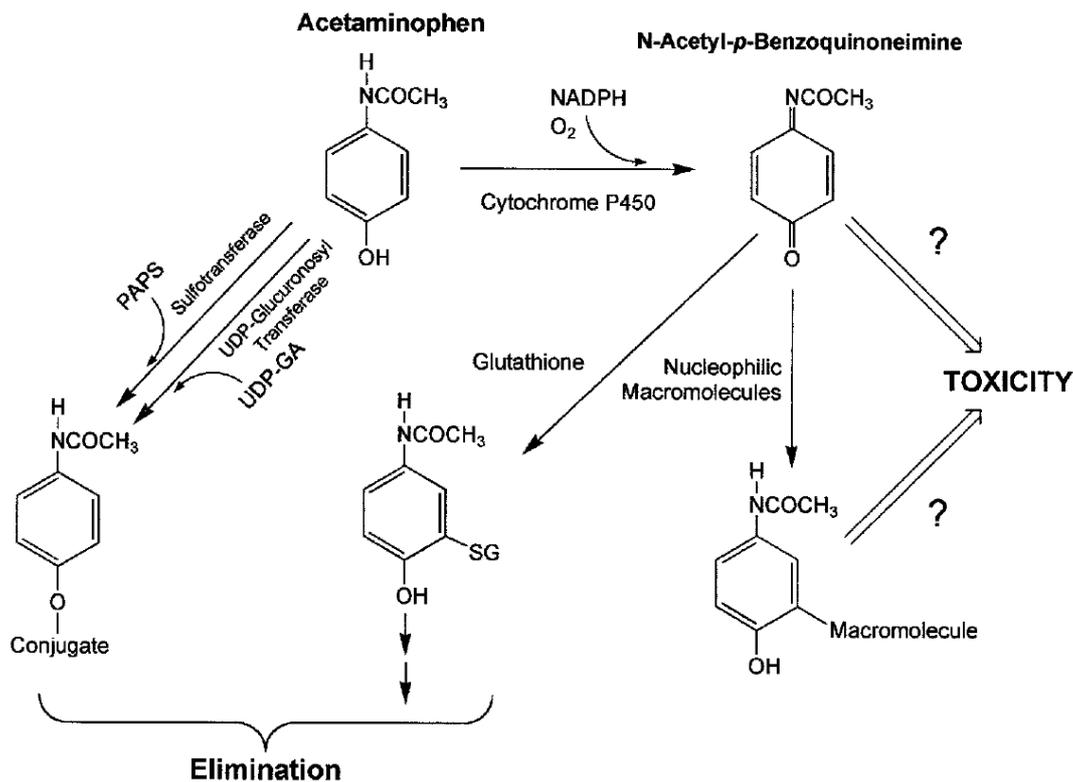


Ilustração 4: Biotransformação do APAP. O APAP é preferencialmente biotransformado por sua conjugação à grupos glicuronil ou sulfatos e apenas uma pequena parte vai para a oxidação na via do citocromo P-450. No entanto, em casos de overdose, a oxidação do APAP pelo citocromo P-450 aumenta, gerando excessos do composto tóxico intermediário NAPQI, que excedem a capacidade antioxidante da glutathiona resultando em estresse oxidativo e morte dos hepatócitos por necrose oncolítica. Adaptado de (James et al. 2003).

1.6 - Inflamação aguda

John Hunter, um médico cirurgião escocês, em 1794, escreveu que “A inflamação por si não deve ser considerada uma doença, mas, sim, uma operação salutar que ocorre em resposta a alguma violência ou doença”. Essa visão sobre a resposta inflamatória foi o primeiro passo para a atual definição de inflamação aguda: uma resposta salutar do organismo à infecção ou dano tecidual, cujo propósito é restaurar a homeostase do tecido (Alessandri et al. 2013). No entanto, embora a inflamação aguda seja um processo fisiológico, se ela se tornar crônica, pode levar à amplificação do dano tecidual e causar disfunção do órgão (Alessandri et al. 2013). Macroscopicamente, a resposta

inflamatória é clinicamente reconhecida pelos seus 5 sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda de função, sendo que os quatro primeiros já haviam sido descritos no século 1 por Cornelius Celsus. Microscopicamente, a inflamação aguda é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos para o local do estímulo inflamatório, principalmente neutrófilos e, subsequentemente, monócitos inflamatórios (Alessandri et al. 2013).

Nesse sentido, após a lesão hepática induzida pela sobredose de APAP, inicia-se uma resposta inflamatória aguda no fígado, caracterizada pelo rápido e expressivo **recrutamento de neutrófilos** para o tecido hepático. A presença de neutrófilos na lesão hepática induzida por sobredose de APAP foi reportada em 1973 (Mitchell et al. 1973) e, desde então, o papel do neutrófilo no curso da lesão hepática ainda permanece um tema de debate.

1.7 - Neutrófilo

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação humana, correspondendo entre 40 – 60% dos leucócitos circulantes (Ley et al. 2018). Além de estar presente em grande número, neutrófilos são células com elevada capacidade móvel, e são equipados com uma diversidade de receptores de membrana capazes de reconhecer e responder a diversos estímulos inflamatórios (**Tabela 1**) (Futosi, Fodor and Mocsai 2013). Essas características fazem com que os neutrófilos sejam uma das primeiras células a serem recrutadas para o local do estímulo inflamatório. Por esse motivo, quando falamos sobre inflamação aguda, o neutrófilo é, provavelmente, a primeira célula que vem à nossa cabeça. Neutrófilos, juntamente com basófilos e eosinófilos, são agrupados e classificados como granulócitos. Granulócitos são diferenciados dos demais leucócitos, principalmente, com base na sua morfologia devido à presença de núcleo segmentado, e às suas propriedades características quando marcados com corantes ácido-base, visto que pode-se observar a presença de grânulos citoplasmáticos (Hartenstein 2006).

1.8 - O nascimento do neutrófilo

Neutrófilos são produzidos diariamente na medula óssea. É estimado que, em um humano saudável, sejam produzidos 1×10^6 neutrófilos/Kg/dia e esse número pode aumentar em até 10 vezes quando ocorre estímulo inflamatório (Kolaczkowska and Kubes 2013). Neutrófilos são originados a partir de células tronco hematopoiéticas, denominadas HSCs, que darão origem a um progenitor mieloide comum. Esse progenitor mieloide comum, por sua vez, dá origem às células progenitoras de granulócitos-monócitos (Alvarenga et al. 2018a). A célula progenitora de granulócitos-monócitos é comprometida com a formação de monócitos e granulócitos e, neste caso, dará origem aos mieloblastos, célula que passará por diversos estágios de maturação até dar origem ao neutrófilo maduro. A saber, os estágios de maturação são: mieloblastos, promielócitos, mielócitos, meta mielócitos, bastonetes e, finalmente, neutrófilos maduros (Alvarenga et al. 2018a). É estimado que o neutrófilo demore cerca de dez dias para atingir a maturação completa antes de ser liberado para a circulação (Kubes 2018). Uma vez na circulação, na ausência de um estímulo inflamatório, é bem aceito que neutrófilos morram após 24 horas (Kubes 2018). Portanto, neutrófilos passam mais tempo na medula óssea durante seu processo de maturação do que na circulação sistêmica.

A regulação do número de neutrófilos no organismo é dependente do número de neutrófilos em apoptose que são fagocitados por macrófagos teciduais, principalmente nos sistemas retículo-endotelial (Kubes 2018). Aparentemente, a eferocitose desses neutrófilos induz a diminuição da produção da citocina IL-23, o que leva à redução na produção de IL-17 por células T (gama-delta) culminando na menor produção de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (Stark et al. 2005). O contrário também é verdade, a diminuição na eferocitose de neutrófilos aumenta a produção de IL-23, que aumenta os níveis de IL-17 e estimula a produção de G-CSF, culminando na maior produção de neutrófilos na medula. Uma vez maduro, os neutrófilos deixam a medula óssea em direção à circulação sistêmica. O egresso de neutrófilos da medula óssea é regulado, de maneira antagônica, pela sua expressão dos receptores de quimiocinas CXCR2 e CXCR4 (Eash et al. 2010). Dessa forma, enquanto a ativação de CXCR2 facilita o egresso de neutrófilos, a

ativação de CXCR4 retém ou direciona, para a medula, neutrófilos velhos (Wang et al. 2017).

GPCRs	FcRs	Adesão	Citocinas	Imunidade Inata
FPR1	FcγR1	L-selectina	IL-4R	TLR1
FPR2	FcγRIIA (Humano)	PSGL-1	IL-6R	TLR2
FPR3	FcγRIIB	LFA-1	IL-12R	TLR4
LTB4R1	FcγRIII (camundongo)	Mac-1	IL-15R	TLR5
LTB4R2	FcγRIIIB (humano)	VLA-4	G-CSFR	TLR6
PAFR	FcγRIV (camundongo)		GM-CSFR	TLR8
C5aR	FcαRI (humano)		IFNAR	TLR9
CXCR1	FcεRI		IFNGR	Dectin-1
CXCR2	FcεRII		IL-10R	Mincle
CXCR4			IL-1RI	MDL-1
CCR1			IL-1RII	Mcl
CCR2			IL-18R	CLEC-2
			TNFR1	NOD2
			TNFR2	NLRP3
			Fas	RIG-1
			RANK	MDA5
			TRAIL-R2	
			TRAIL-R3	

Tabela 1: Receptores essenciais para as funções dos neutrófilos. Adaptado de (Futosi et al. 2013).

1.9 - Granulopoiese em neutrófilos

Neutrófilos possuem 4 tipos diferentes de grânulos em seu citoplasma. Esses grânulos são essenciais para essas células desempenharem seu papel fundamental na imunidade inata. Os grânulos são um importante reservatório de proteases e componentes antimicrobianos, além de conterem um arsenal de receptores importantes no processo de migração dos neutrófilos em direção ao local do estímulo inflamatório (Alvarenga et al. 2018a). A mobilização coordenada desses grânulos é o que transforma os neutrófilos de uma célula circulante passiva em um potente efetor da inflamação aguda.

A granulopoiese ocorre de modo sequencial durante o processo de maturação dos neutrófilos na medula óssea. Desse modo, os grânulos recebem nomes de acordo com a ordem em que são formados, sendo denominados grânulos primários, secundários, terciários ou quaternários (Cowland and Borregaard 2016). A granulopoiese têm início quando mieloblastos se diferenciam em promielócitos (**Ilustração 5**). Promielócitos são caracterizados pela presença de núcleo arredondado e pelo surgimento dos grânulos primários (também denominados de grânulos azurófilos). Esses grânulos são ricos em mieloperoxidase (MPO), a peroxidase característica de neutrófilos e, por isso, esse grânulo também é denominado de grânulo positivo para peroxidase (Spicer and Hardin 1969). Portanto, os demais grânulos que serão formados são denominados grânulos negativos para peroxidase e são subdivididos em grânulos secundários (ou específicos) e grânulos terciários (ou gelatinase). Os grânulos quaternários (também denominados vesículas secretórias) são formados nos estágios finais da maturação do neutrófilo através de invaginações da membrana plasmática. Portanto, vesículas secretoras são um grande reservatório de receptores de membrana (Sengelov et al. 1995).

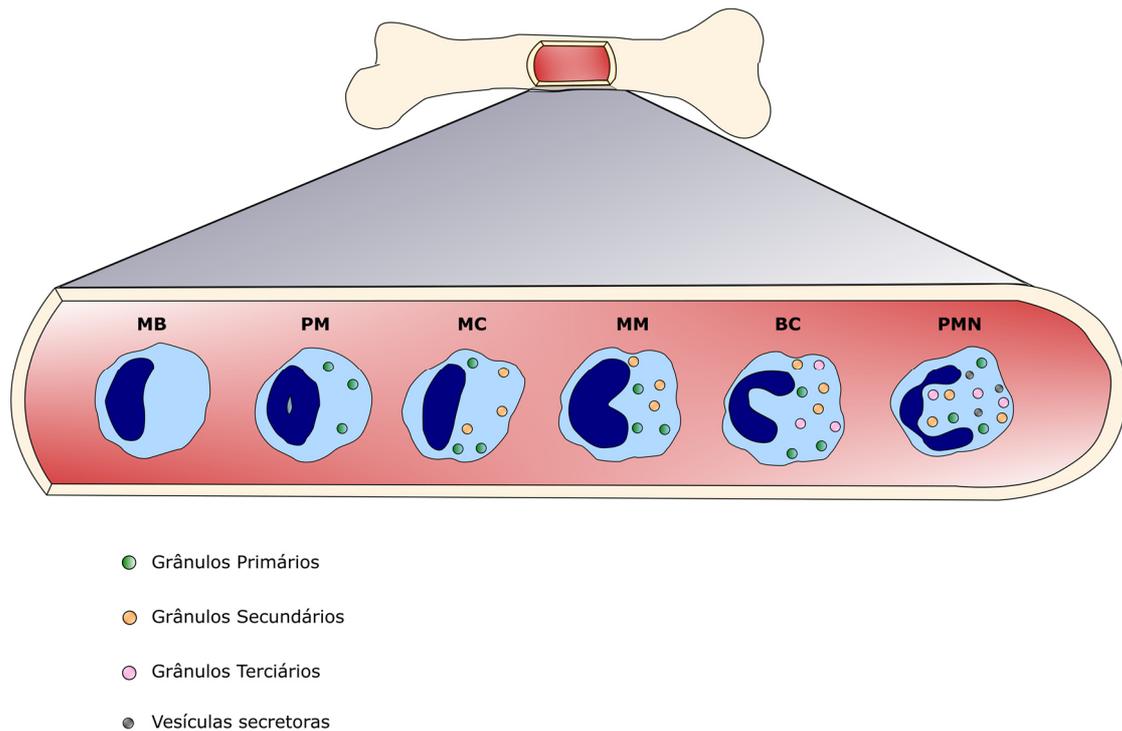


Ilustração 5: A granulopoiese em neutrófilos. Os grânulos dos neutrófilos surgem de maneira sequencial durante a sua maturação na medula óssea. A granulopoiese se inicia nos promielócitos (PM), quando são formados os grânulos primários. Em seguida, na fase de mielócitos (MC) e metamielócitos (MM), são formados os grânulos secundários. Os grânulos terciários se formam durante a fase de bastonetes (BC) e nos neutrófilos maduros (PMN). Finalmente, os grânulos quaternários se formam apenas no neutrófilo maduro devido à invaginações da membrana. Adaptado de (Alvarenga et al. 2018a).

A liberação dos grânulos pelos neutrófilos, ou degranulação, ocorre na ordem inversa em que os grânulos são produzidos. Nesse sentido, a degranulação ocorre a partir dos grânulos quaternários, seguido dos grânulos terciários, secundários e primários (Sengelov et al. 1995). Enquanto a heterogeneidade dos grânulos é explicada pelos estágios do desenvolvimento do neutrófilo em que são formados, as diferentes propensões de serem liberados na ordem inversa ainda não são completamente compreendidas. No entanto, essa ordem na degranulação é extremamente importante para a fisiologia e função dos neutrófilos. Em um modelo de migração *in vivo*, foi demonstrado que 100% das vesículas secretoras se fundem com a membrana plasmática durante a diapedese, seguido por 40% dos grânulos terciários, 25% dos grânulos

secundários e 7% dos grânulos primários (Sengelov et al. 1995). A mobilização das vesículas secretórias é de extrema importância no início da diapedese, visto que fornece diversos receptores relevantes para esse processo. A subsequente mobilização dos grânulos terciários, ricos em metaloproteinases, é importante para romper a membrana basal. Portanto, esse programa sequencial de degranulação garante ao neutrófilo uma maquinaria intracelular capaz de aumentar seu potencial de migração, tanto no sentido de reconhecer estímulos, quanto de digerir tecidos para chegar ao local do estímulo inflamatório.

1.10 - Mecanismos de recrutamento de neutrófilos

A resposta dos neutrófilos a um estímulo inflamatório é extremamente rápida. Isso ocorre, principalmente, por que os neutrófilos já possuem sintetizados em seus grânulos tudo o que precisam para i) perceber e chegar até o local do estímulo e ii) produzir e liberar potentes oxidantes e proteases dentro de poucos minutos após detectar o patógeno (Kubes 2018). O estímulo inicial responsável por engatilhar o recrutamento de neutrófilos é, em grande parte, desempenhado pelas células imunes residentes nos tecidos. Essas células, incluindo macrófagos e células dendríticas, reconhecem padrões moleculares associado a patógenos (PAMPs) e DAMPs. Em resposta, liberam mediadores inflamatórios que estabelecem um gradiente de moléculas quimiotáticas ao longo do tecido (Kubes 2018). Esses mediadores serão reconhecidos pelos diversos receptores expressos por neutrófilos, por exemplo, receptores acoplados à proteína G, receptores Fc, selectinas e integrinas, receptores do tipo Toll, receptores de lectinas, etc. **(Tabela 1)** (Futosi et al. 2013).

A migração dos neutrófilos para a maioria dos tecidos ocorre de acordo com a clássica cascata de 5 etapas: captura, rolamento, adesão, rastejamento e transmigração. O primeiro passo, captura, envolve a formação de interações entre as células endoteliais e os neutrófilos. Mediadores inflamatórios ativam células endoteliais das vênulas pós capilares, o que leva ao aumento na sua expressão de P-selectinas e E-selectinas (Nourshargh and Alon 2014). Selectinas nas células endoteliais se ligam aos seus ligantes glicosilados presentes nos neutrófilos, PSGL-1. Após a captura, os neutrófilos começam a rolar sobre o leito vascular, na direção do fluxo sanguíneo, devido às forças de cisalhamento (Nourshargh and Alon 2014). Durante essa interação com células

endoteliais, neutrófilos interagem com quimiocinas aprisionadas (devido a interações eletrostáticas) no glicocálix das células endoteliais. Essas quimiocinas induzem sinais intracelulares heterólogos que levam a alteração conformacional e a subsequente ativação de β 2-integrinas (LFA-1, MAC-1) (Zarbock et al. 2011). Essas integrinas se ligam à ICAM1 e ICAM2 presente na superfície das células endoteliais levando à adesão mais firme dos neutrófilos (Zarbock et al. 2011). O neutrófilo começa, então, a rastejar pela parede dos vasos, procurando ativamente o melhor local para realizar a transmigração (Jenne and Kubes 2013). A transmigração só é completada quando o neutrófilo atravessa o endotélio e a lâmina basal, processo que pode durar entre 5 e 20 minutos (Ley et al. 2007) **(Ilustração 6)**.

O recrutamento de neutrófilos para o fígado, no entanto, ocorre de maneira ligeiramente diferente. Isso ocorre devido à ausência de junções oclusivas e lâmina basal nas células endoteliais sinusoidais do fígado (LSECs). Além disso, os sinusóides hepáticos são fenestrados, o que facilita a transmigração de neutrófilos (Lalor et al. 2002). Outra particularidade, é que LSECs não expressam VE-caderina, CD31 e CD34 e possui baixa expressão de VECAM-1 (Scoazec and Feldmann 1994). Após atravessar o endotélio, os neutrófilos chegam ao espaço de Disse, o que fornece aos neutrófilos um fácil acesso ao parênquima hepático. Estudos demonstraram que o papel de moléculas de adesão na transmigração de neutrófilos para o fígado depende do estímulo. Em um modelo de endotoxemia induzida por LPS, ocorre a redução na expressão de CD18 em neutrófilos e, nesse caso, a transmigração ocorre de maneira dependente da interação entre CD44 em neutrófilos com ácido hialurônico nas LSECs (McDonald et al. 2008). No entanto, em um modelo de lesão estéril induzida por queimadura focal, não houve contribuição de CD44, enquanto CD18 teve papel fundamental para a transmigração de neutrófilos (McDonald et al. 2010) **(Ilustração 6)**.

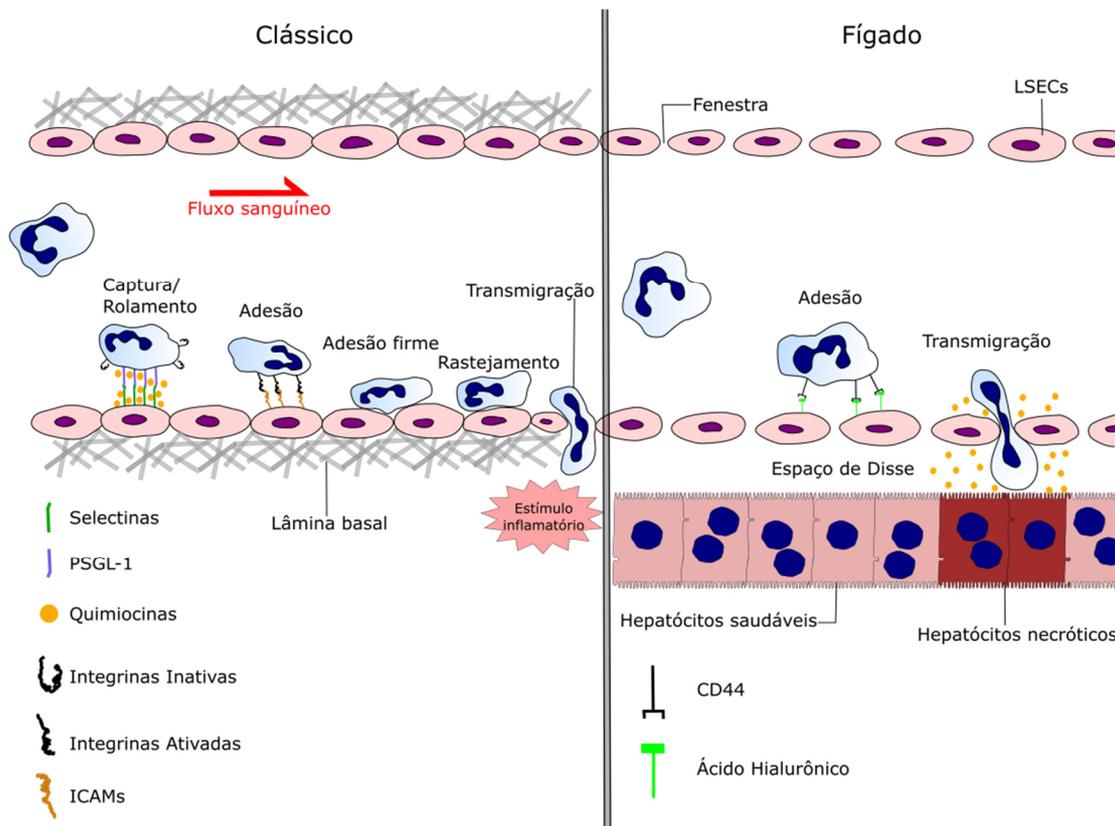


Ilustração 6: Mecanismos de recrutamento de neutrófilos para os tecidos. O mecanismo clássico de recrutamento de neutrófilos envolve uma intrincada sequência de eventos que culminam na diapedese do neutrófilo. No fígado, no entanto, a diapedese é um evento mais simples e rápido, em grande parte devido à fenestras e ausência de lâmina basal nas LSECs, bem como a presença de espaço de Disse entre as LSECs e os hepatócitos adjacentes. Adaptado de (Alvarenga et al. 2018a).

1.11 – Neutrófilos e a resolução da inflamação

Nosso conhecimento sobre as funções pró-inflamatórias do neutrófilo é muito maior do que nosso, recém emergente, conhecimento sobre as suas funções pró-resolutivas. Sem dúvidas, o neutrófilo possui funções essenciais nos momentos iniciais da inflamação aguda, no entanto, nas últimas duas décadas, vem se tornando cada vez mais evidente que os neutrófilos podem, também, ter papel fundamental na resolução da inflamação e reparo tecidual (Jones et al. 2016). Nesse sentido, diversos trabalhos vêm demonstrando que neutrófilos podem orquestrar ativamente a resolução da inflamação através da produção e liberação *in situ* de mediadores pró-resolutivos (Perretti et al. 2000, Jones et al.

2016, Bourke et al. 2003, Martin et al. 2013). Portanto, neutrófilos possuem o potencial de alterar o micro ambiente inflamatório, induzindo a resolução da inflamação e o consequente retorno à homeostase tecidual. Além disso, neutrófilos podem ajudar no processo de angiogênese após uma lesão tecidual, evento essencial para o retorno do tecido à homeostase. Neutrófilos possuem estocados em seus grânulos secundários, grandes quantidades de fatores de crescimento vascular (Gong and Koh 2010). Além disso, a própria produção e liberação, pelos neutrófilos, de quimiocinas ELR⁺ (típicos ligantes dos receptores CXCR1 e CXCR2) podem estimular a angiogênese através da ativação de receptores CXCR2 em células endoteliais (Heidemann et al. 2003, Addison et al. 2000, Benelli et al. 2002). Um trabalho recente também demonstrou que neutrófilos participam ativamente da resolução da inflamação através da liberação de microRNA-223, que está associado com a alteração no perfil de macrófagos de pró-inflamatório para pró-resolutivo (Calvente et al. 2019). Ainda, neutrófilos liberam microvesículas (micropartículas) contendo anexina A1 e fosfatidilserina em sua membrana, que também atuam na reprogramação de macrófagos (Jones et al. 2016).

A inflamação aguda é um processo espaço-temporal e, desse modo, o papel do neutrófilo no curso da inflamação pode ser governado pela sua localização, bem como pelo momento em que a resposta inflamatória se encontra. Atualmente já é bem descrito e aceito que os neutrófilos, mesmo após sua ativação, possuem perfil transcricional ativo sendo capazes de alterar sua expressão gênica durante respostas inflamatórias (Ericson et al. 2014). Nesse sentido, neutrófilos poderiam alterar seu perfil de pró-inflamatória para uma um caráter mais pró-resolutivo e apresentar, também, um importante papel na resolução da inflamação aguda hepática induzida por APAP. Em um trabalho recente do nosso grupo, demonstramos que a presença de neutrófilos no tecido hepático é fundamental para permitir o rápido reparo do fígado após lesão estéril (Alvarenga et al. 2018b).

2. Justificativa

Hepatite medicamentosa é uma condição séria que pode levar à falência hepática aguda (David and Hamilton 2010). Atualmente, estima-se que 50% dos casos de falência hepática aguda na Europa e Estados Unidos seja devido a superdosagens de paracetamol (Lee 2013). Esse elevado número de casos pode ser atribuído à alta disponibilidade de paracetamol, bem como ao seu fácil acesso, uma vez que é vendido sem a necessidade de prescrição médica. Atualmente, a única opção terapêutica em casos de superdosagens é restrita à administração de N-acetil-cisteína até 12 horas após a intoxicação com APAP e, em casos graves, a única opção efetiva é o transplante de fígado. No entanto, estima-se que 1/3 dos pacientes morrem durante a espera e, ainda que um transplante de emergência seja realizado, apenas 20% dos pacientes sobrevivem mais que 1 ano após o procedimento (Schmidt and Larsen 2007).

Uma característica da lesão hepática aguda induzida pela sobredose de APAP é o intenso recrutamento de neutrófilos para o local da lesão. Embora os neutrófilos sejam classicamente vistos como simples células efetoras da inflamação aguda, cuja principal função é chegar rapidamente ao local do estímulo inflamatório e produzir poderosos oxidantes em uma tentativa desesperada de matar patógenos, novos trabalhos vêm demonstrando que neutrófilos podem possuir importante papel na resolução da inflamação. O presente trabalho visa expandir nosso atual conhecimento sobre como neutrófilos podem participar ativamente da resolução da inflamação e do consequente reparo tecidual após a lesão hepática aguda induzida pela sobredose de APAP. Esse ainda é um tema que gera grandes debates e, ampliar nosso conhecimento nessa área, é fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visam induzir ativamente a resolução da inflamação ao invés da simples administração indiscriminada de fármacos anti-inflamatórios.

3. Objetivos

3.1 – Objetivo geral

Avaliar a dinâmica e alterações transcricionais em neutrófilos no fígado, medula óssea e sangue durante as fases de lesão e reparo do tecido hepático após insulto por APAP, bem como o comportamento desses leucócitos no local da lesão, correlacionando esses achados com o potencial papel dos neutrófilos na resolução da inflamação.

3.2 – Objetivos específicos

3.2.1 - Induzir o recrutamento de neutrófilos para o fígado utilizando paracetamol 600 mg/Kg.

3.2.2 - Realizar a purificação de células Ly6G positivas do fígado 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a administração de paracetamol.

3.2.3 - Avaliar a expressão de genes pró-inflamatórios e pró-resolutivos por RT-PCR, em neutrófilos extraídos da medula óssea, sangue e fígado.

3.2.4 - Avaliar se neutrófilos em compartimentos remotos: medula óssea e circulação sistêmica, percebem e respondem à lesão hepática.

3.2.5 - Avaliar o comportamento dos neutrófilos nas zonas de necrose durante todo o curso da lesão hepática.

3.2.6 – Avaliar o efeito da transferência adotiva de neutrófilos com perfil resolutivo para animais no início da lesão hepática.

4. Material e Métodos

4.1 – Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com idade variando entre 8 a 10 semanas, provenientes do centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal De Minas Gerais (CEBIO-UFMG). Durante o período de experimentação, os animais ficaram alojados em micro isoladores de polipropileno Alesco® no biotério do Centro de Biologia Gastrointestinal, localizado no departamento de morfologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Os animais tiveram livre acesso à água e ração, a temperatura foi mantida em 23°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram avaliados e realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA – UFMG) sob o protocolo de nº 331/2015.

4.2 – Modelo de lesão hepática aguda

A lesão hepática foi induzida pela sobredose de paracetamol (APAP) foi realizada conforme descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Araujo et al. 2018). Para tanto, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 – 15 horas e foram gavados, por via oral, com 600mg/kg de Acetaminofeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em salina 0,9% estéril e aquecida. Animais controle receberam volume equivalente do veículo por via oral.

4.3 – Ensaio de atividade da Alanina Aminotransferase (ALT)

A confirmação da lesão hepática foi determinada, de forma indireta, pelo aumento nos níveis séricos da enzima Alanina Aminotransferase. Para tanto, foi realizado um teste cinético (Bioclin). Resumidamente, amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 1,500 x g por 10 minutos para a coleta do soro. O ensaio enzimático foi realizado em microplaca de 96 poços, onde 3 diluições das amostras de soro foram adicionadas (1:10, 1:20 e 1:30), junto com o substrato (Tampão Hepes pH 7,8. LDH, L-alanina, NaCl e azida sódica) e coenzimas (alfacetoglutarato, NADH e azida sódica) ambos fornecidos pelo fabricante. A placa contendo as amostras foi mantida à 37°C por 50 segundos e, então, foi lida em espectrofotômetro (340nm) à 37°C em intervalos de 1 minuto durante 4 minutos.

4.4 – Análise histológica

O fígado foi colhido e fixado em uma solução de formaldeído 4% (em PBS, pH 7,4) (Sigma-Aldrich), desidratado em álcool e embebido em parafina. Foram feitas secções de 4 µm de espessura com auxílio de um micrótomo e foram colocadas em lâminas histológicas. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Imagens das lâminas foram adquiridas utilizando um microscópio Nikon Ti (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan) através de uma objetiva de 40X.

4.5 – Isolamento de células não parenquimais (NPCs)

Camundongos foram desafiados com 600mg/kg de APAP e 6, 12, 24, 48 e 72 horas após o desafio, o fígado foi coletado e macerado em pequenos pedaços e, então, digerido em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com colagenase VIII 1mg/mL (Sigma-Aldrich, C2139) por 1 hora a 37°C. Após a incubação, essa solução foi filtrada em *cell strainer* 70µm para a remoção de tecido não digerido. O filtrado foi transferido para um tubo de 50mL e centrifugado diferencialmente: i) 300 x g por 5 minutos a 4°C; ii) 60 x g por 3 minutos a 4°C e iv) 300 x g por 5 minutos a 4°C. O pellet final foi utilizado para posterior análises.

4.6 – Análise diferencial dos leucócitos hepáticos

Logo após o isolamento das NPCs, foi adicionado ao pellet 100µL de PBS suplementado com 3% de BSA. Essa suspensão de células foi homogeneizada e, uma alíquota, foi diluída 10x em uma solução de lise para hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB). Essa solução contendo as células foi colocada em câmara de Neubauer e, então, foi realizada a determinação do total de leucócitos utilizando-se um microscópio óptico (Motic BA310) com aumento de 400X.

A partir dessa contagem, 5×10^4 células foram diluídas em 100 µL de PBS-BSA 3% para a confecção de lâminas em citocentrífuga (INBRAS, ALB 12cc) – centrifugação por 10 minutos a 450 rpm em temperatura ambiente. As Lâminas foram coradas com um Kit de panótico rápido seguindo o protocolo do fabricante (Renylab). A determinação diferencial da população de células foi realizada em microscópio óptico de campo claro com aumento de 1.000X em óleo de imersão. Foram contadas 400 células por lâmina, em campos aleatórios,

e as células foram diferenciadas entre Neutrófilos, células mononucleares e linfócitos. As características utilizadas para a diferenciação das células foram morfologia nuclear e coloração nuclear e citoplasmática.

4.7 – Citometria de fluxo

Após o isolamento das NPCs, 5×10^5 células de cada amostra foram marcadas com anti-Ly6G conjugado à FITC ($2\mu\text{g}/\text{mL}$ eBioscience, San Diego, CA, USA clone 1A8), Anexina V conjugada à APC ($2\mu\text{g}/\text{mL}$, Immuno tools) e iodeto de propídio ($0,5 \text{ mg}/\text{mL}$, Life Technologies) em tampão fosfato suplementado com HEPES (10mM), NaCl (150mM) e CaCl_2 ($2,5\text{mM}$) $\text{pH}=7,4$ por 30 minutos. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro Accuri™ C6 (Becton-Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA) e os dados foram analisados com o auxílio do software FlowJo 10 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA).

4.8 – Purificação de neutrófilos por microbeads magnéticas

Após o isolamento das NPCs, as células não parenquimais foram marcadas com anticorpo anti-Ly6G conjugado à PE ($4\mu\text{g}$, eBioscience, San Diego, CA, USA clone 1A8) por 30 minutos. Após a marcação, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos a 4°C e marcadas com $20\mu\text{L}$ de Microbeads anti-PE (BD IMag™, BD Bioscience) para cada 10^7 células, por 30 minutos a 4°C em tampão fosfato suplementado com 2mM de EDTA e $0,5\%$ de BSA (PBS/BSA), como determinado pelo protocolo do fabricante. As células foram lavadas com 2 mL de PBS/BSA e centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e mais 3 mL de PBS/BSA foi adicionado ao pellet. Essa solução foi transferida para uma coluna e colocada sob efeito de campo magnético iMag™ (BD Biosciences). Após 15 minutos, as células foram lavadas como descrito anteriormente e a pureza de neutrófilos foi verificada por citometria de fluxo.

4.9 – Extração de mRNA e PCR em tempo real

A extração de RNA total dos neutrófilos foi realizada com o Kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega). Às amostras, foi adicionado 500 µL de tampão de lise, fornecido pelo fabricante e, posteriormente, as amostras foram passadas em homogeneizador de tecidos seguido por centrifugação a 14.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 170µL de isopropanol. A amostra foi, então, transferida para uma mini coluna contendo um filtro de sílica acoplado à um tubo coletor, fornecido pelo fabricante, e centrifugado a 14.000 x g por 30 segundos. Um mix de DNase I (fornecido pelo fabricante) foi adicionada à amostra por 15 minutos e, após 3 lavagens com solução de lavagem fornecida pelo kit, o RNA total foi eluído em água livre de nuclease. A quantidade de RNA total foi quantificada em NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 60 ng de RNA foram utilizados para a transcrição reversa utilizando o KIT iScript™ cDNA Synthesis. O cDNA resultante foi amplificado por PCR utilizando-se kit iTaq™ Universal SYBR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden Germany). Os primers utilizados nesse trabalho estão detalhados na **Tabela 2**.

4.10 – Microscopia confocal intravital (IVM)

A microscopia confocal intravital foi realizada como descrito previamente (Marques et al. 2015). Resumidamente, os camundongos receberam, por via intravenosa, uma mistura de anticorpos e sondas fluorescentes contendo anti-Ly6G conjugado com ficoeritrina (PE) (200 µg/Kg, eBioscience, San Diego, CA, USA clone 1A8), albumina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (12 mg/Kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Sytox Green (250 nmol/Kg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Anticorpos e sondas fluorescentes foram diluídos em um volume total de 0,1mL para a administração. Após 30 minutos, os animais foram anestesiados com solução de Cetamina e Xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil, 60 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente) e laparatomizados na linha média para expor o fígado. As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1R equipado com detector espectral e estágio motorizado XYZ (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan).

Gene	Foward	Reverse
<i>18s</i>	5' - CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG - 3'	5' - CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC - 3'
<i>Actb</i>	5' - GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG - 3'	5' - GCC GGA CTC ATC GTA CTC C - 3'
<i>Gapdh</i>	5' - AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG - 3'	5' - TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA - 3'
<i>Fpr1</i>	5' - CAT TTG GTT GGT TCA TGT GCA A - 3'	5' - AAT ACA GCG GTC CAG TGC AAT - 3'
<i>Alox5</i>	5' - ACT ACA TCT ACC TCA GCC TCA TT - 3'	5' - GGT GAC ATC GTA GGA GTC CAC - 3'
<i>Cxcl1</i>	5' - CTG GGA TTC ACC TCA AGA ACA TC - 3'	5' - CAG GGT CAA GGC AAG CCTC - 3'
<i>Ltb4r</i>	5' - ATG GCT GCA AAC ACT ACA TCT C - 3'	5' - GAC CGT GCG TTT CTG CAT C - 3'
<i>Fpr2</i>	5' - GAG CCT GGC TAG GAA GGT - 3'	5' - TGC TGA AAC CAA TAA GGA ACC TG - 3'
<i>Anxa1</i>	5' - ATG TAT CCT CGG ATG TTG CTG C - 3'	5' - TGA GCA TTG GTC CTC TTG GTA - 3'
<i>Tgfb</i>	5' - CTC CCG TGG CTT CTA GTG C - 3'	5' - GCC TTA GTT TGG ACA GGA TCT G - 3'
<i>Il1r2</i>	5' - GTT TCT GCT TTC ACC ACT CCA - 3'	5' - GAG TCC AAT TTA CTC CAG GTC AG - 3'
<i>Il1rn</i>	5' - GCT CAT TGC TGG GTA CTT ACA A - 3'	5' - CCA GAC TTG GCA CAA GAC AGG - 3'

Tabela 2: Lista de primers utilizados nesse trabalho. A sequência dos primers utilizados nesse trabalho foram selecionadas através do banco de validação de primers de Harvard, PrimerBank. (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

4.11 – Depleção de células de Kupffer

Células de Kupffer foram depletadas como descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (David et al. 2016). Resumidamente, camundongos receberam uma única administração, por via intravenosa, de solução contendo lipossomos de clodronato (50 mg/Kg, CLL; clodronatelipossomes.com) 24 horas antes do desafio com APAP. Análises experimentais foram realizadas 24 horas após o desafio com APAP, totalizando 48 horas de tratamento com CLL.

4.12 – Análise de imagens e *tracking* de neutrófilos

A morfologia dos neutrófilos bem como o *tracking*, foram realizados de forma semiautomática utilizando o algoritmo do software NIS Elements AR 5.1 (Nikon). Filmes foram gerados tirando uma foto a cada 30 segundos. *Trackings* que duraram menos de três quadros foram excluídos da análise. A análise morfológica inclui: i) área do neutrófilo; ii) perímetro; iii) circularidade e iv) EqDiâmetro (diâmetro equivalente). Essa análise foi realizada digitalmente utilizando algoritmo do software NIS Elements (Nikon).

4.13 – Transferência adotiva de neutrófilos

Os camundongos foram desafiados com APAP e, 6 horas após, foram administrados por via intravenosa com 5×10^4 neutrófilos purificados do fígado de camundongos saudáveis ou purificados do fígado de camundongos na fase resolutive da lesão hepática (72 horas após o desafio com APAP). Neutrófilos purificados do fígado de animais saudáveis foram denominados “N0”, enquanto os neutrófilos purificados do fígado de animais na fase resolutive da lesão hepática foram denominados “RN”.

4.14 – Ensaio de depuração do verde de indocianina (ICG)

Para avaliar se a lesão hepática aguda gera uma disfunção hepática, nós medimos a taxa de depuração do ICG (Sigma-Aldrich) como descrito previamente (Alvarenga et al. 2018b). Resumidamente, ICG foi administrado por via intravenosa na dose de 20 mg/Kg e, após 20 minutos, amostras de sangue foram colhidas, centrifugadas a 1,500 x g durante 10 minutos e o soro foi utilizado para quantificar o nível de ICG sistêmico. Para tanto, amostras de soro foram colocadas em placas de 96 poços e lidas em espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) com comprimento de onda de 800 nm.

4.15 – Dosagem de citocinas e quimiocinas

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram quantificados por ELISA. Para tanto, microplacas de 96 poços (Nunc Maxi Sorb) foram cobertas com anticorpo de captura, na diluição recomendada pelo fabricante, em tampão carbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35 mM, NzN_3 3.1 mM; pH 9,5) e incubados *overnight*.

Após a incubação, a placa foi lavada utilizando-se PBS suplementado com 0,05% de Tween20, então, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas utilizando soluções de bloqueio recomendadas pelo fabricante (PBS-BSA 1%) por 1 hora. Posteriormente ao bloqueio, 100 µL das amostras ou de solução contendo concentrações seriadas das amostras avaliadas foram pipetados em duplicata e incubados por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada para retirar o excesso das amostras, e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas com PBS/Tween20 0,05% e incubadas com solução reveladora (OPD) da atividade da peroxidase por mais 30 minutos. A reação foi, então, bloqueada com a adição de 50 µL de solução de bloqueio H₂SO₄ 2N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 492 nm em espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). As concentrações das amostras foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão através do software SOFTmax PRO 6.3 (Molecular Devices Corp.).

4.16 – Análise estatística

A análise estatística dos dados, bem como a elaboração dos gráficos, foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.). Os valores foram expressos como a média \pm EPM (erro padrão da média) e dois grupos foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05. O teste estatístico utilizado neste estudo foi *Test T* de Student.

5. Resultados

5.1 – A necrose hepática causa a substituição das células mononucleares residentes por infiltrado neutrofílico

Nosso primeiro passo foi validar o modelo de lesão hepática induzida por sobredose de APAP em nossas mãos. Para tanto, desafiamos camundongos com APAP (600 mg/Kg, via oral), um modelo já bem descrito na literatura de necrose hepática (Marques et al. 2012, Ramachandran and Jaeschke 2017, Hinson, Roberts and James 2010). Camundongos desafiados com APAP apresentaram lesão hepática de modo tempo-dependente, já detectável nas primeiras 6 horas após o desafio, como avaliado pelo aumento nos níveis séricos de ALT (**Figura 1A**). Ainda, análise histológica evidenciou o surgimento de necrose centrolobular (**Figura 1B**). Tanto a variação nos níveis séricos de ALT quanto os achados histológicos, evidenciam que a lesão hepática induzida pela sobredose de APAP ocorre de modo progressivo, atingindo o pico com 24 horas e, após esse momento, a lesão começa a regredir até que o tecido se recupere por completo com 72 horas.

A dose de 600 mg/Kg de APAP induziu uma taxa de mortalidade de 28% durante as primeiras 24 horas (**Figura 1C**) e, os animais que sobreviveram às primeiras 24 horas, permaneceram vivos até o final do protocolo experimental de mortalidade (7 dias). A análise da população de NPCs hepáticas, no período de 12 – 24 horas após a administração de APAP, confirmou um quadro inflamatório significativo no tecido hepático, como demonstrado pelo aumento no número total de leucócitos (~60%) que constituem as NPCs do fígado (**Figura 1D**). Nos animais do grupo controle, células mononucleares (macrófagos e monócitos) compreendem a maioria das células imunes hepáticas (~67%) (**Figura 1E**), enquanto linfócitos representam, aproximadamente, 30% das células imunes (**Figura 1F**). Ainda em animais saudáveis, neutrófilos correspondem a aproximadamente 3% das células imunes hepáticas (**Figura 1G**). No entanto, camundongos desafiados com APAP apresentaram um aumento robusto e tempo-dependente no número de neutrófilos no fígado (**Figura 1G**), com uma redução simultânea de 33% no número de células mononucleares (**Figura 1E**). Desse modo, durante o período entre 6 – 48 horas após o desafio com APAP, o ambiente imune hepático se alterou, passando de um ambiente

predominantemente mononuclear para granulocítico, como evidenciado pela elevada taxa polimorfonuclear/mononuclear (**Figuras 1H e 1I**). Após 72 horas da administração de APAP, o número de células não parenquimais retornou ao nível basal e, embora tenhamos observado uma drástica redução no infiltrado neutrofilico, ainda pudemos observar uma pequena, mas significativa, retenção dessas células no fígado (**Figura 1G**). Além disso, 72 horas após o desafio com APAP, observamos redução no número de linfócitos (**Figura 1F**), o que pode explicar, a despeito de ainda ter infiltrado de neutrófilos, a significativa redução no número de NPCs 72 horas após a administração de APAP (**Figura 1D**). Em conjunto, esses resultados demonstram que, apesar dos níveis séricos de ALT e achados histopatológicos retornarem ao nível basal 72 horas após o desafio com APAP, a recuperação completa do sistema imune hepático, aparentemente, demanda períodos maiores.

Para visualizar alterações hepáticas em um contexto fisiológico, nós submetemos os animais à microscopia intravital. Para tanto, os camundongos receberam uma injeção de solução salina 0,9% contendo albumina conjugada com fluoresceína, o que permite a visualização precisa do fluxo sanguíneo. Além disso, marcamos neutrófilos *in vivo* utilizando anticorpos anti-Ly6G conjugados a BV421 (200 µg/Kg, eBioscience, San Diego, CA, USA clone 1A8). Em condições fisiológicas, o fígado se apresentou amplamente perfundido e com uma pequena população de neutrófilos patrulhando o leito vascular (**Figura 1J**). Entretanto, 6 horas após o desafio com APAP, observamos grandes áreas sem perfusão e vários neutrófilos já acumulados no tecido hepático. Com o passar do tempo, observamos múltiplos pontos de acumulação de albumina no fígado, o que nos sugere se tratar de uma zona necrótica (**Figura 1J**). Da mesma forma que a análise diferencial das NPCs, o acúmulo de neutrófilos no tecido atingiu o pico com 24 horas (**Figura 1K**) e, apesar da redução significativa com 48 horas, ainda observamos grandes áreas de necrose como evidenciado pelo acúmulo de albumina (**Figura 1J**). 72 horas após o desafio com APAP, a perfusão hepática retornou ao seu nível basal (**Figura 1J**), o qual foi acompanhado pela diminuição no número de neutrófilos por campo (**Figura 1K**).

Em conjunto, esses dados nos sugerem que, durante a necrose hepática, profundas alterações ocorrem no fígado, incluindo a redução das células

mononucleares residentes que são rapidamente substituídas por um intenso recrutamento de neutrófilos para o tecido. Em animais que não morreram durante as primeiras 24 horas, a lesão hepática induzida pela sobredose de APAP foi auto resolutiva. A resolução da inflamação e o reparo tecidual, no entanto, ocorrem com a manutenção de neutrófilos no local, sugerindo que neutrófilos podem estar desempenhando alguma função, também, na resolução da inflamação e reparo do tecido hepático.

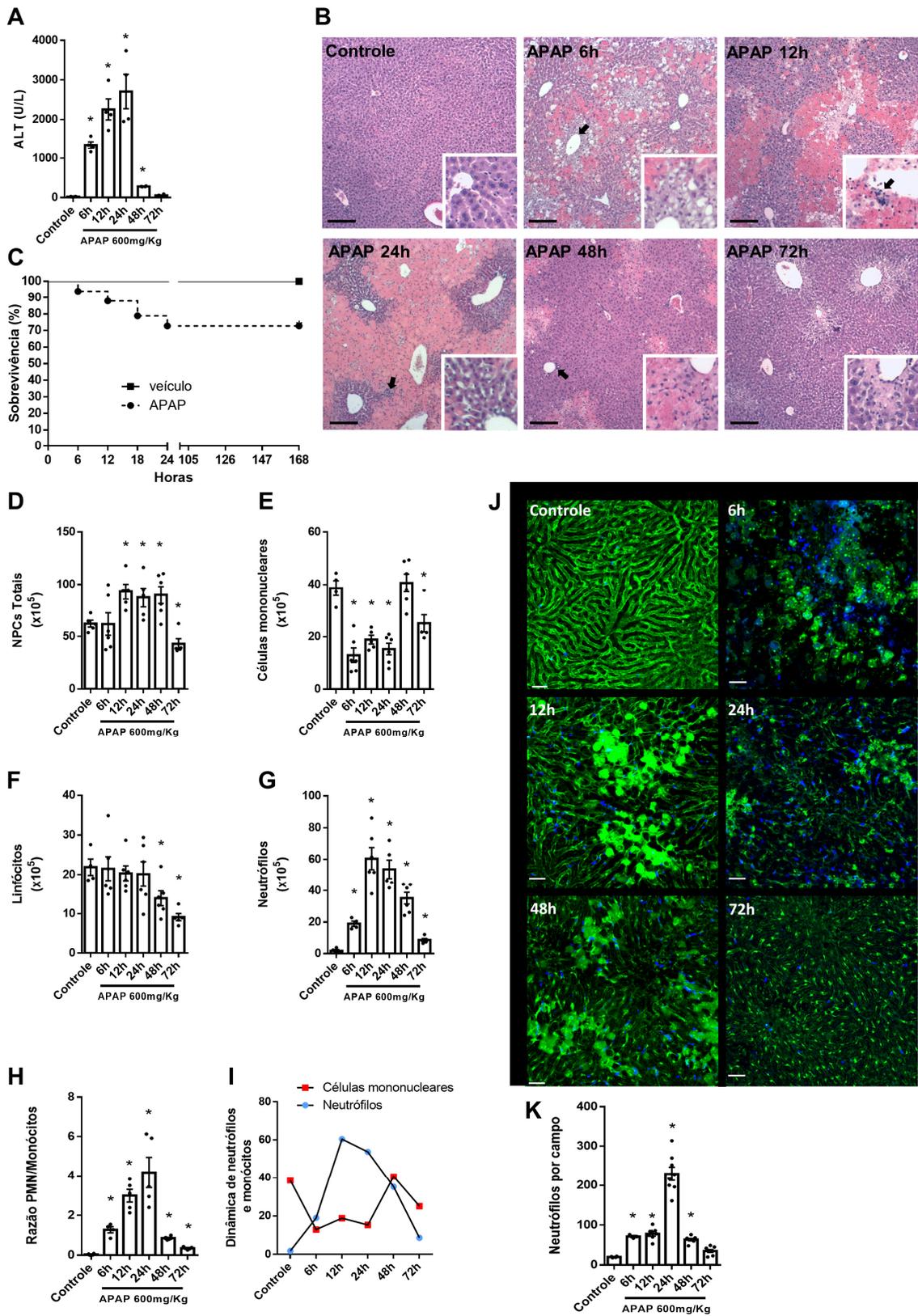


Figura 1: Lesão hepática induzida por APAP leva à substituição das células mononucleares por infiltrado neutrofílico. (A) ALT sérico. (B) Histologia do fígado

evidenciando inflamação perivascular (setas pretas), coloração por H&E; barra = 100 μ m. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 20X. **(C)** Curva de sobrevivência após o desafio com APAP (600 mg/Kg, n=30). **(D)** Contagem total de NPCs. Contagem diferencial de **(E)** células mononucleares, **(F)** linfócitos e **(G)** neutrófilos. **(H)** proporção de neutrófilos/células mononucleares. **(I)** representação esquemática da dinâmica de neutrófilos e células mononucleares no fígado em função do tempo. **(J)** IVM evidenciando o acúmulo de neutrófilos (em azul, anti Ly6G conjugado com BV421, clone 1A8, 200 μ g/Kg, i.v.) e fluxo sanguíneo hepático (verde, albumina conjugada com fluoresceína tiocianato, 12 mg/Kg). Objetiva de 20X; barra = 50 μ m. **(K)** quantificação do número de neutrófilos no tecido hepático por IVM (média de 10 campos por animal, n \geq 4). Resultados apresentados como média \pm SEM. *p < 0,05 comparado com controle.

5.2 – O egresso de células Ly6G⁺ da medula óssea suporta o tráfego de neutrófilos através do sangue até a sua infiltração no fígado durante as fases iniciais da necrose hepática

Enquanto neutrófilos constituem os leucócitos circulantes mais frequentes em humanos (~50%), camundongos possuem significativamente menos neutrófilos circulantes (~10%) (O'Connell et al. 2015). Portanto, enquanto é esperado que o *pool* de neutrófilos circulantes, em humanos, seja capaz de suportar o seu rápido recrutamento para o local do estímulo inflamatório, em camundongos, fontes alternativas de neutrófilos podem ser necessárias. Baseado nessa premissa, resolvemos investigar a dinâmica de neutrófilos em diferentes compartimentos do organismo (medula óssea, sangue e fígado) durante o curso da necrose hepática utilizando citometria de fluxo (**Figura 2A**). A análise por citometria de fluxo de células Ly6G⁺ revelou que, enquanto o número de neutrófilos aumenta no sangue (**Figura 2C**) e fígado (**Figura 2D**) durante as primeiras 6 horas após o desafio com APAP, nenhuma alteração foi observada na medula óssea (**Figura 2B**). No entanto, 12 - 24 horas após a administração de APAP, observamos uma diminuição significativa no número de neutrófilos na medula óssea (**Figura 2B**), ao mesmo tempo em que houve um pico significativo de neutrófilos na circulação periférica (**Figura 2C**) e no fígado (**Figura 2D**). Nos momentos mais tardios da lesão hepática (72 horas), a frequência de neutrófilos na medula óssea retornou para os níveis basais, o mesmo sendo observado nos demais compartimentos analisados.

Em conjunto, esses dados nos sugerem que diferentes fontes de neutrófilos podem existir durante a resposta imune à lesão hepática, sendo (i) uma primeira onda composta principalmente de neutrófilos circulantes e (ii) uma segunda onda compreendendo neutrófilos egressos da medula óssea.

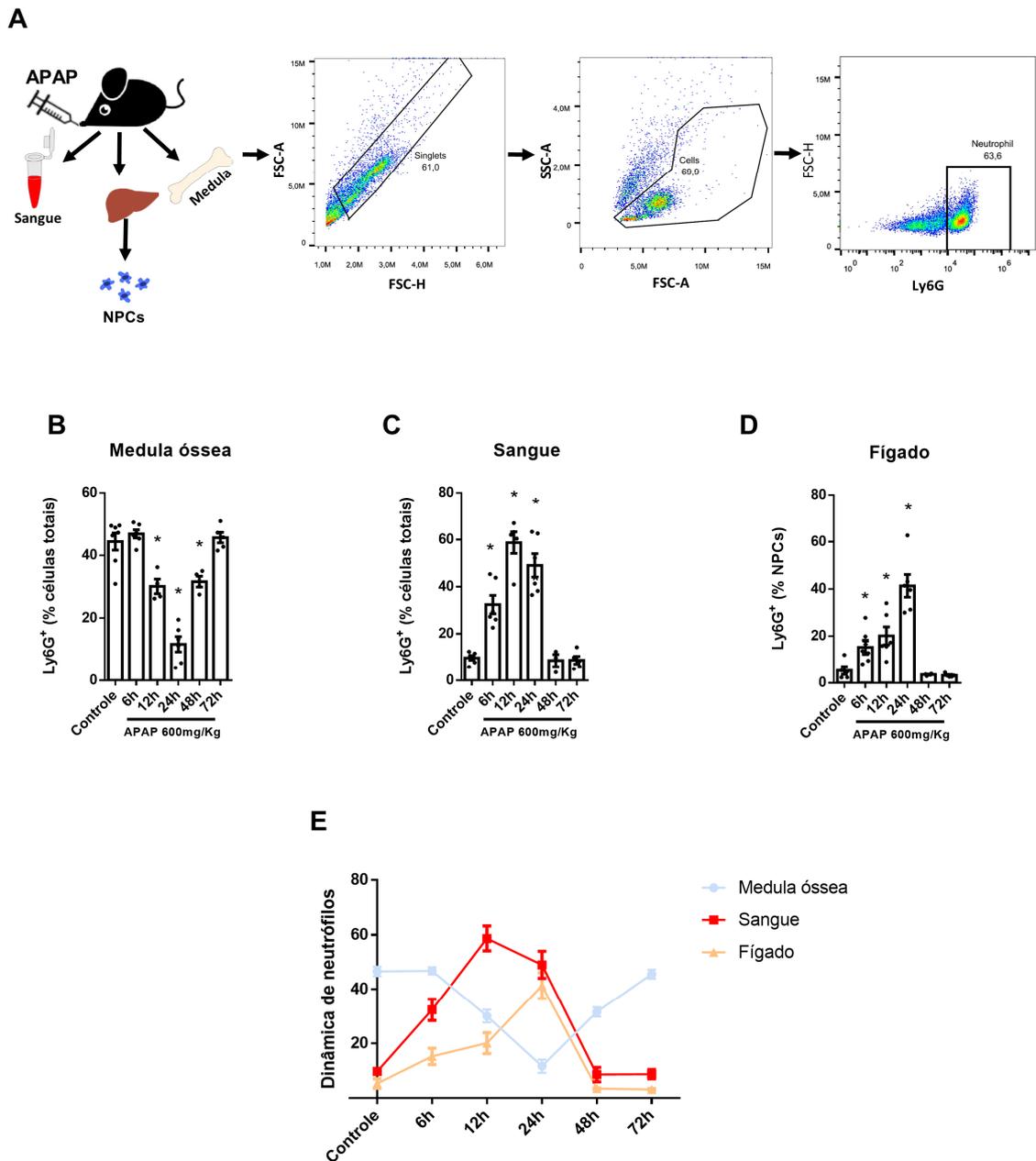


Figura 2: O egresso de células Ly6G⁺ da medula óssea, suporta o tráfego de neutrófilos através do sangue até a sua infiltração final no fígado durante as fases iniciais da necrose hepática. (A) representação esquemática do delineamento experimental e estratégia de *gate*. Citometria de fluxo para a avaliação da frequência de neutrófilos na (B) medula óssea, (C) sangue periférico e (D) fígado. (E) Dinâmica de neutrófilos em função de tempo na medula óssea, sangue e fígado. Resultados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com controle.

5.3 – A lesão hepática aguda induz alterações no perfil de expressão gênica em neutrófilos no fígado e em compartimentos remotos

A fim de mapear possíveis alterações no perfil imune dos neutrófilos em compartimentos remotos ao longo do curso da lesão hepática, purificamos neutrófilos Ly6G⁺ da medula óssea, sangue e fígado para posterior análise de expressão gênica (**Figura 3A**). Nós avaliamos genes cuja expressão podem potencializar vias pró-inflamatórias ou pró-resolutivas. Com essa abordagem, observamos que neutrófilos, ainda na medula óssea de animais que foram desafiados com APAP, apresentaram aumento significativo nos níveis de mRNA codificados por genes relacionados com vias pró-inflamatórias, incluindo *Cxcl1*, *Fpr1* e *Ltb4r1* (**Figura 3B**). A expressão do gene *Cxcr2*, no entanto, permaneceu inalterada, enquanto o gene *Alox5*, que codifica a enzima 5-Lipoxigenase, teve sua expressão diminuída de forma significativa durante todos os tempos avaliados (**Figura 3B**). Embora os genes *Tgfb* e *Fpr2* (um receptor de lipoxina A4 e anexina A1 que pode ter importância na resolução da resposta inflamatória) tiveram sua expressão aumentada durante todos os tempos, os demais genes pró-resolutivos avaliados, incluindo *Il1r2*, *Il1ra*, *Anxa1* e *Alox15* estavam regulados negativamente em neutrófilos da medula óssea (**Figura 3B**).

Em neutrófilos circulantes, no entanto, observamos um perfil de expressão gênica diferente do observado em neutrófilos na medula. A expressão dos genes *Fpr1* e *Ltb4r1*, em neutrófilos circulantes, apresentaram um padrão bifásico durante o curso da intoxicação por APAP, apresentando aumento entre 12 – 24 horas e retornando aos níveis basais com 48 horas (**Figura 3C**). Em contrapartida, os genes *Cxcl1*, *Cxcr2* e *Alox5* se mantiveram suprimidos durante todo o curso da lesão hepática (**Figura 3C**). Ainda em neutrófilos circulantes, os genes relacionados com a resolução da inflamação *Fpr2*, *Il1r2* e *Alox15* apresentaram pico de expressão entre 12 - 24 horas após a administração de APAP (**Figura 3C**). Os genes *Il1ra*, *Anxa1* e *Tgfb*, no entanto, permaneceram suprimidos ou com expressão inalterada durante todos os tempos analisados (**Figura 3C**).

Em conjunto, esses dados nos mostram que neutrófilos em compartimentos remotos são, sim, capazes de perceber a lesão hepática. Ainda, neutrófilos respondem a esse estímulo alterando o seu perfil transcricional de

modo a se adaptar ao momento atual do curso da lesão. Nesse sentido, por exemplo, todos os genes pró-inflamatórios analisados em neutrófilos circulantes, foram suprimidos a partir de 48 horas após o desafio com APAP.

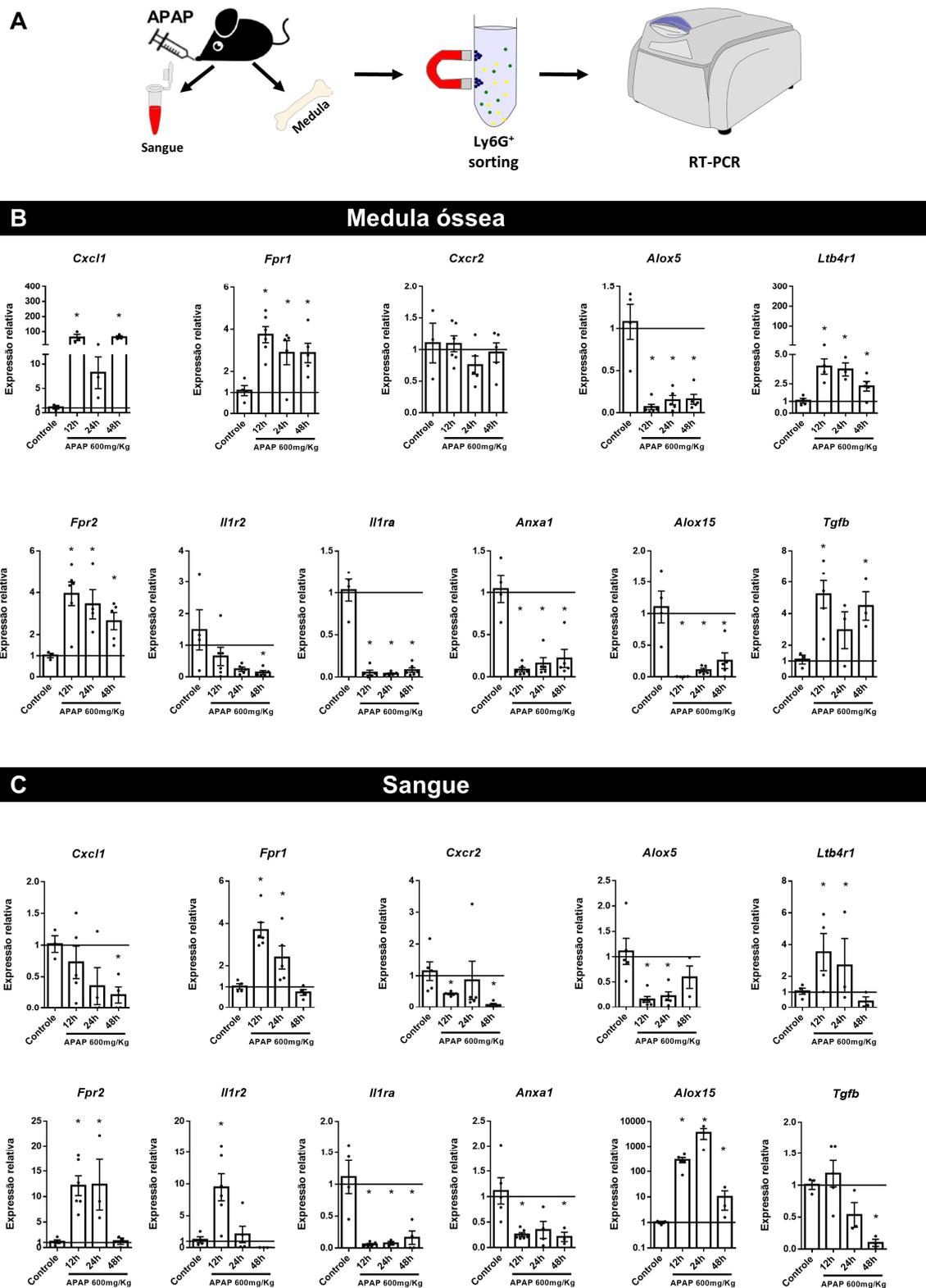


Figura 3: Avaliação da expressão gênica de neutrófilos extraídos da medula óssea e sangue periférico. (A) Representação esquemática do delineamento experimental. **(B)** Avaliação da expressão gênica de neutrófilos purificados da medula óssea ou **(C)** purificados do sangue periférico. Os dados estão representados como a média da expressão dos genes alvo em relação ao grupo controle ($\Delta\Delta CT$). Os dados foram

normalizados pela média geométrica dos CTs dos genes constitutivos *Actb* e *18s*. Resultados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com controle.

Em um claro contraste às alterações observadas nos neutrófilos extraídos da medula óssea e sangue, neutrófilos extraídos do fígado apresentaram um perfil de expressão gênica mais consistente durante o curso da lesão hepática. Enquanto os genes *Cxcl1* e *Fpr1* claramente permaneceram com expressão elevada até 48 horas após a administração de APAP (**Figuras 4B e 4C**), a expressão do gene *Cxcr2* permaneceu suprimida durante todo o curso da lesão (**Figura 4D**). Além disso, a expressão dos genes *Alox5* e *Ltb4r1*, apresentaram pico de expressão com 24h e 12h, respectivamente, retornando aos níveis basais 48 horas após o desafio com APAP (**Figuras 4E e 4F**). De modo consistente com a redução na expressão dos genes pró-inflamatórios, observamos que a expressão dos genes *Il1r2* (**Figura 4H**), *Il1ra* (**Figura 4I**) e *Tgfb* (**Figura 4L**), relacionados com a resolução da inflamação, se mantiveram elevados até 48 horas após a administração de APAP. A expressão dos genes *Fpr2* e *Anxa1* apresentaram um padrão bifásico, atingindo o pico de expressão entre 12 e 24 horas após a lesão e retornando aos níveis basais 48 horas após a administração de APAP (**Figuras 4G e 4J**). A expressão do gene *Alox15*, no entanto, permaneceu baixa durante todos os tempos avaliados (**Figura 4K**). Análise posterior da produção das proteínas CXCL1 (**Figura 4M**) e TGF- β (**Figura 4N**) por ELISA, utilizando amostras de fígado total, corroborou que os níveis de citocinas no tecido hepático apresentam dinâmica semelhante ao observado na expressão desses genes em neutrófilos.

Esses dados nos revelam que a resposta inflamatória no tecido hepático gera uma perturbação no perfil de expressão gênica de neutrófilos em compartimentos remotos e na circulação sanguínea. Além disso, uma vez no fígado, os neutrófilos parecem ser “educados” para um perfil pró-resolutivo em momentos tardios da inflamação, o que foi associado com a diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios e aumento na expressão de genes pró-resolutivos.

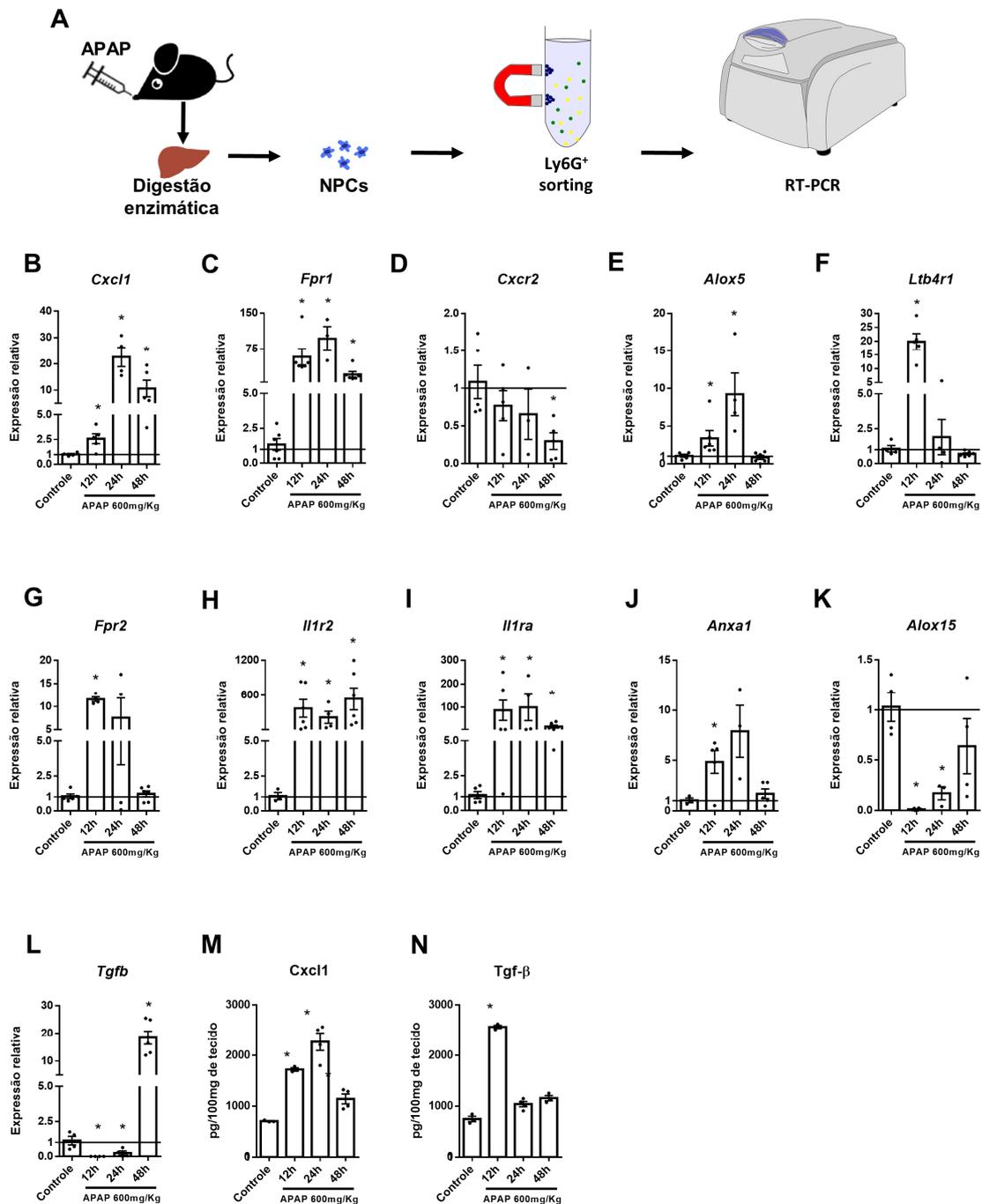


Figura 4: Avaliação da expressão gênica de neutrófilos extraídos do fígado ao longo da lesão hepática induzida por APAP. (A) Representação esquemática do delineamento experimental. PCR em tempo real dos genes (B) *Cxcl1*, (C) *Fpr1*, (D) *Cxcr2*, (E) *Alox5*, (F) *Ltb4r1*, (G) *Fpr2*, (H) *Il1r2*, (I) *Il1ra*, (J) *Anxa1*, (K) *Alox15* e (L) *Tgfb*. Os dados estão representados como a média da expressão dos genes alvo em relação ao grupo controle ($\Delta\Delta CT$). Os dados foram normalizados pela média geométrica dos CTs dos genes constitutivos *Actb* e *18s*. Níveis das proteínas (M) CXCL1 e (N) Tgf- β quantificadas por ELISA em 100 mg de fígado. Resultados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com controle.

5.4 – Neutrófilos que migram para o fígado após a necrose hepática permanecem viáveis durante todo o curso da resposta inflamatória

O destino dos neutrófilos que infiltram em tecidos sob estímulo inflamatório ainda permanece tema de debate na literatura. Embora seja bem aceito que os neutrófilos possam aumentar o seu tempo de vida após ativação, acredita-se, ainda, que essas células morrem no tecido logo após realizar seus mecanismos efetores. Por esse motivo, ações efetoras de longa duração não são comumente creditadas aos neutrófilos. Baseado nos nossos achados de que neutrófilos permanecem transcricionalmente ativos no tecido hepático até 3 dias após a lesão induzida por APAP, nós hipotetizamos que neutrófilos não morrem logo após realizarem sua função, mas, sim, permanecem viáveis por períodos mais longos. Para testar essa hipótese, nós avaliamos a frequência de neutrófilos viáveis, discriminando a porcentagem de neutrófilos que, por ventura, estivessem morrendo por necrose, apoptose ou apoptose tardia. Para tanto, neutrófilos foram extraídos do fígado em diferentes momentos da lesão hepática e marcados para necrose (iodeto de propídio (Pi⁺/Anexina V⁻), apoptose (Pi⁻/Anexina V⁺) e apoptose tardia (Pi⁺/Anexina V⁺) e analisados por citometria de fluxo.

Neutrófilos no fígado de camundongos desafiados com APAP apresentaram diminuição significativa na taxa de necrose (**Figura 5A**) e, embora nenhuma alteração significativa tenha sido observada na taxa de apoptose (**Figura 5B**), os neutrófilos apresentaram diminuição na morte por apoptose tardia (**Figura 5C**) nos momentos iniciais da inflamação. Surpreendentemente, mesmo em momentos mais tardios da resposta inflamatória (72 horas após o desafio com APAP), neutrófilos no tecido hepático permaneceram viáveis, apresentando baixas taxas de necrose quando comparado ao animal saudável (**Figura 5A**). Em contraste com o dogma prevalente, a porcentagem de neutrófilos presumivelmente vivos (aqueles que não estavam morrendo por nenhuma das vias analisadas) aumentou ao longo do curso da inflamação, permanecendo elevado até o último tempo analisado, 72 horas após o desafio, período em que a fase de resolução da inflamação já se iniciou (**Figura 5D**).

A remoção de neutrófilos por macrófagos, um processo denominado eferocitose, é fundamental para a manutenção da homeostase tecidual e um pré-

requisito para a resolução da inflamação. Portanto, a rápida remoção de neutrófilos por macrófagos e sua rápida substituição por ondas adicionais de neutrófilos chegando ao fígado, poderiam estar mascarando nossos resultados acerca da viabilidade dos neutrófilos. Para avaliar essa ressalva e evitar a possível eferocitose de neutrófilos no fígado, nós depletamos os macrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer. Para tanto, os animais receberam, por via intravenosa, uma injeção de solução contendo lipossomos de clodronato (CLL, 50 mg/Kg) 24 horas antes do desafio com APAP. Os experimentos foram realizados 24 horas após a administração de APAP totalizando, portanto, 48 horas de tratamento com CLL. A administração de CLL levou à depleção das células de Kupffer (**Figuras 5E e 5F**) e, mesmo na ausência de macrófagos, nenhuma alteração significativa na frequência de neutrófilos em apoptose, necrose ou apoptose tardia foi observada (**Figuras 5G-I**).

Esses dados reforçam nossa hipótese de que, uma vez que migraram para o fígado, os neutrófilos permanecem viáveis e transcricionalmente ativos podendo, portanto, atuar como efetores na resolução da inflamação e reparo tecidual.

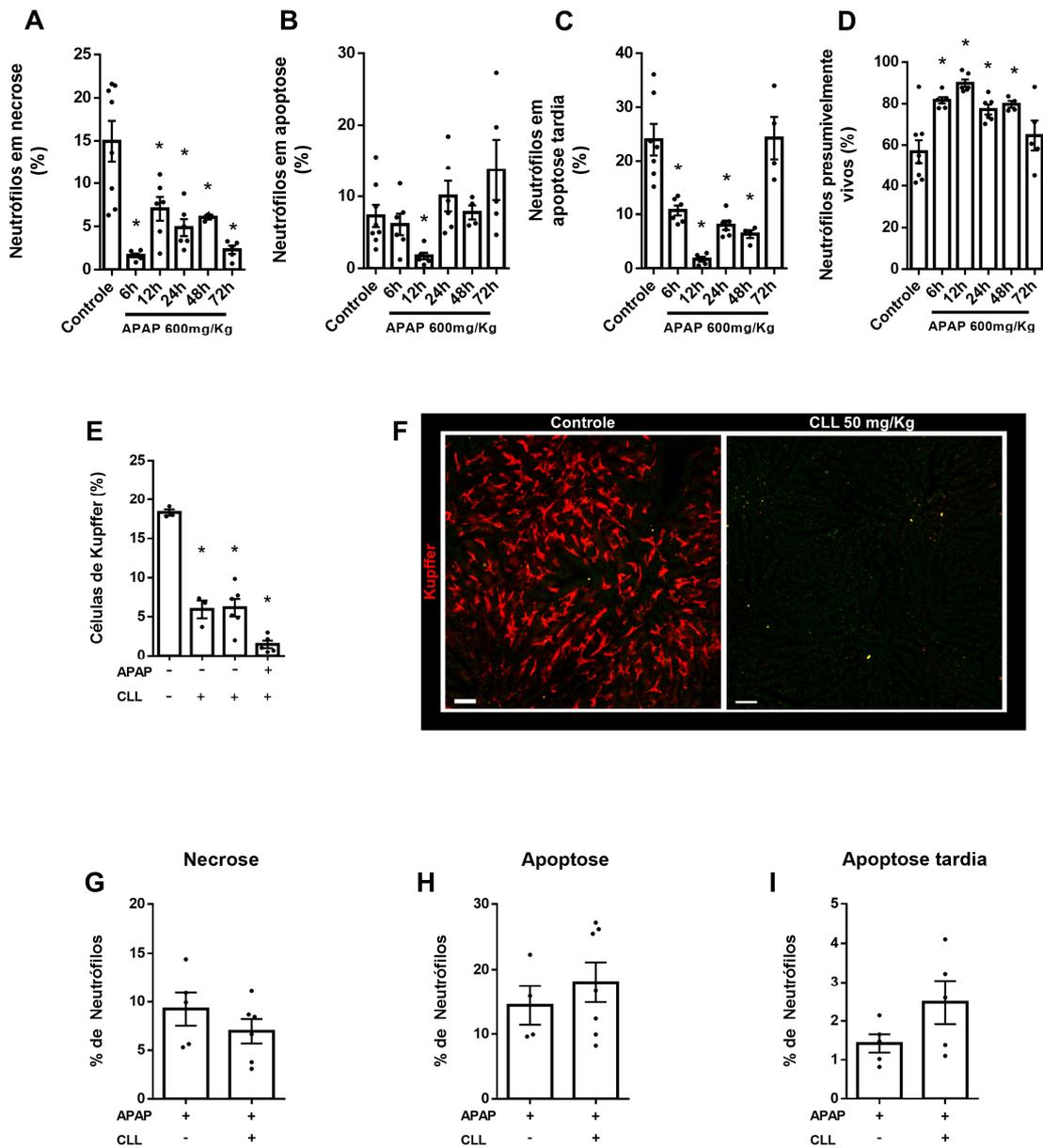


Figura 5: Neutrófilos permanecem viáveis no fígado durante todas as fases da lesão hepática induzida por APAP. Citometria de fluxo avaliando a proporção de neutrófilos (Ly6G⁺, clone 1A8) no fígado morrendo por **(A)** necrose (Ly6G⁺/Pi⁺/Anexina V⁻), **(B)** apoptose (Ly6G⁺/Pi⁺/Anexina V⁺) e **(C)** apoptose tardia (Ly6G⁺/Pi⁺/Anexina V⁺). **(D)** Proporção de neutrófilos presumivelmente vivos no fígado. **(E)** Avaliação da depleção de células de Kupffer (F4/80⁺), após a administração i.v. de lipossomos de clodronato (CLL, 50 mg/Kg), por citometria de fluxo. **(F)** Microscopia intravital do fígado de camundongos controle ou tratados com CLL evidenciando a depleção de células de Kupffer (vermelho, F4/80⁺). Citometria de fluxo avaliando a proporção de neutrófilos em **(G)** necrose, **(H)** apoptose ou **(I)** apoptose tardia em camundongos tratados com CLL, 24 horas após a administração de APAP. Resultados apresentados como média ± SEM. *p < 0,05 comparado com controle. Barra = 50 µm

5.5 – Neutrófilos acumulam preferencialmente dentro das zonas de necrose e patrulham hepatócitos mortos

Uma vez que estabelecemos que os neutrófilos continuam vivos dentro do fígado necrótico, nosso próximo passo foi visualizar a dinâmica de comportamento dos neutrófilos, *in vivo*. Para tanto, os animais foram submetidos à microscopia confocal intravital (IVM). IVM é uma técnica de ponta para o estudo da resposta imune, uma vez que ela nos permite avaliar o comportamento, alterações morfológicas e interações célula-célula, simultaneamente, em tempo real e em um contexto fisiológico. Para visualizar o comportamento dos neutrófilos nas zonas de necrose, realizamos a administração intravenosa de uma solução, 0,1 mL, contendo anticorpo anti-Ly6G conjugado à BV421 (200 µg/Kg), para marcar neutrófilos e iodeto de propídio (200 µg/Kg) diluídos em salina.

Consistente com nossos achados bioquímicos (ALT sérica), a análise por microscopia intravital confirmou que a lesão hepática induzida por APAP ocorre de modo tempo-dependente. Ainda, como demonstrado na **Figura 6**, a maioria dos neutrófilos se acumula preferencialmente nas regiões de necrose e, em nenhum dos tempos avaliados, observamos a presença de neutrófilos positivos para iodeto de propídio, o que corrobora nossa análise de morte de neutrófilos por citometria de fluxo (**Figura 6**). Através de uma reconstrução em três dimensões, observamos que os neutrófilos não apenas estão na região necrótica, mas, sim, rapidamente circundam os hepatócitos mortos e se posicionam de maneira estratégica, estabelecendo contato direto com os hepatócitos necróticos (**Figuras 7A e 7B**).

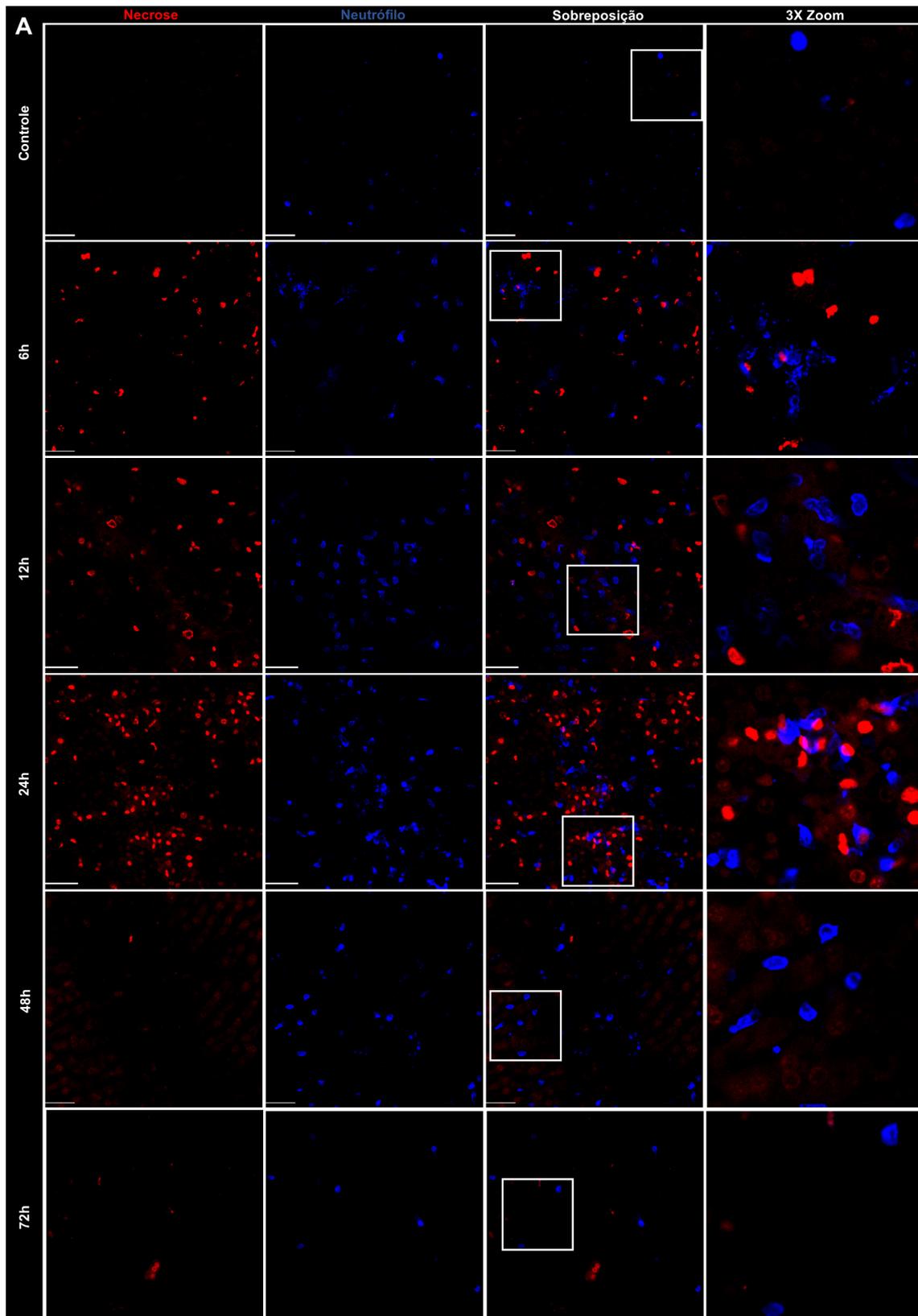


Figura 6: Microscopia intravital das zonas necróticas no fígado após lesão induzida por sobredose de APAP. Neutrófilos foram marcados com anticorpos anti-Ly6G conjugado à BV421 (azul, 200 µg/Kg). Zonas de necrose foram marcadas com iodeto de propídio (vermelho, 200 µg/Kg). Imagens foram obtidas utilizando a objetiva

de 40X. Quadrados brancos indicam a área em que foi amplificado (3 vezes de aumento). Barra = 50 μ m. Imagens representativas de experimento realizado com 4 animais por tempo analisado.

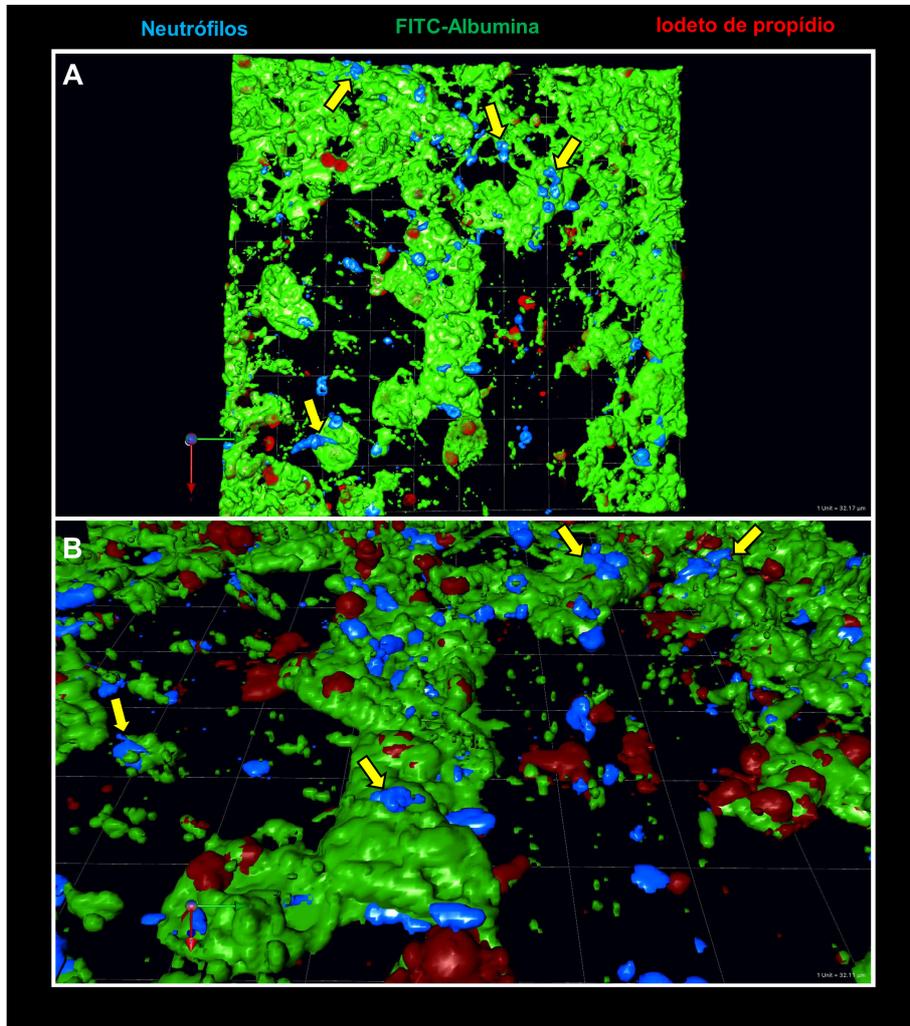
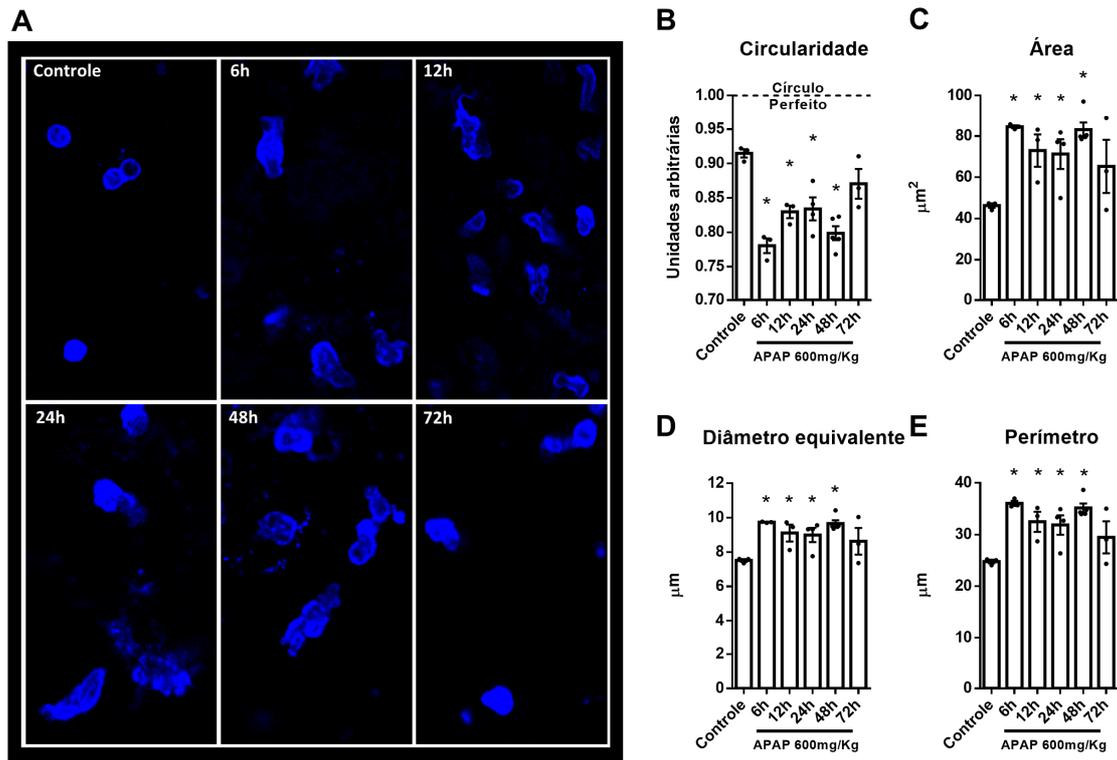


Figura 7: Neutr3filo localiza-se estrategicamente em contato direto com hepat3citos em necrose. Microscopia confocal intravital em tr3s dimens3es do f3gado 12 horas ap3s administra33o de APAP. Vis3o de cima (A) e vis3o lateral (B). Setas indicam neutr3filos em contato com hepat3citos. Neutr3filos foram marcados com anticorpos anti-Ly6G conjugado 3 BV421 (azul, 200 μ g/Kg). Zonas de necrose foram marcadas com iodeto de prop3dio (vermelho, 200 μ g/Kg). Em verde, ac3mulo de albumina conjugada com fluoresce3na tiocianato (12 mg/Kg) dentro de hepat3citos em necrose.

Também por microscopia intravital, avaliamos o comportamento dos neutrófilos nas áreas de necrose. Para tanto, filmamos e fizemos o rastreamento desses neutrófilos por até 4 horas em cada tempo experimental, avaliando alterações morfológicas e comportamentais. Observamos que neutrófilos patrulham ativamente os hepatócitos mortos. Esse comportamento dos neutrófilos causa uma profunda alteração em sua morfologia ao longo do tempo (**Figura 8A**). Neutrófilos dos animais controle apresentaram morfologia arredondada, com maiores valores de circularidade (0,9 em média, sendo 1,0 um círculo perfeito). Entretanto, a morfologia dos neutrófilos se altera drasticamente durante a lesão hepática, tornando-se menos circular (**Figura 8B**) e mais espalhada, gerando um aumento na sua área (**Figura 8C**), diâmetro (**Figura 8D**) e perímetro (**Figura 8E**). Ainda, realizamos o rastreamento digital, individual, de cada neutrófilo dentro da área de necrose hepática. Pudemos observar que, enquanto alguns neutrófilos migram por longas distâncias, outros neutrófilos percorriam uma distância menor e realizando movimentos em zigue-zague (**Figura 8F**).

Essa multiplicidade de comportamento sugere que podem haver neutrófilos em diferentes estágios de ativação, o que pode estar associado com a sua localização dentro dos compartimentos hepáticos (intravascular ou dentro do parênquima necrosado).

Neutrophil Morphology



Comportamento dos neutrófilos

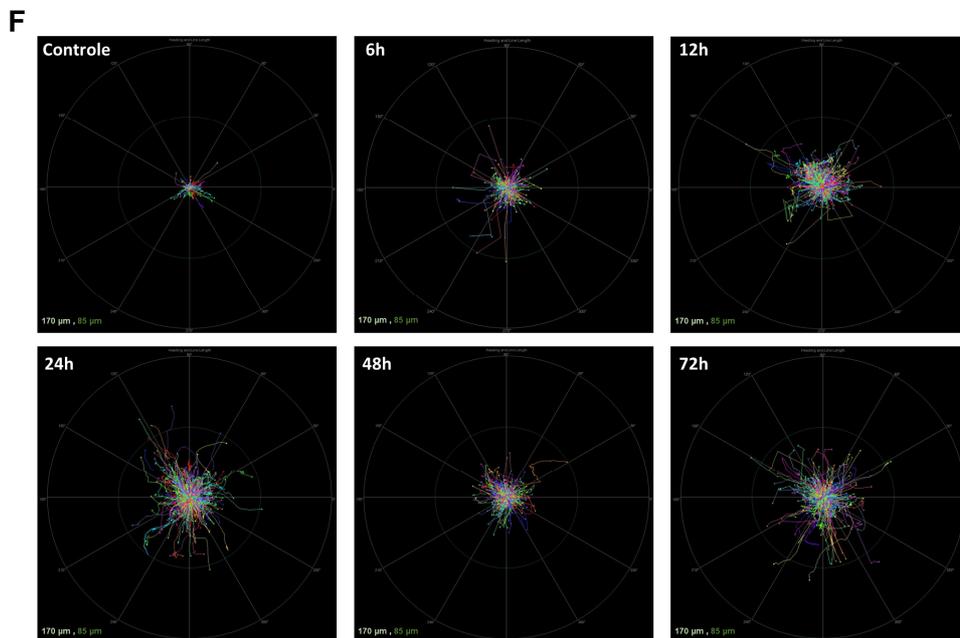


Figura 8: Análise da morfologia e comportamento dos neutrófilos dentro das áreas de necrose. (A) Morfologia dos neutrófilos, visualizada por microscopia intravital, marcados com anticorpos anti-Ly6G conjugado à BV421 (azul, 200 µg/Kg) durante o curso da lesão hepática induzida por sobredose de APAP. Quantificação da morfologia dos neutrófilos, avaliando a (B) circularidade, (C) área, (D) diâmetro equivalente e (E)

perímetro. **(F)** *Tracking* dos neutrófilos dentro das zonas de necrose evidenciando direção de movimento e a distância percorrida. Resultados apresentados como média \pm SEM. *p < 0,05 comparado com controle. Os vídeos gerados podem ser encontrados no seguinte endereço (<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.1MA0420-634R>).

5.6 – Transferência adotiva de neutrófilos hepáticos extraídos no momento da resolução da resposta inflamatória, induz redução da inflamação e dano tecidual

Considerando que neutrófilos hepáticos alteram seu perfil transcricional de pró-inflamatório para pró-resolutivo durante o curso da lesão hepática aguda, nos perguntamos se a transferência adotiva desse neutrófilos com perfil transcricional pró-resolutivo (aqui denominados de “RN”) para camundongos no início da lesão hepática induzida por APAP, poderia diminuir tanto a resposta inflamatória quanto o dano tecidual. Para esse propósito, nós extraímos neutrófilos do fígado de camundongos 72 horas após o desafio com APAP, momento no qual detectamos expressão elevada dos genes *Tgfb* (**Figura 9A**) e *Fpr2* (**Figura 9B**) (pró-resolutivos), assim como a redução na expressão de genes pró-inflamatórios como, por exemplo, *Cxcl1* (**Figura 9C**) e *Ltb4r1* (**Figura 9D**). Da mesma forma, observamos redução na produção das proteínas Cxcl1 e Tgf- β em amostras de fígado total nesse período (**Figuras 9E e 9F**). Após a extração, transferimos 5×10^4 neutrófilos, por via intravenosa, para camundongos 6 horas após a administração de APAP. Escolhemos esse tempo de 6 horas, pois é quando a necrose hepática tem início e quando os primeiros neutrófilos começam a migrar para o fígado (**Figura 1**) (Marques et al. 2015, Alvarenga et al. 2018b). Como controle dessa técnica, nós extraímos neutrófilos de camundongos saudáveis (esse neutrófilos foram denominados aqui como N0), e os transferimos para camundongos desafiados com APAP sob as mesmas condições mencionadas anteriormente.

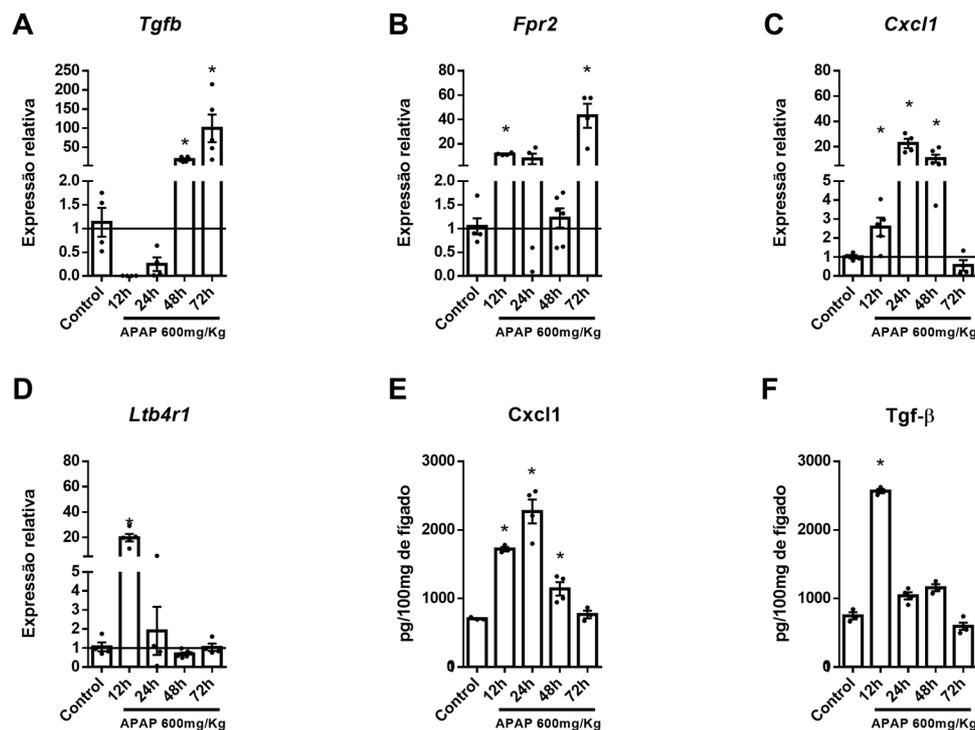


Figura 9: Avaliação do perfil transcricional de neutrófilos até 72 horas após APAP.

Os níveis de proteínas foram medidos por ELISA em 100 mg de fígado. RT-PCR de neutrófilos extraídos do fígado avaliando a expressão dos genes **(A)** *Tgfb*, **(B)**, *Fpr2*, **(C)**, *Cxcl1* e **(D)** *Ltb4r1*. Avaliação da produção das proteínas **(E)** *Cxcl1* e **(F)** *Tgf-β*, por ELISA, de amostras de fígado total. Resultados apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado com controle. Os dados estão representados como a média da expressão dos genes alvo em relação ao grupo controle ($\Delta\Delta CT$). Os dados foram normalizados pela média geométrica dos CTs dos genes constitutivos *Actb* e *18s*.

Com esses experimentos, observamos que a transferência de RN, mas não a de N0, reduziu de forma significativa a lesão hepática aguda induzida por APAP **(Figura 10A)**. Além disso, camundongos que receberam N0, a despeito dos que receberam RN, apresentaram aumento significativo na disfunção hepática, como avaliado pela taxa de depuração do verde de indocianina **(Figura 10B)**. De fato, camundongos que receberam RN apresentaram menor expressão dos genes *Cxcl1* **(Figura 10C)** e aumento na expressão dos genes *Il10* **(Figura 10D)** e *Anxa1* **(Figura 10E)**. Além disso, a transferência de N0 induziu redução significativa na expressão do gene *Il6* **(Figura 10F)** (uma citocina pró-mitótica para hepatócitos) e *Il10* (uma citocina com potente efeito anti-inflamatório),

enquanto animais que receberam RN apresentaram níveis semelhantes aos animais controle.

Esses resultados nos fornecem fortes evidências de que os neutrófilos, além de permanecerem viáveis e transcricionalmente ativos, podem orquestrar ativamente a resolução da inflamação e, conseqüentemente, o reparo tecidual.

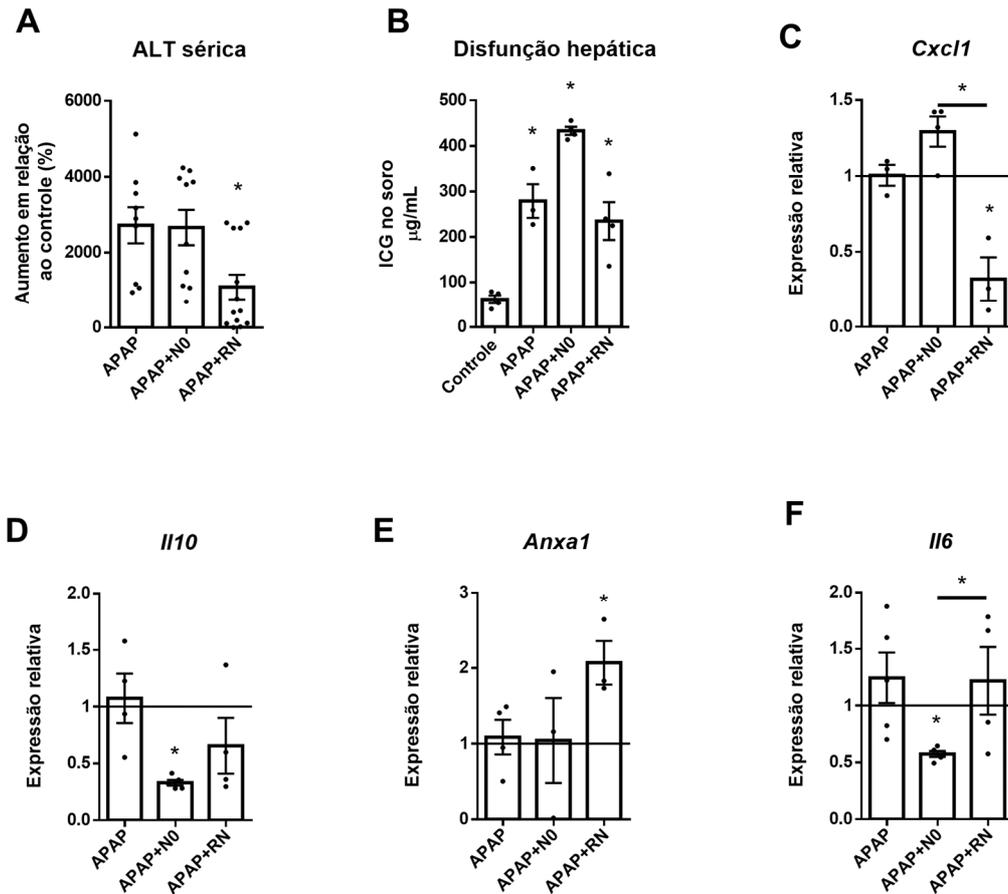


Figura 10: Transferência aditiva de neutrófilos resolutivos induz a redução da inflamação e lesão hepática. (A) Níveis de ALT no soro. (B) Taxa de depuração do verde de indocianina. RT-PCR dos genes (C) *CXCL1*; (D) *Il10*; (E) *Anxa1* e (F) *Il6*. Os dados são estão representados como a média da expressão dos genes alvo em relação ao grupo controle ($\Delta\Delta\text{CT}$). Os dados foram normalizados pela média geométrica dos CTs dos genes constitutivos *Actb* e *18s*.

5.7 – Sumário dos resultados

Diante dos resultados obtidos, podemos sumarizar:

- i) A necrose hepática induzida pela sobredose de APAP altera a população de células mononucleares residentes do fígado por infiltrado de neutrófilos. A lesão hepática é auto resolútiva, e cursa com a manutenção de neutrófilos no tecido durante todo o processo.
- ii) Neutrófilos que chegam ao fígado são recrutados de duas fontes diferentes: uma primeira onda composta por neutrófilos circulantes e uma segunda onda de células liberadas da medula óssea.
- iii) Neutrófilos, ainda na medula óssea e na circulação sistêmica, percebem a lesão hepática e alteram seu perfil de expressão gênica de forma coincidente com o momento da lesão. Uma vez no fígado, neutrófilos podem ser educados para um perfil pró-resolutivo, o que é associado com a supressão de genes pró-inflamatórios, coincidente com o tônus regulatório observado no fígado nos momentos tardios da lesão hepática.
- iv) Neutrófilos que são recrutados para o fígado após a necrose de hepatócitos, permanecem viáveis e transcricionalmente ativos durante todas as fases da resposta inflamatória, podendo ter papel fundamental no reparo do órgão.
- v) Uma vez no fígado, neutrófilos se acumulam preferencialmente dentro das zonas necróticas, patrulhando ativamente e em contato direto com hepatócitos mortos.
- vi) A transferência adotiva de neutrófilos resolutivos hepáticos, leva a redução da inflamação e da lesão no fígado induzida pela sobredose de APAP.

6. Discussão

Neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea de humanos (Summers et al. 2010), sendo considerados como uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos e, dessa forma, um dos pilares da imunidade inata (Phillipson and Kubes 2011). A lesão hepática induzida pela sobredose de APAP ocorre com a morte por necrose oncótica dos hepatócitos, resultando na liberação do conteúdo intracelular no tecido que, agora, atua como DAMPs (Gujral et al. 2002). Dessa forma, citocinas e quimiocinas, juntamente com produtos intracelulares e mitocondriais, atuam na ativação e recrutamento de neutrófilos para o fígado (Marques et al. 2012). Em um trabalho recente do nosso grupo, demonstramos que a presença dos neutrófilos no tecido hepático são essenciais para permitir o rápido reparo do tecido após lesão induzida pela sobredose de APAP (Alvarenga et al. 2018b). Este presente trabalho se insere nesse contexto, visando expandir nossos resultados prévios e investigar qual a participação dos neutrófilos em todo o curso da inflamação hepática induzida pela sobredose de APAP, buscando compreender melhor (i) o papel dos neutrófilos no ambiente necrótico; (ii) caracterizar o comportamento dos neutrófilos na lesão; (iii) determinar a dinâmica de expressão gênica dos neutrófilos e (iv) investigar quais os mecanismos que regem os efeitos pró-resolutivos dos neutrófilos na inflamação hepática.

Nós demonstramos que a dinâmica do acúmulo de neutrófilos e a progressão da lesão hepática ocorrem de forma quase que simultânea, o que poderia sugerir um papel dos neutrófilos na amplificação da lesão tecidual. No entanto, nos animais que sobrevivem às primeiras 24 horas, a lesão hepática induzida por APAP é auto resolutiva, ainda que neutrófilos permaneçam no local da lesão durante todo o processo. A presença de neutrófilos na lesão hepática induzida por sobredose de APAP foi reportada pela primeira vez em 1973 (Mitchell et al. 1973) e, um trabalho subsequente, sugeriu que o neutrófilo possui papel na amplificação da lesão hepática (Liu et al. 2006). No entanto, os efeitos benéficos associados à depleção de neutrófilos nesse estudo (utilizando anticorpos anti-GR1) podem ser atribuídos a efeitos não relacionados com a diminuição no número de neutrófilos mas, sim, a elevação nos níveis de metalotioneínas, uma proteína rica em resíduos de cisteína que, por esse motivo,

pode atuar na inativação do NAPQI, de modo semelhante a N-acetil cisteína ou a própria glutathione (Jaeschke 2006). Portanto, a contribuição dos neutrófilos na amplificação da lesão tecidual, bem como no reparo do tecido, ainda permanece uma questão de grande debate e, por isso, merece uma investigação mais aprofundada.

Neutrófilos são células altamente diferenciadas da linhagem mieloide, produzidas diariamente em grande quantidade na medula óssea e liberadas na circulação, através do qual podem migrar para os tecidos em resposta a uma diversidade de estímulos inflamatórios (Ley et al. 2018). Neste trabalho, demonstramos que essa dinâmica de recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático ocorre de forma tempo-dependente, de modo que o pico de migração dos neutrófilos para o fígado ocorre 24 horas após o desafio com APAP, momento no qual ocorre queda de, aproximadamente, 10 vezes na porcentagem de neutrófilos na medula óssea. Portanto, ondas adicionais de neutrófilos que chegam ao fígado estão sendo recrutados da medula óssea. No nosso modelo murino de lesão hepática induzida por APAP, essa alta demanda de neutrófilos pelo fígado sobrecarrega a medula óssea, provavelmente, porque camundongos possuem porcentagem muito menor de neutrófilos circulantes (~10% dos leucócitos) quando comparados a humanos (~70% dos leucócitos). Dessa forma, camundongos possuem significativamente menos neutrófilos que podem ser prontamente recrutados da circulação e dependem extensivamente do fornecimento de neutrófilos pela medula óssea.

Uma vez no fígado, os neutrófilos apresentaram um perfil de expressão gênica dinâmico, se alterando de forma tempo-dependente e coordenada com o momento da lesão hepática. Nesse sentido, nos momentos iniciais da resposta inflamatória, os neutrófilos apresentaram aumento na expressão de genes relacionados com sua migração e ações pró-inflamatórias (*Fpr1*, *Ltb4r1*, *Cxcl1* e *Alox5*). O receptor de leucotrieno B4, *Ltb4R1*, cuja expressão teve pico com 12 horas, é importante para os passos iniciais de recrutamento dos neutrófilos para o local do estímulo inflamatório (Oyoshi et al. 2012). De encontro a esse achado, identificamos aumento significativo na expressão do gene *Alox5* também com 12 horas. *Alox5* codifica a enzima 5-lipoxigenase, cujo principal produto é o leucotrieno B4. A expressão do gene *Cxcl1* também teve aumento significativo

com 12 horas e se manteve elevada durante todos os tempos analisados. CXCL1 é o homólogo funcional do CXCL8 em humanos e é a principal quimiocina envolvida na quimiotaxia de neutrófilos murinos (Sawant et al. 2016). Portanto, o aumento da expressão do gene *Cxcl1* nos momentos iniciais, provavelmente está relacionado ao recrutamento de ondas adicionais de neutrófilos para o fígado. A produção elevada de CXCL1 nos momentos tardios pode estar envolvida com a formação de novos vasos na área de lesão. Já é bem descrito que neutrófilos podem atuar na angiogênese produzindo quimiocinas ELR⁺ que podem estimular a formação de novos vasos pela ativação de receptores CXCR2 em células endoteliais (Heidemann et al. 2003, Addison et al. 2000, Benelli et al. 2002). O receptor de peptídeo formilado, FPR1, é particularmente importante para a migração de neutrófilos em direção a área da lesão induzida pela sobredose de APAP. Isso se deve ao fato de que, o excesso de NAPQI, leva à perda da integridade da membrana mitocondrial e ocorre a liberação de peptídeos formilados derivados dessas mitocôndrias que atuam na quimiotaxia de neutrófilos (Marques et al. 2012). O aumento na expressão de FPR1 em neutrófilos, portanto, está de acordo com achados prévios que demonstram que neutrófilos, quando estão dentro de um raio de 150 µm de distância da necrose, alteram seu mecanismo quimiotático, passando a seguir o gradiente de peptídeo formilado em detrimento do gradiente de quimiocinas (McDonald et al. 2010).

Nos momentos tardios da lesão, os neutrófilos hepáticos alteraram seu perfil transcricional, de modo que não apenas diminuíram a expressão dos genes pró-inflamatórios, como, também, aumentaram a expressão de genes pró-resolutivos. Observamos aumento progressivo na expressão do gene que codifica anexina A1 em neutrófilos hepáticos, o que poderia indicar a produção *in situ* desse mediador pró-resolutivo, além de já ser descrito que neutrófilos possuem grande quantidade de anexina A1 estocada em seus grânulos terciários (Perretti et al. 2000). Anexina A1 atua na inibição da atividade da fosfolipase A2, reduzindo a produção de eicosanóides, além de inibir, também, a atividade da COX-1 e COX-2 (McArthur et al. 2015). Além de reduzir a migração de ondas adicionais de leucócitos, anexina A1 aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos, regula a liberação de TNF e IL-6 por essas células, reduz a degranulação de mastócitos e, através do seu receptor FPR2, induz

apoptose de neutrófilos (Jones et al. 2016). Anexina A1, ainda, promove o recrutamento de monócitos circulantes, sem causar a sua total ativação. Esse processo ocorre através de uma cascata de sinalização centrada na produção de ácido lisofosfatídico. Esse processo favorece a remoção de células apoptóticas e levam ao repovoamento dos macrófagos teciduais devido à diferenciação desses monócitos (McArthur et al. 2015).

Identificamos um pico na expressão do gene que codifica a proteína FPR2, receptor para mediadores lipídicos pró-resolutivos e anexina A1 (Maderna et al. 2010). Como já mencionado, a ligação da anexina A1 ou lipoxina A4 ao receptor FPR2, em neutrófilos, induz a apoptose dessas células. A morte dos neutrófilos por apoptose é um evento chave na resolução da inflamação. À medida que o neutrófilo morre por apoptose, ele ainda expressa seus receptores de membrana, mas a sua capacidade de ativar uma cascata de sinalização intracelular após a interação desse receptor com seu ligante diminui consideravelmente (Jones et al. 2016). Desse modo, esses receptores de quimiocinas e citocinas, agora, passam a atuar como uma espécie de receptores atípicos, realizando a depuração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Jones et al. 2016). Ainda, na fase resolutiva da resposta inflamatória, neutrófilos apresentaram aumento na expressão do gene que codifica TGF- β , citocina que está envolvida no reparo tecidual (Border and Ruoslahti 1992). Portanto, fornecemos evidências de que neutrófilos podem participar ativamente da resolução da resposta inflamatória no fígado através da produção de mediadores pró-resolutivos, além de ter papel importante no reparo tecidual através da produção de TGF- β .

Demonstramos, também, que neutrófilos elevam de forma acentuada, já nas primeiras 12 horas, a expressão do gene que codifica o receptor atípico de IL-1, IL1R2, bem como a do gene que codifica IL1Ra, um antagonista solúvel do receptor clássico de IL-1. Já é descrito na literatura que tanto neutrófilos murinos quanto o de humanos expressam constitutivamente o receptor IL1R2, responsável por fazer a depuração de IL-1 β e IL-1 α (Bourke et al. 2003, Martin et al. 2013). Também já é descrito que neutrófilos podem produzir IL1Ra (Malyak et al. 1994). Desse modo, nossos resultados vão de encontro à literatura e sugerem que neutrófilos recrutados para o fígado, além de produzir e secretar

mediadores pró-resolutivos, podem, também, atuar ativamente na depuração de mediadores pró-inflamatórios como, por exemplo, controlando o efeito da IL-1 β e IL-1 α , realizando sua depuração e antagonizando o receptor clássico IL-1R1.

A necrose hepática aguda leva a liberação de uma diversidade de moléculas intracelulares que atuam como DAMPs, além da produção de uma miríade de citocinas e quimiocinas (Marques et al. 2012). Nós hipotetizamos que, devido ao abundante ambiente vascular do fígado, essas moléculas podem atingir a circulação sistêmica em níveis elevados o suficiente para se difundirem até compartimentos remotos, incluindo a medula óssea, e serem percebidas por neutrófilos nesses locais. Nesse sentido, demonstramos que neutrófilos, tanto na medula óssea quanto aqueles que já alcançaram a circulação sistêmica, são capazes, sim, de perceber a lesão hepática e alterar sua expressão gênica em resposta a esse estímulo.

Com essa abordagem, observamos que neutrófilos, ainda na medula óssea e na circulação sistêmica, aumentam a expressão dos genes *Fpr1* e *Ltb4r1* nos momentos iniciais da lesão hepática. A expressão desses genes, como já mencionado, será importante para o recrutamento de neutrófilos em direção à lesão hepática. Também observamos aumento significativo na expressão do gene *Alox15* e diminuição da expressão do gene *Alox5* em neutrófilos circulantes no período entre 12-24 horas após o desafio com APAP. Neutrófilos circulantes, principalmente no momento em que entram em contato com células endoteliais para iniciar o processo de transmigração, podem ser expostos a agentes autacoides (prostaglandina E₂, por exemplo) que induzem redução na expressão do gene *Alox5* e aumenta a expressão do gene *Alox15* (Levy et al. 2001). Os genes *Alox5* e *Alox15* codificam as enzimas 5-Lipoxigenase e 15-Lipoxigenase, respectivamente. O aumento na expressão da 15-lipoxigenase em detrimento da 5-lipoxigenase resulta na alteração dos produtos derivados do ácido araquidônico, de modo que reduz a produção de leucotrienos e prostaglandinas (mediadores pró-inflamatórios) e aumenta a produção de lipoxinas (mediadores pró-resolutivos). Lipoxinas inibem o recrutamento adicional de neutrófilos através da sua interação com receptor FPR2 (Fierro et al. 2003) e favorecem a eferocitose de neutrófilos por macrófagos residentes (Godson et al. 2000). Nesse sentido, demonstramos que

neutrófilos ainda na medula e neutrófilos que alcançaram a circulação apresentam aumento significativo na expressão do gene que codifica o receptor FPR2. Esses dados nos sugerem que os neutrófilos já transmigram para o fígado com toda a informação necessária para a produção conjunta de FPR2 e lipoxinas, que podem agir de modo parácrino em neutrófilos na área de necrose em uma tentativa de regular seus próprios mecanismos efetores pró-inflamatórios. Também observamos aumento na expressão do gene *Il1r2* em neutrófilos circulantes 12 horas após a intoxicação por APAP. A expressão elevada de tais genes relacionados com a modulação da resposta inflamatória em momentos iniciais da lesão, podem indicar que ondas adicionais de neutrófilos que migram para o fígado, já chegam comprometidos em diminuir a resposta inflamatória e orquestrar a resolução da inflamação.

Dessa forma, uma vez que novos neutrófilos são recrutados para o fígado de modo tempo-dependente, é razoável admitirmos que cada onda adicional de neutrófilos que chegam ao tecido, encontrará contextos inflamatórios diferentes. Com essa perspectiva, o neutrófilo deveria chegar ao local do estímulo inflamatório e rapidamente adaptar-se ao contexto inflamatório atual. Com esse conjunto de resultados, no entanto, demonstramos que, tanto neutrófilos na medula óssea quanto aqueles que já alcançaram a circulação sistêmica, percebem a lesão hepática remota e alteram a sua expressão gênica, em uma espécie de “*quorum sensing*”, de modo a otimizar e coordenar sua função para o momento atual da resposta inflamatória que encontrará ao chegar no local da lesão.

No presente trabalho, demonstramos que, em animais saudáveis, há uma porcentagem de neutrófilos no fígado que estão constitutivamente em apoptose tardia e necrose. Esse fenômeno pode ser explicado pela grande produção diária de neutrófilos e o seu curto tempo de vida quando não há estímulo inflamatório. Nesse sentido, acredita-se que a regulação do número de neutrófilos seja através da sua fagocitose por macrófagos teciduais residentes (Ley et al. 2018). Células de Kupffer são macrófagos residentes do fígado e se encontram no lúmen de sinusóides formando o maior sistema retículo-endotelial do corpo. Dessa forma, a presença de neutrófilos em apoptose no fígado saudável, pode

ser devido a sua remoção constitutiva pelas células de Kupffer (Epelman, Lavine and Randolph 2014).

Ainda, demonstramos que ocorre redução na taxa de mortalidade dos neutrófilos no fígado necrótico. A acurácia desse resultado poderia ser desafiada pela rápida eferocitose dos neutrófilos mortos por células de Kupffer e a substituição desses neutrófilos por ondas adicionais que chegam ao fígado. No entanto, além de demonstrarmos que nosso modelo de necrose hepática, por si, leva a redução significativa no número de células mononucleares no ambiente hepático, demonstramos, ainda, que a depleção total de macrófagos induzida pela administração de CLL não afeta a frequência de neutrófilos mortos. Desse modo, o aumento na taxa de sobrevivência de neutrófilos durante todo o processo de lesão hepática, mesmo na ausência de macrófagos, nos indica que neutrófilos recrutados para o fígado permanecem, de fato, viáveis por longos períodos dentro das áreas de necrose.

Demonstramos por microscopia intravital que os neutrófilos se localizam estrategicamente nas áreas de necrose, patrulhando ativamente e em contato direto com hepatócitos necróticos. Esse patrulhamento é seguido por constantes alterações morfológicas desses neutrófilos ao longo do tempo, o que nos indica que os neutrófilos permanecem vivos e ativos durante todo o curso da lesão, corroborando nossos achados na citometria de fluxo. O contato direto entre neutrófilos e hepatócitos em necrose pode estar relacionado com a remoção de detritos de células mortas pelos neutrófilos. A remoção de células mortas é essencial para criar espaço para novos hepatócitos e, desse modo, essencial para o reparo do tecido hepático. Dentre a diversidade de receptores de membrana expressos pelos neutrófilos, vários são capazes de reconhecer detritos e induzir fagocitose. Por exemplo, neutrófilos podem reconhecer e fagocitar detritos celulares através de receptores do tipo CLEC e receptores Fc (que podem induzir a fagocitose de detritos opsonizados com anticorpos e proteínas do sistema complemento) (Westman, Grinstein and Marques 2019). Em um trabalho de lesão hepática induzida por queimadura focal, a depleção de neutrófilos levou ao atraso na remoção de detritos de células mortas na área da necrose (Wang et al. 2017).

Uma vez que demonstramos que neutrófilos, além de permanecerem viáveis durante todo o curso da lesão hepática, também alteram seu perfil transcricional de pró-inflamatório para pró-resolutivo, hipotetizamos que neutrófilos podem participar ativamente da resolução da inflamação e reparo tecidual. Demonstramos que a transferência de neutrófilos resolutivos para animais no início da lesão hepática induzida por APAP têm impacto significativo em reduzir a inflamação e a lesão hepática. Esse efeito regulatório, no entanto, não foi suficiente para observarmos completa recuperação da função hepática. Isso pode ser explicado por termos realizado essa transferência e um momento inicial da lesão hepática (6 horas após o desafio com APAP). Desse modo, os hepatócitos podem, ainda, estar muito estressados pela recente sobredose de APAP e, por esse motivo, realizarem de forma ineficaz a depuração do verde de indocianina, modelo utilizado nesse trabalho para avaliar alterações na função hepática.

O trabalho pioneiro de Paul Ehrlich no final do século 19, utilizando corantes ácidos básicos de alcatrão, nos permitiram distinguir diferentes tipos de leucócitos, incluindo a nossa primeira percepção dos neutrófilos (Kay 2016). No entanto, quase um século e meio depois, os neutrófilos ainda são células enigmáticas para nós. Portanto, não é surpreendente que diversos trabalhos sobre neutrófilos continuem a surgir a cada dia. Nesse sentido, apesar de haver mais de 170.000 artigos publicados sobre os neutrófilos, ainda não compreendemos completamente todas as funções dessa célula. Além de todas as incertezas que regem o papel dos neutrófilos em diversas doenças, ainda não sabemos exatamente como neutrófilos podem regular a resposta imune adaptativa ou, mesmo, questões mais básicas como, por exemplo, qual o destino dos neutrófilos após realizarem seu mecanismo efetor no tecido ou se há algum papel fisiológico dos neutrófilos quando há ausência de estímulo inflamatório. Uma nova e recente visão sobre neutrófilos é a do seu papel na resolução da inflamação. Este presente trabalho amplia nossa percepção atual de como neutrófilos se comportam no local do estímulo inflamatório e traz uma nova luz sobre seu papel na resolução da inflamação. Considerando a noção clássica de que os neutrófilos são células instáveis e com altíssimo potencial de causar dano

colateral ao tecido, seria muito incomum pensar que o organismo geraria essa grande quantidade de neutrófilos apenas para se acaso ocorrer uma infecção.

Os resultados apresentados nesse trabalho foram publicados no periódico "*Journal of Leukocyte Biology*" no dia 18 de maio de 2020. **(Anexo 1)**

7. Conclusão

O Neutrófilo é tipicamente considerado uma célula instável, cuja ativação deve ser altamente controlada. Portanto, quando começamos a apreciar que diversas doenças possuem um componente inflamatório subjacente, por exemplo, artrite, gota, isquemia e reperfusão, a culpa recaiu sobre o neutrófilo (Kubes 2018). Foi, com essa visão clássica dos neutrófilos, que diversas estratégias terapêuticas foram traçadas para tratar essas doenças, cuja abordagem atual é evitar que novos neutrófilos sejam recrutados para o local do estímulo inflamatório.

No entanto, neste trabalho, nós desafiamos essa abordagem. Demonstramos que, ao contrário dos dogmas clássicos, neutrófilos são células ativas no local do estímulo inflamatório e que o processo de reparo do tecido hepático cursa com a manutenção do neutrófilo no fígado. Não obstante, neutrófilos apresentaram sobrevivência prolongada nas zonas necróticas, uma característica fundamental para permanecerem ativos e com perfil transcricional dinâmico, alterando seu perfil de pró-inflamatório para pró resolutivo nos momentos tardios da lesão hepática induzida pela sobredose de APAP. Portanto, fornecemos novos indícios de que neutrófilos possuem papel chave em orquestrar a resolução da inflamação e o reparo tecidual. Dessa forma, terapias que visam cessar a migração de neutrófilos devem ser avaliadas cuidadosamente, visto que essas células podem ser essenciais para o rápido e efetivo retorno do tecido à sua homeostase.

8 – Produções bibliográficas durante o período do doutorado

- 1- **Mattos MS**, Lopes ME, de Araujo AM, Alvarenga DM, Nakagaki BN, Mafra K, de Miranda CDM, Diniz AB, Antunes MM, Lopes MAF, Rezende RM, Menezes GB (2020) Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation. **J Leukoc Biol.** 108:1199-1213. (doi: 10.1002/JLB.1MA0420-634R). (**Anexo 1**).
- 2- Diniz AB, Antunes MM, Lacerda VAS, Nakagaki BN, Freitas Lopes MA, Castro-Oliveira HM, **Mattos MS**, Mafra K, de Miranda CDM, de Oliveira Costa KM, Lopes ME, Alvarenga DM, Carvalho-Gontijo R, Marchesi SC, Lacerda DR, de Araujo AM, de Carvalho E, David BA, Santos MM, Lima CX et al. (2020) Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD. **JHEP Rep** 2: 100117 (doi: 10.1016/j.jhepr.2020.100117).
- 3- Antunes MM, Diniz AB, Castro-Oliveira HM, Mendes GAM, Freitas-Lopes MA, de Oliveira Costa KM, Bicalho KM, Nakagaki BNL, **Mattos MS**, de Miranda CDM, Lopes ME, Melao ACR, Carvalho-Gontijo R, Radhakrishnan S, Ricci M, Rezende RM, Menezes GB (2020) Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections. **Nutrition** 81: 110938 (doi: 10.1016/j.nut.2020.110938).
- 4- Nakagaki BN, Mafra K, de Carvalho E, Lopes ME, Carvalho-Gontijo R, de Castro-Oliveira HM, Campolina-Silva GH, de Miranda CDM, Antunes MM, Silva ACC, Diniz AB, Alvarenga DM, Lopes MAF, de Souza Lacerda VA, **Mattos MS**, Araujo AM, Vidigal PVT, Lima CX, Mahecha GAB, Madeira MFM et al. (2018) Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **J Hepatol** 69:1294-1307. (doi: 10.1016/j.jhep.2018.08.018).

- 5- Araujo AM, Antunes MM, **Mattos MS**, Diniz AB, Alvarenga DM, Nakagaki BN, Carvalho E, Lacerda VAS, Carvalho-Gontijo R, Goulart J, Mafra K, Freitas-Lopes MA, Oliveira HMC, Dutra CM, David BA, Mendes Silva A, Quesniaux V, Ryffel B, Oliveira SC, Barber GN et al. **(2018)** Liver Immune Cells Release Type 1 Interferon Due to DNA Sensing and Amplify Liver Injury from Acetaminophen Overdose. **Cells** 7(8):88. (doi: 10.3390/cells7080088).

- 6- **Mattos MS**, Alvarenga DM, Lopes ME, Marchesi SC, Araujo AM, Nakagaki BN, Santos MM, David BA, De Souza VA, Carvalho E, Sousa Pereira RV, Marques PE, Mafra K, de Castro Oliveira HM, de Miranda CDM, Diniz AB, de Oliveira THC, Teixeira MM, Rezende RM, Antunes MM et al. **(2018)** Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. **Cells** 7(12):247. (doi: 10.3390/cells7120247).

- 7- **Mattos MS**, Alvarenga DM, Araujo AM, Antunes MM, Menezes GB **(2018)** Neutrophil biology within hepatic environment. **Cell Tissue Res** 371: 589-598 (doi: 10.1007/s00441-017-2722-9).

9 - Referências

- Addison, C. L., T. O. Daniel, M. D. Burdick, H. Liu, J. E. Ehlert, Y. Y. Xue, L. Buechi, A. Walz, A. Richmond & R. M. Strieter (2000) The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, 165, 5269-77.
- Alessandri, A. L., L. P. Sousa, C. D. Lucas, A. G. Rossi, V. Pinho & M. M. Teixeira (2013) Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther*, 139, 189-212.
- Alvarenga, D. M., M. S. Mattos, A. M. Araujo, M. M. Antunes & G. B. Menezes (2018a) Neutrophil biology within hepatic environment. *Cell Tissue Res*, 371, 589-598.
- Alvarenga, D. M., M. S. Mattos, M. E. Lopes, S. C. Marchesi, A. M. Araujo, B. N. Nakagaki, M. M. Santos, B. A. David, V. A. De Souza, E. Carvalho, R. V. Sousa Pereira, P. E. Marques, K. Mafra, H. M. de Castro Oliveira, C. D. M. de Miranda, A. B. Diniz, T. H. C. de Oliveira, M. M. Teixeira, R. M. Rezende, M. M. Antunes & G. B. Menezes (2018b) Paradoxical Role of Matrix Metalloproteinases in Liver Injury and Regeneration after Sterile Acute Hepatic Failure. *Cells*, 7.
- Araujo, A. M., M. M. Antunes, M. S. Mattos, A. B. Diniz, D. M. Alvarenga, B. N. Nakagaki, E. Carvalho, V. A. S. Lacerda, R. Carvalho-Gontijo, J. Goulart, K. Mafra, M. A. Freitas-Lopes, H. M. C. Oliveira, C. M. Dutra, B. A. David, A. Mendes Silva, V. Quesniaux, B. Ryffel, S. C. Oliveira, G. N. Barber, D. S. Mansur, T. M. Cunha, R. M. Rezende, A. G. Oliveira & G. B. Menezes (2018) Liver Immune Cells Release Type 1 Interferon Due to DNA Sensing and Amplify Liver Injury from Acetaminophen Overdose. *Cells*, 7.
- Ben-Moshe, S. & S. Itzkovitz (2019) Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16, 395-410.
- Benelli, R., M. Morini, F. Carrozzino, N. Ferrari, S. Minghelli, L. Santi, M. Cassatella, D. M. Noonan & A. Albini (2002) Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J*, 16, 267-9.
- Bernal, W., G. Auzinger, A. Dhawan & J. Wendon (2010) Acute liver failure. *Lancet*, 376, 190-201.
- Bilzer, M., F. Roggel & A. L. Gerbes (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 26, 1175-86.
- Border, W. A. & E. Ruoslahti (1992) Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, 90, 1-7.
- Bourke, E., A. Cassetti, A. Villa, E. Fadlon, F. Colotta & A. Mantovani (2003) IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *J Immunol*, 170, 5999-6005.
- Breu, A. C., V. R. Patwardhan, J. Naylor, J. N. Ringwala, Z. G. Devore, R. B. Ganatra, K. E. Hathorn, L. Horton, S. Iriana & E. B. Tapper (2019) A Multicenter Study Into Causes of Severe Acute Liver Injury. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 17, 1201-1203.
- Brune, K., B. Renner & G. Tiegs (2015) Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions. *Eur J Pain*, 19, 953-65.
- Calvente, C. J., M. Tameda, C. D. Johnson, H. Del Pilar, Y. C. Lin, N. Adronikou, X. De Mollerat Du Jeu, C. Llorente, J. Boyer & A. E. Feldstein (2019) Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223. *J Clin Invest*, 129, 4091-4109.
- Cowland, J. B. & N. Borregaard (2016) Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*, 273, 11-28.
- Dancygier, H. 2010. *Clinical Hepatology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- David, B. A., R. M. Rezende, M. M. Antunes, M. M. Santos, M. A. Freitas Lopes, A. B. Diniz, R. V. Sousa Pereira, S. C. Marchesi, D. M. Alvarenga, B. N. Nakagaki, A. M. Araujo, D. S. Dos Reis, R. M. Rocha, P. E. Marques, W. Y. Lee, J. Deniset, P. X. Liew, S. Rubino, L. Cox, V.

- Pinho, T. M. Cunha, G. R. Fernandes, A. G. Oliveira, M. M. Teixeira, P. Kubes & G. B. Menezes (2016) Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology*, 151, 1176-1191.
- David, S. & J. P. Hamilton (2010) Drug-induced Liver Injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev*, 6, 73-80.
- DeLeve, L. D. (2013) Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *J Clin Invest*, 123, 1861-6.
- Dixon, L. J., M. Barnes, H. Tang, M. T. Pritchard & L. E. Nagy (2013) Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*, 3, 785-97.
- Eash, K. J., A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan & D. C. Link (2010) CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*, 120, 2423-31.
- Epelman, S., K. J. Lavine & G. J. Randolph (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41, 21-35.
- Ericson, J. A., P. Duffau, K. Yasuda, A. Ortiz-Lopez, K. Rothamel, I. R. Rifkin, P. A. Monach & C. ImmGen (2014) Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. *PLoS One*, 9, e108553.
- European Association for the Study of the Liver. Electronic address, e. e. e., C. Clinical Practice Guideline Panel, m. Panel & E. G. B. representative (2019) EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-induced liver injury. *J Hepatol*, 70, 1222-1261.
- Fierro, I. M., S. P. Colgan, G. Bernasconi, N. A. Petasis, C. B. Clish, M. Arita & C. N. Serhan (2003) Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol*, 170, 2688-94.
- Futosi, K., S. Fodor & A. Mocsai (2013) Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*, 17, 638-50.
- Gebhardt, R. (1992) Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 53, 275-354.
- Godoy, P., N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Bottger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. Goldring, M. J. Gomez-Lechon, G. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Haussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhutter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. Stelzer, B. Stieger, R. Stober, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough & J. G. Hengstler (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87, 1315-530.
- Godson, C., S. Mitchell, K. Harvey, N. A. Petasis, N. Hogg & H. R. Brady (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 164, 1663-7.
- Gong, Y. & D. R. Koh (2010) Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res*, 339, 437-48.

- Graham, G. G., M. J. Davies, R. O. Day, A. Mohamudally & K. F. Scott (2013) The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, 21, 201-32.
- Gujral, J. S., T. R. Knight, A. Farhood, M. L. Bajt & H. Jaeschke (2002) Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci*, 67, 322-8.
- Hartenstein, V. (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 677-712.
- Heidemann, J., H. Ogawa, M. B. Dwinell, P. Rafiee, C. Maaser, H. R. Gockel, M. F. Otterson, D. M. Ota, N. Lugerling, W. Domschke & D. G. Binion (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*, 278, 8508-15.
- Hinson, J. A., D. W. Roberts & L. P. James (2010) Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*, 369-405.
- Hodgman, M. J. & A. R. Garrard (2012) A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin*, 28, 499-516.
- Jaeschke, H. (2006) How relevant are neutrophils for acetaminophen hepatotoxicity? *Hepatology*, 43, 1191-4.
- James, L. P., P. R. Mayeux & J. A. Hinson (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 31, 1499-506.
- Jenne, C. N. & P. Kubes (2013) Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*, 14, 996-1006.
- Jones, H. R., C. T. Robb, M. Perretti & A. G. Rossi (2016) The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol*, 28, 137-45.
- Kay, A. B. (2016) Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiol Spectr*, 4.
- Kolaczowska, E. & P. Kubes (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- Kubes, P. (2018) The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res*, 371, 399-406.
- Kubes, P. & C. Jenne (2018) Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol*, 36, 247-277.
- Lalor, P. F., P. Shields, A. Grant & D. H. Adams (2002) Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol*, 80, 52-64.
- Lee, W. M. (2008) Etiologies of acute liver failure. *Semin Liver Dis*, 28, 142-52.
- (2013) Drug-induced acute liver failure. *Clin Liver Dis*, 17, 575-86, viii.
- Levy, B. D., C. B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert & C. N. Serhan (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*, 2, 612-9.
- Ley, K., H. M. Hoffman, P. Kubes, M. A. Cassatella, A. Zychlinsky, C. C. Hedrick & S. D. Catz (2018) Neutrophils: New insights and open questions. *Sci Immunol*, 3.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky & S. Nourshargh (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- Liu, Z. X., D. Han, B. Gunawan & N. Kaplowitz (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 43, 1220-30.
- Maderna, P., D. C. Cottell, T. Toivonen, N. Dufton, J. Dalli, M. Perretti & C. Godson (2010) FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4 and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. *FASEB J*, 24, 4240-9.
- Malyak, M., M. F. Smith, Jr., A. A. Abel & W. P. Arend (1994) Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol*, 14, 20-30.
- Marques, P. E., S. S. Amaral, D. A. Pires, L. L. Nogueira, F. M. Soriani, B. H. Lima, G. A. Lopes, R. C. Russo, T. V. Avila, J. G. Melgaco, A. G. Oliveira, M. A. Pinto, C. X. Lima, A. M. De Paula, D. C. Cara, M. F. Leite, M. M. Teixeira & G. B. Menezes (2012) Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*, 56, 1971-82.
- Marques, P. E., A. G. Oliveira, R. V. Pereira, B. A. David, L. F. Gomides, A. M. Saraiva, D. A. Pires, J. T. Novaes, D. O. Patricio, D. Cisalpino, Z. Menezes-Garcia, W. M. Leevy, S. E. Chapman,

- G. Mahecha, R. E. Marques, R. Guabiraba, V. P. Martins, D. G. Souza, D. S. Mansur, M. M. Teixeira, M. F. Leite & G. B. Menezes (2015) Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*, 61, 348-60.
- Martin, P., G. Palmer, S. Vigne, C. Lamacchia, E. Rodriguez, D. Talabot-Ayer, S. Rose-John, A. Chalaris & C. Gabay (2013) Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions. *J Leukoc Biol*, 94, 791-802.
- Mazaleuskaya, L. L., K. Sangkuhl, C. F. Thorn, G. A. FitzGerald, R. B. Altman & T. E. Klein (2015) PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet Genomics*, 25, 416-26.
- McArthur, S., T. Gobbetti, D. H. Kusters, C. P. Reutelingsperger, R. J. Flower & M. Perretti (2015) Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. *J Immunol*, 195, 1139-51.
- McDonald, B., E. F. McAvoy, F. Lam, V. Gill, C. de la Motte, R. C. Savani & P. Kubes (2008) Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J Exp Med*, 205, 915-27.
- McDonald, B., K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve & P. Kubes (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330, 362-6.
- McGill, M. R. & H. Jaeschke (2013) Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res*, 30, 2174-87.
- Mitchell, J. R., D. J. Jollow, W. Z. Potter, D. C. Davis, J. R. Gillette & B. B. Brodie (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, 187, 185-94.
- Nakagaki, B. N., K. Mafra, E. de Carvalho, M. E. Lopes, R. Carvalho-Gontijo, H. M. de Castro-Oliveira, G. H. Campolina-Silva, C. D. M. de Miranda, M. M. Antunes, A. C. C. Silva, A. B. Diniz, D. M. Alvarenga, M. A. F. Lopes, V. A. de Souza Lacerda, M. S. Mattos, A. M. Araujo, P. V. T. Vidigal, C. X. Lima, G. A. B. Mahecha, M. F. M. Madeira, G. R. Fernandes, R. F. Nogueira, T. G. Moreira, B. A. David, R. M. Rezende & G. B. Menezes (2018) Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. *J Hepatol*, 69, 1294-1307.
- Nourshargh, S. & R. Alon (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41, 694-707.
- O'Connell, K. E., A. M. Mikkola, A. M. Stepanek, A. Vernet, C. D. Hall, C. C. Sun, E. Yildirim, J. F. Staropoli, J. T. Lee & D. E. Brown (2015) Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med*, 65, 96-113.
- Oda, M., H. Yokomori & J. Y. Han (2003) Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc*, 29, 167-82.
- Oyoshi, M. K., R. He, Y. Li, S. Mondal, J. Yoon, R. Afshar, M. Chen, D. M. Lee, H. R. Luo, A. D. Luster, J. S. Cho, L. S. Miller, A. Larson, G. F. Murphy & R. S. Geha (2012) Leukotriene B4-driven neutrophil recruitment to the skin is essential for allergic skin inflammation. *Immunity*, 37, 747-58.
- Perretti, M., H. Christian, S. K. Wheller, I. Aiello, K. G. Mugridge, J. F. Morris, R. J. Flower & N. J. Goulding (2000) Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int*, 24, 163-74.
- Phillipson, M. & P. Kubes (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, 17, 1381-90.
- Ramachandran, A. & H. Jaeschke (2017) Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res*, 3, 157-169.
- Robinson, M. W., C. Harmon & C. O'Farrelly (2016) Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*, 13, 267-76.

- Sawant, K. V., K. M. Poluri, A. K. Dutta, K. M. Sepuru, A. Troshkina, R. P. Garofalo & K. Rajarathnam (2016) Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep*, 6, 33123.
- Schmidt, L. E. & F. S. Larsen (2007) MELD score as a predictor of liver failure and death in patients with acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*, 45, 789-96.
- Scoazec, J. Y. & G. Feldmann (1994) The cell adhesion molecules of hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 20, 296-300.
- Sengelov, H., P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren & N. Borregaard (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol*, 154, 4157-65.
- Spicer, S. S. & J. H. Hardin (1969) Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review. *Lab Invest*, 20, 488-97.
- Stark, M. A., Y. Huo, T. L. Burcin, M. A. Morris, T. S. Olson & K. Ley (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22, 285-94.
- Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters & E. R. Chilvers (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, 31, 318-24.
- Teutsch, H. F. (2005) The modular microarchitecture of human liver. *Hepatology*, 42, 317-25.
- Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-5.
- Vollmar, B. & M. D. Menger (2009) The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 89, 1269-339.
- Wang, J., M. Hossain, A. Thanabalasuriar, M. Gunzer, C. Meininger & P. Kubes (2017) Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*, 358, 111-116.
- Westman, J., S. Grinstein & P. E. Marques (2019) Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Front Immunol*, 10, 3030.
- Yoon, E., A. Babar, M. Choudhary, M. Kutner & N. Pyrsopoulos (2016) Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J Clin Transl Hepatol*, 4, 131-42.
- Zarbock, A., K. Ley, R. P. McEver & A. Hidalgo (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118, 6743-51.

ARTICLE

Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation

Matheus Silvério Mattos¹ | Mateus Eustáquio Lopes¹ | Alan Moreira de Araujo¹ |
 Débora Moreira Alvarenga¹ | Brenda Naemi Nakagaki¹ | Kassiana Mafra¹ |
 Camila Dutra Moreira de Miranda¹ | Ariane Barros Diniz¹ | Maísa Mota Antunes¹ |
 Maria Alice Freitas Lopes¹ | Rafael Machado Rezende² | Gustavo Batista Menezes¹ 

¹Center for Gastrointestinal Biology, Morphology Department, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence

Gustavo B. Menezes, Center for Gastrointestinal Biology, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627—Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil. Email: menezesgb@ufmg.br

Abstract

Neutrophils were classically described as powerful effectors of acute inflammation, and their main purpose was assumed to be restricted to pathogen killing through production of oxidants. As consequence, neutrophils also may lead to significant collateral damage to the healthy tissues, and after performing these tasks, these leukocytes are supposed to die within tissues. However, there is a growing body of evidence showing that neutrophils also play a pivotal role in the resolution phases of inflammation, because they can modulate tissue environment due to secretion of different kind of cytokines. Drug-induced liver injury (DILI) is a worldwide concern being one of the most prevalent causes of liver transplantation, and is well established that there is an intense neutrophil recruitment into necrotic liver during DILI. However, information if such abundant granulocyte infiltration is also linked to the tissue repairing phase of hepatic injury is still largely elusive. Here, we investigated the dynamics of neutrophil trafficking within blood, bone marrow, and liver during hepatic inflammation, and how changes in their gene expression profile could drive the resolution events during acetaminophen (APAP)-induced liver injury. We found that neutrophils remained viable during longer periods following liver damage, because they avidly patrolled necrotic areas and up-regulated pro-resolutive genes, including *Tgfb*, *Il1r2*, and *Fpr2*. Adoptive transference of "resolutive neutrophils" harvested from livers at 72 h after injury to mice at the initial phases of injury (6 h after APAP) significantly rescued organ injury. Thus, we provide novel insights on the role of neutrophils not only in the injury amplification, but also in the resolution phases of inflammation.

KEYWORDS

hepatology, immunology, in vivo imaging, liver necrosis, neutrophil, resolution of inflammation, sterile injury, tissue repair

1 | INTRODUCTION

Neutrophils are polymorphonuclear leukocytes, classically seen as the blunt tool of acute inflammation. In fact, neutrophils are typically one of the first cells to extravasate into tissues in response to

Abbreviations: ALT, Alanine aminotransferase; APAP, Acetaminophen; CLL, Clodronate liposomes; DAMPs, Damage-associated molecular patterns; DILI, Drug-induced liver injury; ICG, Indocyanine Green; KC, Kupffer cell; NAC, N-acetyl cysteine; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone imine; NPCs, Nonparenchymal cells; NSAID, Nonsteroidal anti-inflammatory drug; RT-PCR, Real-time PCR.

Received: 24 January 2020 | Revised: 13 April 2020 | Accepted: 17 April 2020

J Leukoc Biol. 2020;108:1199–1213.

www.jleukbio.org

©2020 Society for Leukocyte Biology | 1199

inflammatory stimulus¹ where they orchestrate the subsequent steps of acute inflammation, promoting the recruitment of additional waves of granulocytes and inflammatory monocytes.² Furthermore, neutrophils are preloaded with cytoplasmic granules that can shift their baseline profile as a circulating leukocyte into a powerful effector of acute inflammation. In this sense, for many years, it was believed that its sole purpose was to rapidly reach injury sites, perform degranulation to production of powerful oxidants in an attempt to kill invading pathogens, and die within tissues.³ As an inexorable consequence of this behavior, neutrophils cause significant collateral damage to the tissue⁴ that may contribute to organ failure in different models, including lung, brain, skin, and liver.^{5,6}

Drug-induced liver injury (DILI) is a worldwide concern and one of the most prevalent causes of liver transplantation.⁷ Acetaminophen (APAP) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and, although it is safe at therapeutic dosage, APAP poisoning is responsible by approximately 50% of acute liver failure cases in United States and Europe.⁸ This elevated number of APAP-induced liver injury can be attributed to its easy and over-the-counter access. The only available treatment for APAP poisoning is the rapid administration of N-acetyl cysteine (NAC) in the first 12 h⁹ and, in severe cases, liver transplantation is the only lifesaving alternative. APAP-induced liver injury occurs in a two steps manner: first, APAP is metabolized in the liver through cytochrome P450 pathway and the toxic intermediated N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) is generated. In high doses, NAPQI levels rapidly increase, causing oxidative stress and hepatocyte death by oncotic necrosis. Later, hepatocyte necrosis results in the release of intracellular content that act as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and trigger an acute inflammation¹⁰ and overt neutrophil recruitment to the liver.¹

Neutrophil recruitment to the liver after APAP-induced liver injury was first described in 1973¹¹ and subsequent data suggested that neutrophils may play a pivotal role in the amplification of liver injury.^{1,12-15} However, in the last years, it has becoming increasingly clear that neutrophils could orchestrate both the onset and the resolution of acute inflammation. In fact, neutrophils store pro-resolutive protein in their granules such as annexin V,¹⁶ and produce lipoxins at the site of inflammation.¹⁷ Also, neutrophils may also use microRNAs (including microRNA-223) to drive spontaneous resolution of liver inflammation.¹⁸ Also, in a previous work from our group, we demonstrated that the presence of neutrophils in liver parenchyma plays a fundamental role in tissue repair after sterile liver injury,¹⁹ but the mechanisms behind such events were still largely elusive.

Here we demonstrated, for the first time, that neutrophils remained viable during longer time points of hepatic inflammation because they avidly patrolled necrotic areas, displaying an active transcriptional profile. Neutrophil profile dramatically changed throughout the course of injury progression, and adoptive transfer of "resolutive neutrophils" (RN) to mice at acute phases of liver inflammation significantly rescued organ injury. Therefore, we provide novel insights on the role of neutrophils not only in the injury amplification, but also in the resolution phases of inflammation.

2 | METHODS

2.1 | Animals

Female C57BL/6J mice aging 8–10 wk old were purchased from Centro De Bioterismo—Universidade Federal De Minas Gerais (CEBIO—UFMG, Brazil). Mice were housed in mouse microisolator cages (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brazil) under controlled conditions of temperature, 23°C, light/dark cycle of 12/12 h with food and water ad libitum. The animal care and use committee at UFMG approved all animal studies in this work (CEUA 377/2016).

2.2 | Acetaminophen-induced liver injury model

Mice were fasted for 12–15 h before a single administration of APAP (600 mg/kg) or vehicle as previously described.²⁰ Fasting was performed to assure full APAP absorption and reproducibility among experiments. APAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted in warm saline 0.9% at a concentration of 75 mg/mL prior oral gavage.

2.3 | Alanine aminotransferase (ALT) assay

Levels of serum ALT was performed utilizing a kinetic test (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) as indicative of liver injury. Blood samples were harvested and centrifuged at 1500× g during 10 min and the serum was harvested. The enzymatic assay was carried out in a 96-well microplate where pure serum and three different dilutions (1:10, 1:20, and 1:30) were added. Substrate (HEPES buffer pH 7.8, LDH, L-Alanine, NaCl, and sodium azide) with coenzymes (alfacetoglutamate, NADH, and sodium azide) was added to the serum samples at 37°C. After 50 s, the plate with samples was read in a spectrophotometer at 37°C (340 nm) every 1 min during 4 min.

2.4 | Histologic analysis

Liver was harvested and fixed in 4% formaldehyde in PBS, pH 7.4 (Sigma-Aldrich), dehydrated in alcohol and embedded in paraffin. Sections of 4 μm thicknesses were made with microtome, stained with H&E. Images were taken with a Nikon Ti microscope (Nikon, Shinagawa, Tokyo, Japan) through a 40× objective.

2.5 | Isolation of liver nonparenchymal cells (NPCs)

Mice were treated with APAP (600 mg/kg) and 6, 12, 24, 48, and 72 h after the challenge, liver was harvested, minced into small pieces, and enzymatically digested in a solution of RPMI-1640 medium supplemented with collagenase VII (1 mg/mL Sigma-Aldrich) during 1 h under constant agitation at 37°C. The liver homogenate was filtered through a 70 μm cell strainer in order to remove undigested tissue. The filtrate was differentially centrifuged (first: 300× g for 5 min, second and third: 60× g for 3 min, and fourth: 300× g for 5 min, at 4°C). The final pellet was reconstituted for further analysis.

2.6 | Assessment of liver leukocyte population

Onto the NPCs pellet was added 100 μ L of PBS supplemented with 3% of BSA (Sigma-Aldrich). A sample of this cell solution was used to assess the total leukocyte in liver NPCs and 5×10^4 cells were resuspended in 100 μ L of PBS-BSA 3% and centrifuged at 300 \times g for 5 min in histologic glass slides. The differential determination of leukocytes was carried out in optical microscope using a 100 \times objective.

2.7 | Flow cytometry

For flow cytometry analysis, 5×10^5 cells of each liver NPCs samples were labeled with fluorescein-conjugated anti-Ly6G (2 μ g/mL eBioscience, San Diego, CA, USA; clone 1A8), allophycocyanin-conjugate annexin V (2 μ g/mL, Immuno Tools, Gladiolenweg, Friesoythe, Germany) and propidium iodide (250 μ g/mL, Molecular Probes, Fisher Scientific—Arendalsvägen, Göteborg, Sweden) in annexin V binding Buffer (PBS supplemented with HEPES 10 mM; NaCl 150 mM; and CaCl_2 2.5 mM; pH = 7.4) for 30 min. The samples were read in an Accuri C6 cytometer (Becton-Dickson, Franklin Lakes, NJ, USA). FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) and Accuri C6 software were used to analyze the results.

2.8 | Neutrophil purification

After liver NPCs isolation, the cells were labeled with PE-conjugated anti-Ly6G (2 μ g/mL eBioscience; clone 1A8) in PBS supplemented with BSA 0.5% and 2 mM EDTA for 30 min at 4°C. Cells were then washed with 2 mL of PBS/BSA/EDTA, centrifuged 300 \times g for 5 min at 4°C. Further, Ly6G-positive cells (therefore PE-stained cells) were captured using anti-PE-conjugated magnetic microbeads (incubation for 30 min). Cells were washed again as described above and resuspended in 3 mL of PBS/BSA buffer and transferred to a magnetic field column iMag (BD Biosciences). After 15 min, the cells were washed and neutrophils purity was assessed in an Accuri C6 cytometer.

2.9 | RNA extraction and real-time PCR (RT-PCR)

Total neutrophils RNA extraction was performed by a RNeasy RNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, United States) following the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 60 ng of RNA was used to perform reverse transcription with iScript cDNA Synthesis Kit. The resulting cDNA was amplified by a RT-PCR with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany). All primers used in this work (Supporting Information Table S1) were selected from Harvard's PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).

2.10 | Confocal intravital imaging

Confocal intravital imaging was performed as previously described.²¹ Mice were anesthetized (s.c.) with ketamine and xylazine (Syntec, 60 mg/kg and 15 mg/kg, respectively). A midline laparoscopy was per-

formed to expose the liver for imaging. Prior to surgery, mice received an i.v. injection of a 100 μ L mixture containing brilliant violet (BV) 421-conjugated anti-Ly6G (200 μ g/kg, BioLegend, San Diego, CA, USA; clone 1A8), albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate (12 mg/kg, Sigma-Aldrich), and propidium iodide (200 μ g/kg, Molecular Probes, Fisher Scientific) in saline 0.9%. Positive labeling was confirmed by injection of matched isotypes control (IgG). Mice were imaged utilizing a Nikon Eclipse Ti (Nikon) with an A1R confocal microscope loaded with a spectral detector and XYZ motorized stage.

2.11 | Kupffer cell (KC) depletion

KC depletion was performed as previously described.²² Briefly, mice received an i.v. injection of 50 mg/kg of clodronate liposomes (CLL; clodronateliposomes.com) 24 h after APAP administration. Experimental analysis was made 24 h after APAP administration totaling 48 h after CLL treatment.

2.12 | Image analysis and neutrophil tracking

Neutrophil morphology and tracking were performed semi-automatically utilizing NIS Elements AR 5.1 (Nikon). Movies were recorded taking one frame every 30 s. Tracks that lasted for less than three frames were excluded from analysis. Morphologic analysis includes neutrophil area, perimeter, circularity, EqDiameter (equivalent diameter) were digitally acquired using NIS Software (Nikon). Tracking analysis was performed using at least three different animals.

2.13 | Neutrophil adoptive transference

Mice were challenge with APAP and, after 6 h, received an i.v. administration of 5×10^4 neutrophils isolated from the liver of control mice (N0) or RN isolated from mice in the resolutive phase of liver injury (72 h after APAP challenge). Analysis was performed 24 h after APAP administration.

2.14 | Indocyanine green (ICG) clearance rate assay

To evaluate if liver injury led to hepatic dysfunction, we measured the ICG clearance rate from systemic circulation as previously described.¹⁹ Briefly, ICG (Sigma-Aldrich) was administered i.v. (20 mg/kg) and, after 20 min, blood samples were harvested, centrifuged at 1500 \times g for 10 min, and the serum was used to quantify systemic ICG levels. Samples were seeded in 96-well microplates and quantified in a spectrophotometer (VERSAmax, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) at 800 nm.

2.15 | ELISA

Levels of chemokines and cytokines were measured by sandwich ELISA using commercial kits (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, United States) following the manufacturer's instructions. The absorbance was determined by a spectrophotometer (VERSAmax,

Molecular Devices) at 490 nm. Results were expressed as pg/mL in 100 mg of wet tissue.

2.16 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Softwares, Inc., La Jolla, CA, USA). The experimental data analysis was performed with Student's *t*-test. All data are given as the mean \pm SEM. In vivo experimental groups had at least three mice per group. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Liver necrosis leads to replacement of hepatic mononuclear cells by infiltrating neutrophils

To map the dynamics of hepatic immune cells during liver inflammation, we challenged mice with APAP, a well-described model of acute hepatic necrosis.^{1,23,24} Mice treated with APAP rapidly evolved to liver injury as assessed by increased serum levels of transaminase (ALT) (Fig. 1A), extensive centrilobular necrosis revealed by histopathology (Fig. 1B), and intravital microscopy (Supporting Information Fig. S1). This APAP dose led to a 28% of mortality rate at the first 24 h (Fig. 1C), and mice that passed this phase survived until the end of the experimental protocol (7 d). Isolation of hepatic NPCs after 12 to 24 h after APAP intake confirmed a massive liver inflammation as seen by a significant increase ($\sim 60\%$) in number of liver leukocytes recovered following purification of NPCs (Fig. 1D). In controls, mononuclear cells (macrophages and monocytes) comprised the major part of liver immune cells ($\sim 70\%$) (Fig. 1E), together with $\sim 20\%$ of lymphocytes (Fig. 1F). In sharp contrast, livers from APAP-treated mice had a robust and time-dependent increase of neutrophil counts (Fig. 1G), along with a large depletion of hepatic mononuclear cells (Fig. 1E). In fact, during the first 24–48 h after APAP intoxication, the liver immune environment completely shifted from a mononuclear to a granulocytic milieu, as shown by an elevated polymorphonuclear/mononuclear ratio (Fig. 1H and I). After 72 h of APAP challenge, the number of NPCs returned to baseline, and whereas neutrophil counts dramatically reduced, we still observed retention of these cells within the liver (Fig. 1G). Furthermore, we also found significantly lower counts of total lymphocytes at 72 h (Fig. 1F) which explains the slightly decrease observed in total NPCs at 72 h (Fig. 1D), suggesting that despite normal liver function, baseline serum levels of ALT and typical histopathologic findings, a complete recovery of hepatic immune system may demand longer periods.

To image hepatic immune response in a physiologic and in vivo context, we next prepared mice to confocal intravital microscopy. Mice received fluorescein-conjugated albumin, which allows a precise identification of hepatic microvascular bed, revealing also putative flow changes induced by liver necrosis. We also counter-stained neutrophils in vivo using anti-Ly6G. Under control conditions, liver is widely perfused and a small population of neutrophils inhabited the intravascular compartment. However, following 6 h of APAP intoxication, we

observed larger areas devoid of perfusion, and several neutrophils already emigrated to the liver at this time point. Over time, multiples spots of albumin accumulation appeared within the liver, which were suggestive of necrosis (Fig. 1J). Neutrophil infiltration peaked at 24 h (Fig. 1K), and despite their reduction at 48 h, larger areas of necrosis were still imaged. After 72 h, liver perfusion returned to normal levels (Fig. 1J), which was accompanied by the return of neutrophil counts to baseline values (Fig. 1K). Together, these data demonstrated that profound changes occur within the liver in the course of necrosis, and a robust neutrophil mobilization to the liver is coincident with the peak of hepatic injury and the final phases of tissue recovery.

3.2 | Egress of Ly6G+ cells from bone marrow supports neutrophil traffic through the blood and their final infiltration within the liver during the initial phases of liver necrosis

Whereas neutrophils are the most frequent leukocyte in human circulation (up to 70% of immune cells), mice have significant lower neutrophil counts under normal conditions in the blood.²⁵ Therefore, it is expected that the circulating neutrophil pool in humans would support their prompt accumulation within inflammatory focus, whereas in mice alternative sources might be necessary to rapid responses. Based on these premises, we next tracked neutrophil dynamics within the different compartments within the body (bone marrow, blood, and liver) during the hepatic immune response to necrosis (Fig. 2A). Flow cytometry analysis of Ly6G+ cells revealed that whereas neutrophil counts increased within the liver (Fig. 2D) and the blood (Fig. 2C) in the first 6 h after APAP challenge, no changes in Ly6G+ cells were observed in bone marrow (Fig. 2B). However, after 24 h of APAP treatment, a massive reduction in the number of Ly6G+ cells in the bone marrow was observed (Fig. 2B), together with a significant peak in Ly6G+ cells in the circulation (Fig. 2C) and in the liver (Fig. 2D). At later time points (48–72 h), frequency of Ly6G+ cells in the bone marrow returned to baseline values, which was also observed in the other compartments. Together these data suggest that different neutrophil sources may exist during the immune response to liver injury, being (i) a first wave composed mostly from circulating neutrophils and (ii) a second wave comprising cells released from the bone marrow.

3.3 | Acute liver necrosis leads to major alterations in neutrophil gene expression profile in the liver and in remote compartments

Acute liver necrosis leads to release of a plethora of intracellular DAMPs and also secretion of several cytokines. Probably due to an abundant microvascular hepatic environment, these molecules may spread within circulation at significant higher levels, and reach immune cells in remote sites, including the bone marrow. To map immune alterations in neutrophils in different compartments and in the peak of liver inflammation, we purified Ly6G+ cells from bone marrow, blood, and liver to further assessment of gene expression (Fig. 3A). We selected genes belonging to both proinflammatory and pro-resolutive

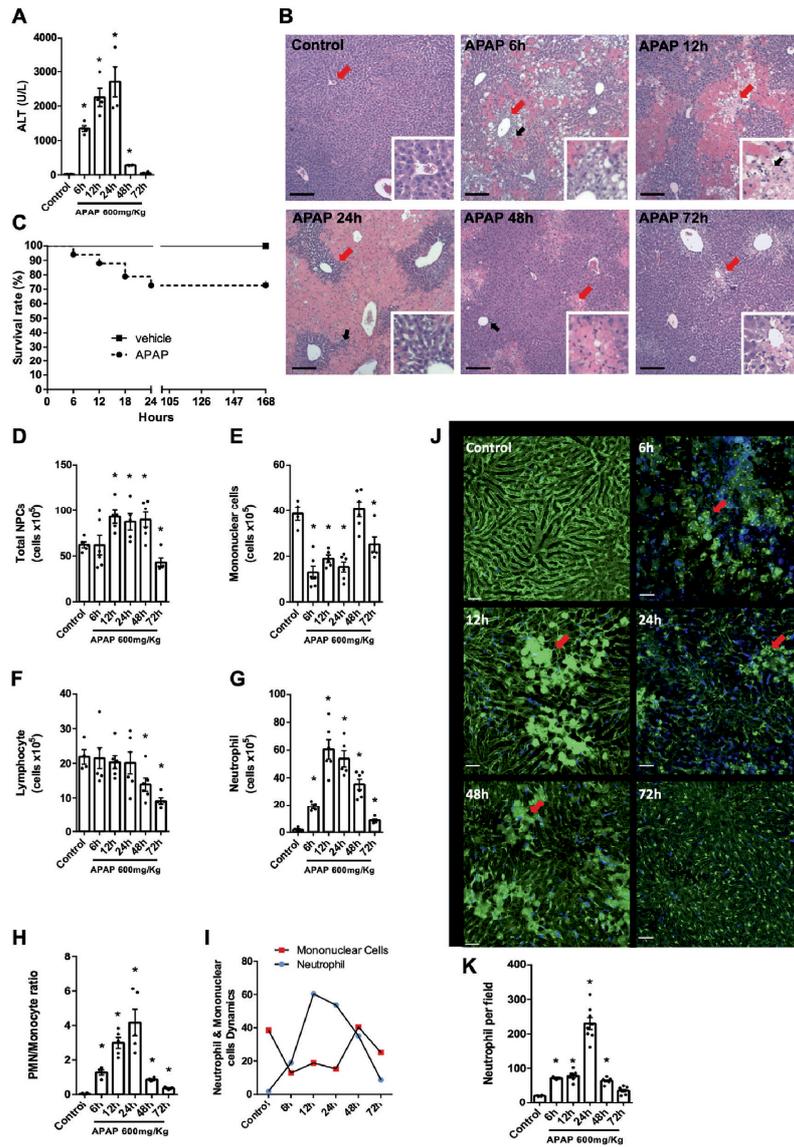


FIGURE 1 APAP-induced liver injury leads to replacement of hepatic mononuclear cells by infiltrating neutrophils. Serum ALT levels (A). Liver histology highlighting perivascular necrotic areas in liver tissue (Black arrows); staining Hematoxylin & Eosin (H&E); Scale bar = 100 μ m. Images were taken using 20X objective. Red arrows indicate the area the magnification insets were taken from (B). Mice survival curve after APAP (600 mg/Kg, n = 30) or saline administration (C). Number of total liver NPCs (D). Differential analysis of mononuclear cells (E), lymphocytes (F) and neutrophils (G). Neutrophil/Mononuclear cells ratio over time (H). Schematic representation of neutrophil and mononuclear cells dynamics over time (I). Confocal intravital image showing neutrophil (Blue; BV421-conjugated anti Ly6G, 200 μ g/Kg, i.v.) accumulation and sinusoids (Green: albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate (12 mg/Kg, i.v.) disruption. 20x magnification; Scale bar: 50 μ m. Red arrows indicate necrotic area. (J). Liver neutrophil quantification by intravital microscopy (mean of 10 fields per mice) (K). (Mean \pm SEM). **p* < 0,05 compared to control

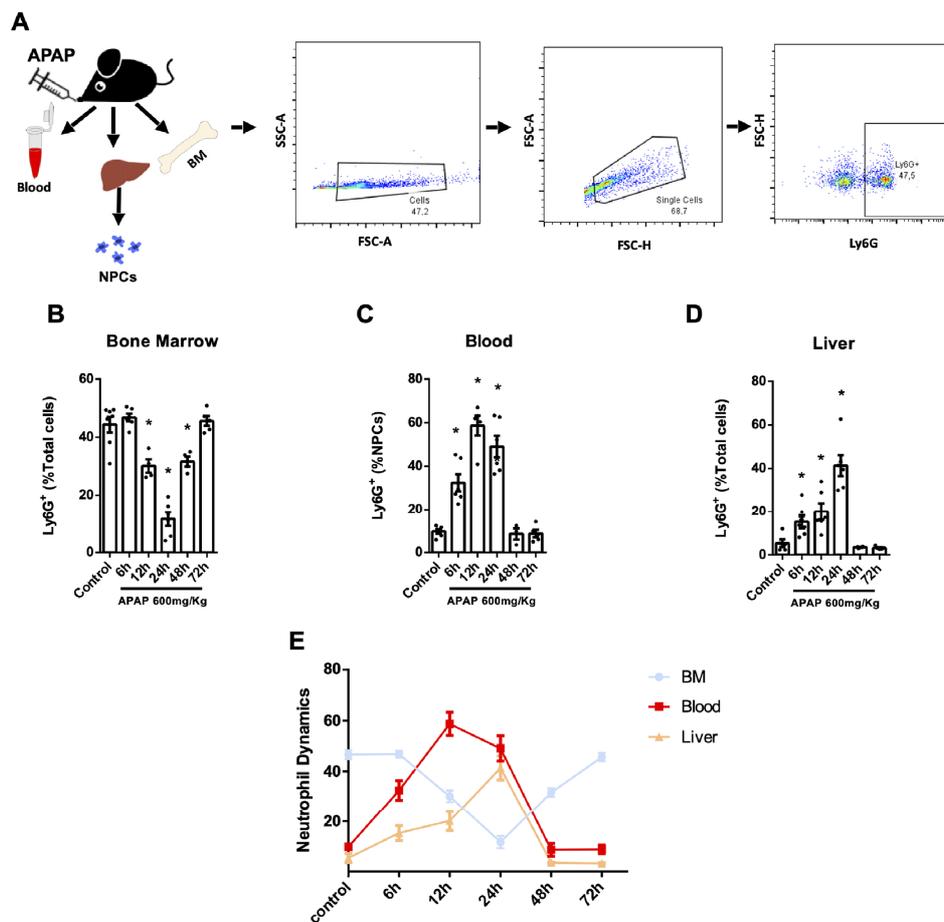


FIGURE 2 Egress of Ly6G+ cells from bone marrow supports neutrophil traffic through the blood and their final infiltration within the liver during the initial phases of liver necrosis. Schematic representation of experimental design (A). Flow cytometry for the evaluation of Ly6G+ cells frequency in bone marrow (B), peripheral blood (C) and liver (D). Neutrophil dynamics over time in bone marrow, blood and liver (E). (Mean \pm SEM) *p < 0,05 compared to control group

pathways. We found that Ly6G+ cells from APAP-treated mouse bone marrow displayed a significant increase in mRNA levels for different proinflammatory genes, including *Cxcl1*, *Fpr1*, and *Ltb4r1*. Whereas we found that the expression of *Cxcr2* gene remained unaltered, *Alox5* expression was significantly down-regulated (Fig. 3B). Although mRNA levels of *Tgfb* and *Fpr2* (a receptor for lipoxin A4 and annexin A1 that could drive an anti-inflammatory outcome) were significantly increased following APAP challenge, all other pro-resolutive genes, including *Il1r2*, *Il1ra*, *Anxa1*, and *Alox15* were down-regulated in bone marrow-derived Ly6G+ cells (Fig. 3B).

In circulating Ly6G+ cells, a different profile was observed. The expression of proinflammatory genes displayed a biphasic pattern in the course of APAP intoxication for *Fpr1* and *Ltb4r1*, and a significant and sustained suppression of *Cxcl1*, *Cxcr2*, and *Alox5* (Fig. 3C). We observed a similar profile for pro-resolutive genes, being biphasic for *Fpr2* and *Il1r2*, significant suppression of *Il1ra*, *Anxa1*, and *Tgfb*, and up-regulation of *Alox15* (Fig. 3C). Taken together, all proinflammatory genes analyzed were suppressed after 48 h of APAP challenge, along with variations in pro-resolutive gene expression.

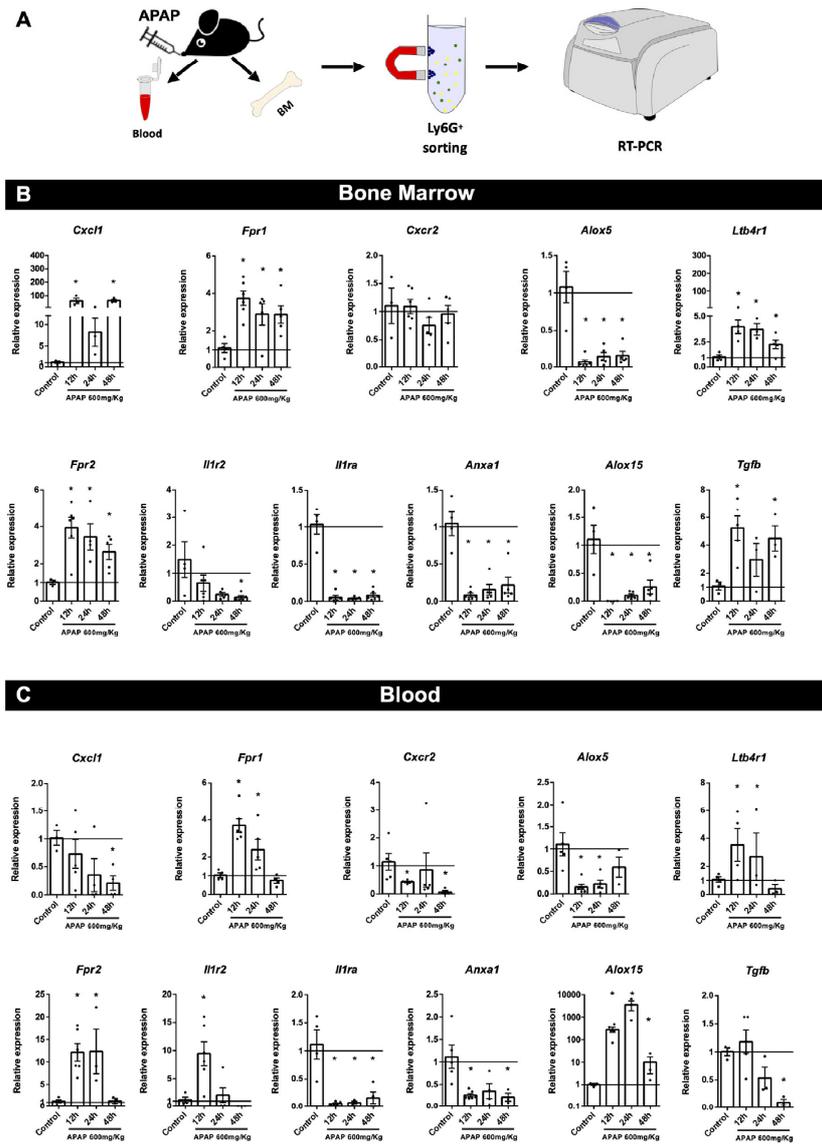


FIGURE 3 Evaluation of neutrophil gene expression in bone marrow and peripheral blood. Schematic representation of experimental design (A). Gene expression assessment of neutrophils magnetically isolated from bone marrow (B) or isolated from peripheral blood (C). Data are represented as the mean expression of selected genes relative to control group ($\Delta\Delta CT$). Normalized by geometric mean of Actb and 18s CTs. (Mean \pm SEM) * $p < 0,05$ compared to control group

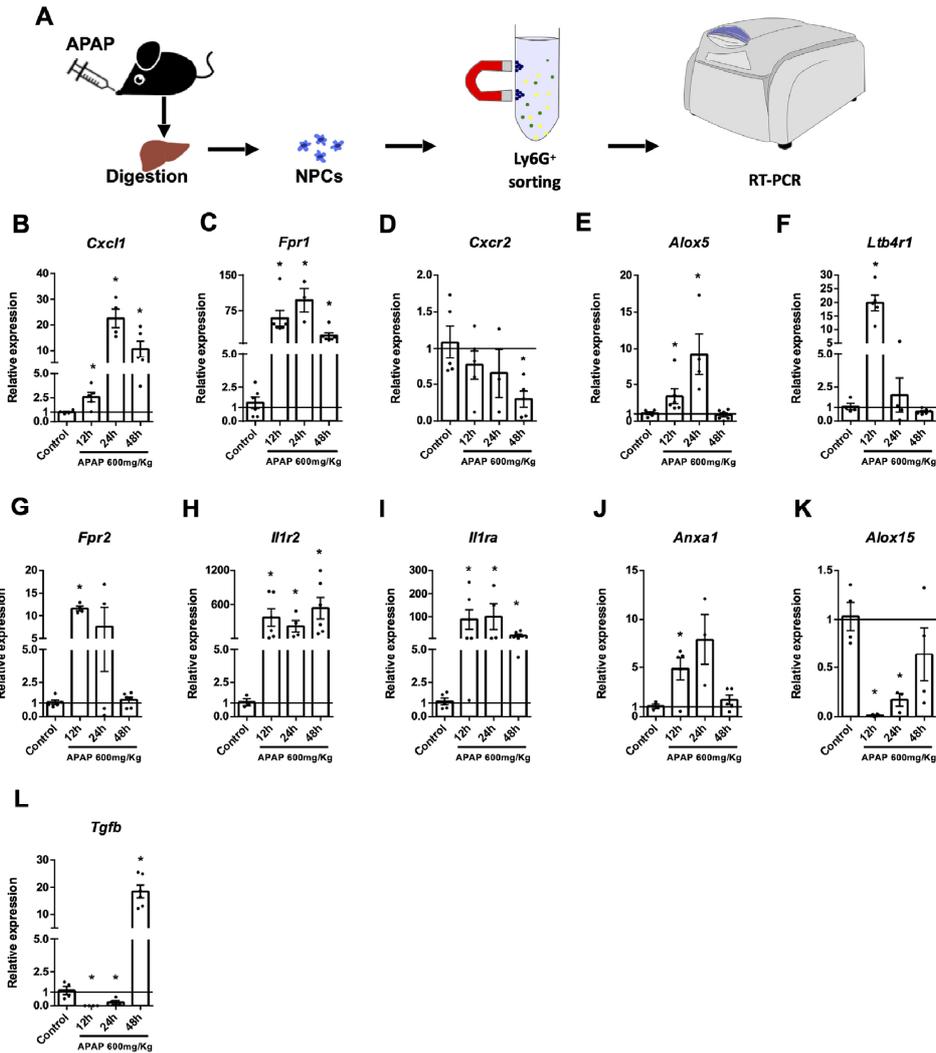


FIGURE 4 Evaluation of neutrophil gene expression in liver throughout the course of APAP-induced liver injury. Schematic representation of experimental design (A). RT-PCR of *Cxcl1* (B), *Fpr1* (C), *Cxcr2* (D), *Alox5* (E), *Ltb4r1* (F), *Fpr2* (G), *Il1r2* (H), *Il1ra* (I), *Anxa1* (J), *Alox15* (K) and *Tgfb* (L). Data are represented as the mean expression of selected genes relative to control group ($\Delta\Delta CT$). Normalized by geometric mean of 18s and *Gapdh* genes. (Mean \pm SEM) * $p < 0.05$ compared to control group

In sharp contrast to alterations in bone marrow and circulating Ly6G⁺ cells, hepatic neutrophils displayed a consistent expression profile during APAP challenge. Whereas *Cxcl1* and *Fpr1* clearly remained up-regulated until 48 h after APAP (Fig. 4B and C), *Cxcr2* expression was down-regulated (Fig. 4D). Also, we observed that *Alox5*

and *Ltb4r1* expressions were significantly reduced at this time point (Fig. 4E and F). Consistent with the reduction in the expression of proinflammatory genes, *Tgfb*, *Il1r2*, and *Il1ra* mRNA expressions were sustainably higher up to 48 h after APAP intake (Fig. 4H, I, and L). *Fpr2* and *Anxa1* displayed a biphasic expression, peaking at 12–24 h

after injury and returning to baseline levels 48 h after APAP intake (Fig. 4G and J); however, *Alox15* expression was down-regulated in all time points (Fig. 4K). Further analysis of protein expression using whole liver samples confirmed that tissue levels of hepatic cytokines, including CXCL1 and TGF- β , corroborated the gene expression profile found in isolated neutrophils (Supporting Information Fig. S2). Taken together, these data revealed a massive disturbance in the expression profile of different genes in neutrophils in remote sites and within the circulation. Moreover, once within the liver, neutrophils may be educated to a pro-resolutive profile, which is associated with a suppression of proinflammatory gene expression, providing a reasonable explanation for the regulatory tonus observed in the liver.

3.4 | Neutrophils that migrate to the liver following hepatocyte necrosis remain viable during all phases of the inflammatory response

The fate of emigrating neutrophils within inflamed tissues remains debatable. Although neutrophils may have an increased lifespan upon activation, it is well accepted that these cells undergo cell death rapidly after their effector mechanisms are initiated. For these reasons, long-term dependent cell actions are not commonly credited to neutrophils. Based on our data demonstrating that neutrophils remained within the liver even after 3 d after injury and also maintained an active gene expression, we hypothesized that these cells might remain viable for longer periods. For this, we assessed the frequency of viable neutrophils and also measured the percentage of different cell death modalities—including necrosis, apoptosis, and late apoptosis—using flow cytometry of hepatic neutrophils from different points after APAP administration. In fact, neutrophils from mice with acute liver injury had a significant reduced rate of necrosis (Fig. 5A), and although no major changes were found in apoptosis rate (Fig. 5B), these cells displayed lower percentages of late apoptosis in the initial phases of liver inflammation (Fig. 5C). Surprisingly, even in later time points (72 h after APAP intoxication), emigrated neutrophils remained viable with the lowest rates of necrosis. In sharp contrast with the prevalent dogma, the percentage of presumably live neutrophils (those that are considered not dead by necrosis, apoptosis, and late apoptosis) enhanced over the inflammation period, and remained elevated up to 72 h after challenge, a period when the pro-resolutive phase has already started (Fig. 5D).

Removal of dead neutrophils by macrophages—a process referred to as efferocytosis—is fundamental for the maintenance of normal tissue homeostasis and a prerequisite for the resolution of inflammation. Therefore, the rapid removal of dead neutrophils by macrophages could possibly mask our assessment of neutrophil viability rate. To supersede this caveat, and avoid removal of putative dead neutrophils within the liver, we next depleted hepatic macrophages (KCs) before challenging mice with APAP. CLL injection caused full depletion of KCs (Fig. 5E and F), and even in the absence of macrophages, no changes in the frequency of apoptosis, necrosis, and late apoptosis in neutrophils were observed (Fig. 5G–I). These data reinforced our claim that once emigrated to the liver, neutrophils remained viable

transcriptionally active and may be key effectors in the fate of organ recovery.

3.5 | Neutrophils accumulate preferentially within necrotic zones, and active patrolled dead hepatocytes

Once established that neutrophils persisted alive within the necrotic liver, we next dynamically visualized their behavior under confocal intravital microscopy. For this, we stained dead cells *in vivo* with propidium iodide, and imaged the accumulation of Ly6G⁺ cells over the course of APAP-induced liver necrosis. Consistent with our biochemical analysis, intravital imaging of tissue necrosis confirmed that APAP-induced liver injury is consistent with a time-dependent hepatocyte death (Supporting Information Fig. S1). As seen in Figure 6, the majority of Ly6G⁺ cells were preferentially accumulated in the vicinity of dead cells and necrotic zones. These cells avidly circumscribed dead cells and actively patrolled liver sinusoids and the parenchymal environment, and such behavior caused major changes in their morphology (Fig. 7A). Neutrophils from control mice are usually rounded, with higher values of circularity (0.9 in average, being 1.0 a perfect circle). However, neutrophil shape profoundly changed during the hepatic inflammatory process, because they became less rounded (Fig. 7B) and more spread, causing a significant increase in their area (Fig. 7C), diameter (Fig. 7D), and perimeter (Fig. 7E). Digital tracking of individual neutrophil path within the liver showed that during necrosis-induced inflammation process, part of these cells travelled longer distances, whereas others remained moving several times, but with shorter distances (Fig. 7F, Supporting Information Movies S1–3). These multiple behaviors suggest that the hepatic neutrophil pool may comprise cells under different stages of activation, which may be associated with their location within the hepatic compartments (intravascular or within necrotic areas).

3.6 | Adoptive transfer of hepatic neutrophils isolated from the resolution phase lead to reduction in liver inflammation and hepatic injury

Considering that hepatic neutrophils shifted from a proinflammatory to a pro-resolutive profile during the later phases of liver injury, we asked if adoptive transfer of such RN to APAP-challenged mice at the peak of the inflammatory response would dampen liver inflammation and injury. For this purpose, we isolated liver neutrophils from mice 3 d after APAP intoxication—the time point that we detected enhanced expression of mRNA for *Tgfb* and *Fpr2* (pro-resolutive), as well as reduced expression of *Cxcl1* and *Ltb4r1* (proinflammatory; Supporting Information Fig. S3). Then, we transferred 5×10^4 cells *in vivo* into mice that were treated with APAP after 6 h, because this is the precise onset of hepatocyte necrosis and the initial arrival of neutrophils within liver tissue.^{15,19} As controls, we also transferred hepatic neutrophils from nontreated mice (referred here as N0) to mice challenged with APAP under the same conditions. We found that the transfer of RNs, but not N0, led to a significant decrease in liver injury (Fig. 8A). Moreover, mice that received N0, but not RN, had a

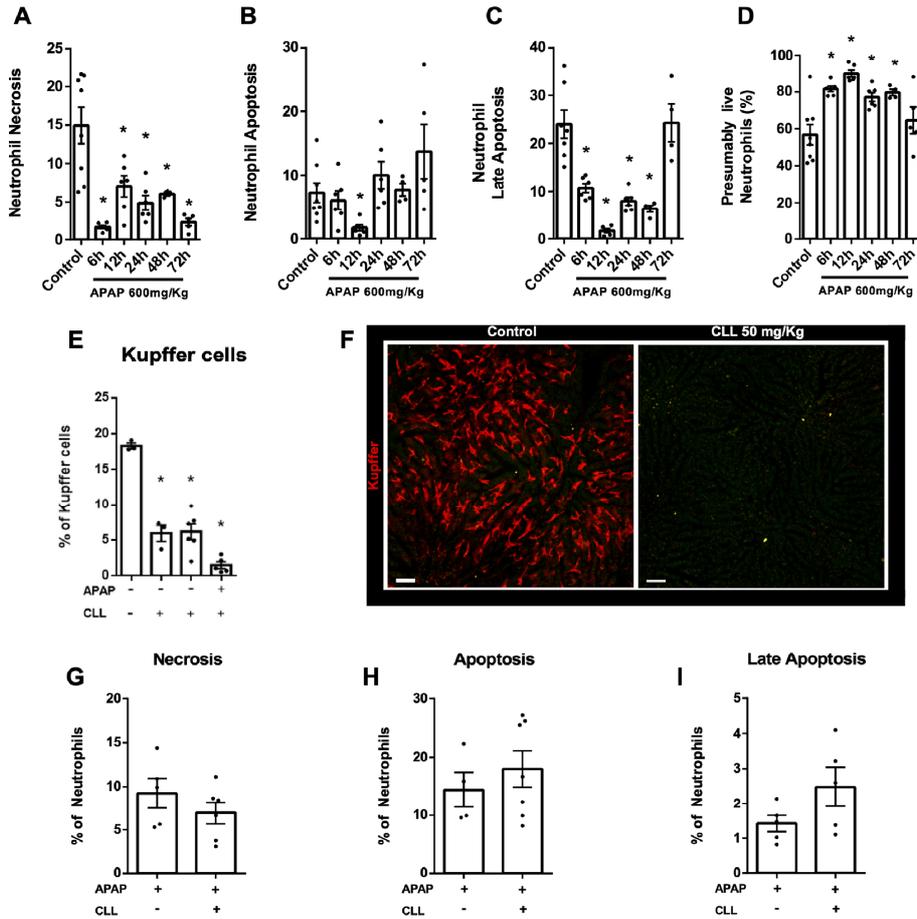


FIGURE 5 Neutrophils remain viable in liver during all phases of APAP-induced liver injury. Flow cytometry evaluating the proportion of neutrophils (Ly6G+ cells) in liver dying by necrosis (Ly6G+/Pi+/AnnexinV-) (A), Apoptosis (Ly6G+/Pi-/AnnexinV+) (B) and late apoptosis (Ly6G+/Pi+/AnnexinV+) (C). Percentage of presumably live neutrophils in liver (D). Evaluation of Kupffer cells (F4/80+) depletion after clodronate liposomes administration (50 mg/Kg i.v.) by flow cytometry (E) and by confocal intravital imaging; 20x magnification; scale bar: 50 μ m. PE-conjugated anti-F4/80, (200 μ g/Kg i.v.) (F). Flow cytometry evaluating the proportion of neutrophils in necrosis (G), apoptosis (H) or late apoptosis (I) in KCs depleted mice 24 hours after APAP intake. (Mean \pm SEM) * p < 0,05 compared to control group

massive increase in liver dysfunction, as assessed by reduced rates of ICG depuration (Fig. 8B). In fact, mice engrafted with RN had reduced expression levels of *Cxcl1* mRNA (Fig. 8C), and increased levels of *Il10* (Fig. 8D) and *Anxa1* mRNA (Fig. 8E). Furthermore, although NO transfer caused significant reduction in mRNA expression for *Il6* (Fig. 8F) (a pro-mitotic cytokine to hepatocytes) and *Il10* (a cytokine with potent anti-inflammatory effects), mice that received RN showed baseline levels as compared to APAP-treated group. Together, these data provide strong evidence that neutrophils are transcriptionally active and might influ-

ence the fate of liver inflammation in different time points of the acute liver injury.

4 | DISCUSSION

Neutrophils are the most abundant leukocytes in human circulation,²⁶ being considered as one of the first line of defense against invading pathogens.⁴ APAP-induced liver injury occurs due to widespread

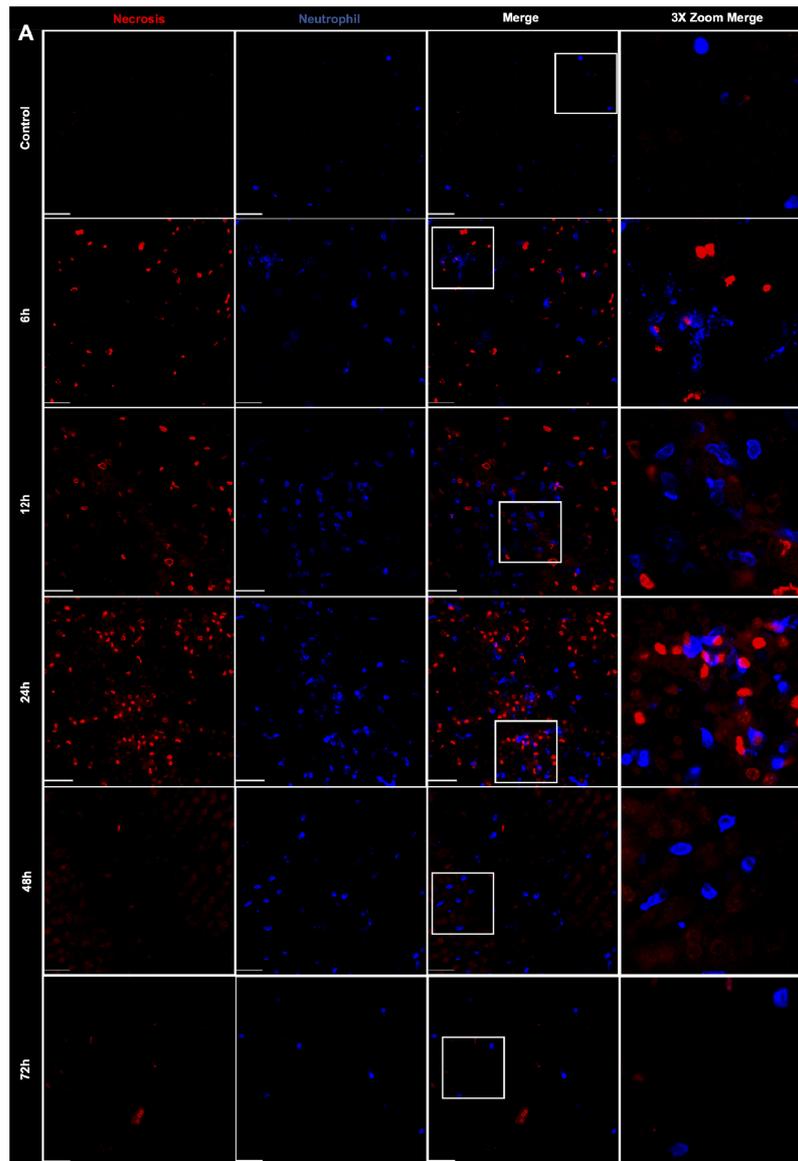


FIGURE 6 Intravital imaging of the necrotic site after APAP-induced liver injury. Confocal intravital imaging of the entire course of liver injury after APAP intoxication. Neutrophils labeled with BV421-conjugated with anti-Ly6G (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.). Necrotic sites labeled with propidium iodide (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.). 40X magnification. White squares indicate the area where the zoom was taken from. Scale bar: 50 μm

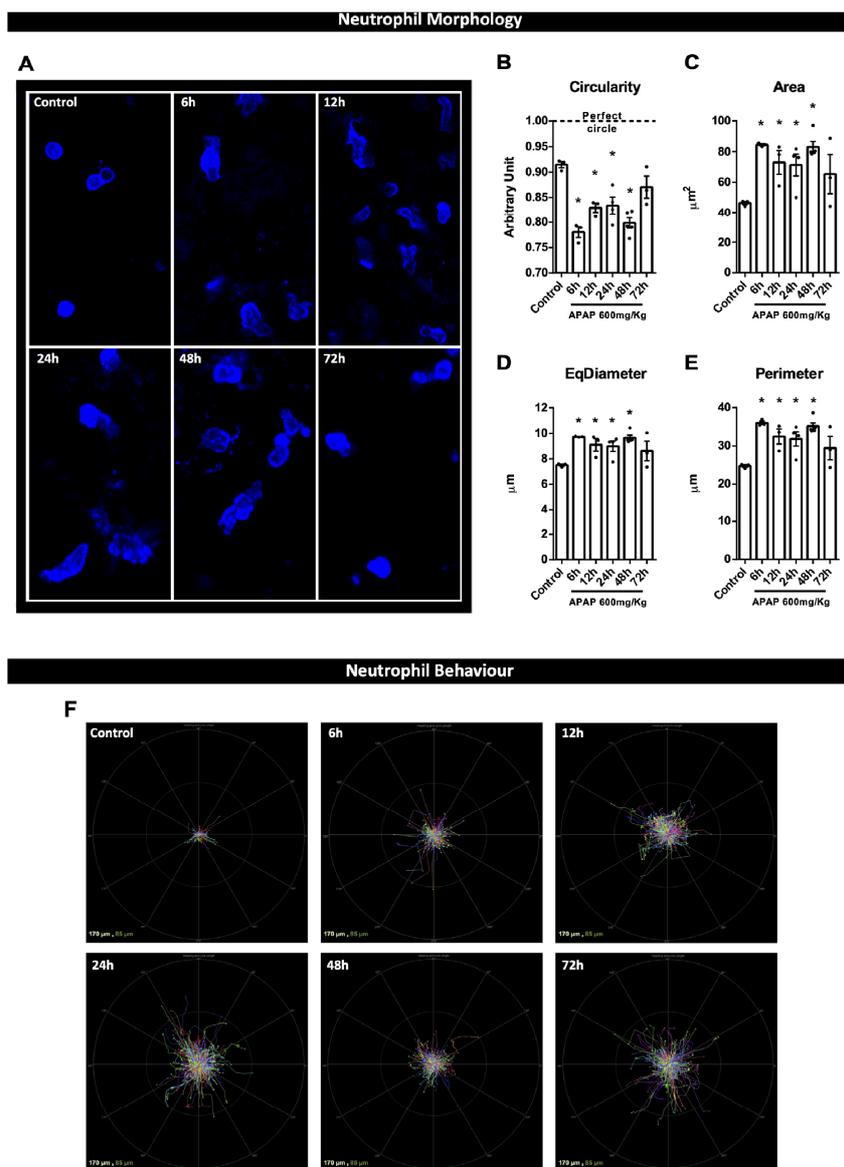


FIGURE 7 Neutrophil morphological and behavioral analysis within necrotic site over time. Confocal intravital imaging of neutrophils (Blue; BV421-conjugated anti Ly6G, 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.) morphology at the necrotic site (Propidium iodide 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.v.) during APAP-induced liver injury (A). Morphological analysis of neutrophils evaluating its circularity (B), Area (C), equivalent diameter (D) and perimeter (E). Neutrophil heading and path length (F). (Mean SEM) * $p < 0.05$ compared to control group

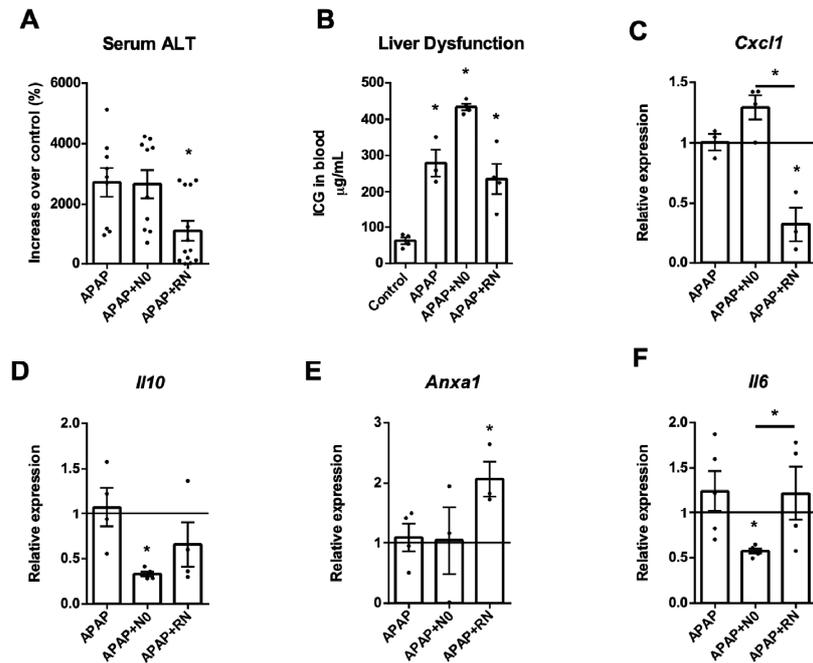


FIGURE 8 Adoptive transfer of hepatic neutrophils isolated from the resolution phase lead to reduction in liver inflammation and hepatic injury. Serum ALT levels (A) Indocyanine Green clearance rate (B). RT-PCR of Cxcl1 (C), Il10 (D), Anxa1 (E) and Il6 (F). Data are represented as the mean expression of selected genes relative to control group ($\Delta\Delta\text{CT}$). Normalized by geometric mean of 18s and Gapdh genes. (Mean \pm SEM) * $p < 0,05$ compared to control group

hepatocyte oncotic necrosis, and the release of intracellular content, which may act as DAMPs,²⁷ will drive a robust accumulation of leukocytes, mainly granulocytes and mononuclear cells.²² These danger signals work together with chemokines and mitochondrial products in neutrophil activation and migration toward the liver.¹ We have previously demonstrated that neutrophils can enhance organ injury in the initial phases of response to necrosis,^{1,14,15} but their accumulation within the liver was paradoxically a key feature in a quick and efficient tissue repair.¹⁹ Here, we expanded these data and investigated the role of neutrophils over the entire course of APAP-induced liver injury, to (i) better understand the role of neutrophils within necrosis; (ii) characterize their behavior at the injury site; (iii) determine the dynamics of gene expression profile; and (iv) to investigate the mechanisms underlying the pro-resolutive effect of neutrophils in liver inflammation.

We showed that neutrophil migration and hepatic lesion progression occur simultaneously, which suggests a fundamental role of neutrophils in collateral tissue damage. The presence of neutrophils in the liver after APAP-induced liver injury was first reported in 1973¹¹ and subsequent works correlated the presence of neutrophils in liver tissue with lesion amplification.¹² However, the beneficial effects of neutrophil depletion with anti-GR1 or Ly6G antibodies in the fate of

organ damage might be also attributed to elevated levels of mRNA for metallothioneins, a strong class of immunomodulators.²⁸ Thus, understanding the contribution of neutrophils to both organ damage and repair is still matter of great debate, and therefore deserves further investigation.

Although proinflammatory functions of neutrophils are far more understood, in the last decades we have begun to appreciate that granulocytes may also have a remarkable pro-resolutive role because they also release pro-resolving mediators and express scavenger receptors that dampen the actions of proinflammatory cytokines.^{16,17,29} Neutrophils also may aid in the angiogenesis process after injury because they may release vascular endothelial growth factors from their specific granules³⁰ or by producing ELR⁺ chemokines that stimulate angiogenesis via CXCR2 on endothelial cells.³¹⁻³³ Here we showed that neutrophils may be effector players at the APAP-induced injury site not only in the initial phases, but also in later time points because they accumulate within the liver up to 3 d after APAP challenge. Upon emigration, neutrophil gene expression was significantly altered in a time-dependent manner according to the course of liver injury. In fact, neutrophils up-regulated the expression of proinflammatory genes at the early phase of the inflammatory response; however, a major shift

in their transcriptional profile occurred at the late stages of inflammation, because neutrophils not only down-regulated proinflammatory genes, but also up-regulated genes involved in the resolution phase. Of note, we observed a peak in *Fpr2* expression in the acute phase (24 h), which is a receptor for lipoxins that may regulate neutrophil apoptosis. Also, at late time points of liver inflammation, neutrophils expressed higher levels of *Tgfb* mRNA, a key cytokine involved in liver repair.³⁴ Such changes in neutrophil profile to a pro-resolutive phenotype may be explained by a sequence of interactions between neutrophils, emigration waves of granulocytes from bone marrow, tissue macrophages, recruited monocytes, and the cytokines within the liver microenvironment. In fact, neutrophils may also be influenced by lipid inflammatory mediators, including PGE₂ at the site of inflammation, which could drive an increase in their lipoxin production.¹⁷ In this sense, we hypothesized that emigrated neutrophils at later stages of inflammation may help dampen organ inflammation, restoring the tolerogenic milieu found in the liver under homeostasis. In addition, it is well described that murine neutrophils constitutively express IL-1R2, an IL-1 decoy receptor. IL-1R2 acts deactivating IL-1 α and IL-1 β levels, reducing their proinflammatory actions during an immune response.^{29,35} We found that once emigrated to the APAP-induced liver injury, neutrophils displayed a marked up-regulation of both atypical IL1 receptor and IL1Ra mRNAs. Thus, hepatic neutrophils may exert their immunomodulatory functions by clearing proinflammatory cytokines, including IL-1 α and IL-1 β .

Neutrophils are fully differentiated myeloid cells, which are daily produced in bone marrow and released in peripheral blood.³⁶ We found that whereas neutrophils accumulated in the liver in a time-dependent manner, their frequency within bone marrow acutely reduced by 90%. Because new neutrophils are being progressively recruited to the liver due to injury and the major part seemed to remain within hepatic environment for long periods, these cells were probably being recruited from the bone marrow. In addition, we suggest that neutrophils are probably sensing liver injury also within the bone marrow and peripheral blood, even before they reached hepatic tissues. The rationale behind this may be explained by the major changes in the expression of several genes in both bone marrow and circulating Ly6G+ cells even in initial phases of disease. In this scenario, we found a major increase in *Alox15* mRNA in circulating neutrophils 12–24 h after APAP challenge. In fact, circulating neutrophils can be exposed to autacoid agents, such as PGE₂, that induces expression of *Alox15* in neutrophils.¹⁷ We also found an increase in *Il1r2* gene expression in circulating neutrophils 12 h after APAP poisoning. This gene encodes the IL-1 α and IL-1 β decoy receptor and has a key role in the scavenging of these cytokines. The enhanced expression of pro-resolutive genes in neutrophils in early moments of liver injury may indicate that additional waves of neutrophils that are reaching the liver are already committed to dampen inflammation, as demonstrated by our adoptive transference experiments. However, it is clear that APAP-mediated injury is a very strong and damaging condition, and even wide-spectrum anti-inflammatory drugs are usually not able to fully control necrotic damage and hepatic dysfunction. Because we transferred only one leukocyte subtype in a one single time point, we believe

that despite their clear impact on liver inflammation and injury, such regulatory effect could not be sufficient enough to fully recover liver function. Also, because hepatocytes are still very stressed due to APAP poisoning at the point we transferred RN, dampening of inflammation by adoptive transference could not directly impact in ICG clearance immediately, despite the clear change in total cell necrosis as seen by ALT serum levels. Hence, such “quorum sense” may be important to remotely optimize and coordinate neutrophil function, allowing a match of their phenotype with the current inflammatory status in liver tissue.

It is commonly accepted that after reaching inflammatory sites, neutrophils undergo massive degranulation, along with a large production of powerful oxidants. Despite the potent microbicidal environment generated by these actions, a significant collateral damage may be caused within the liver. Considering this hostile milieu, it was believed that neutrophils ultimately die at the inflammatory sites.³⁷ Here we challenged this notion by showing that neutrophils which experienced the necrotic environment had enhanced survival rates in the liver. One could argue that these cells would be rapidly dying, being removed by macrophages and then replaced by newly emigrated neutrophils. In fact, in humans, 10⁶ neutrophils per kilogram of body weight are produced daily and due to a natural short life span, neutrophil recycling is tightly regulated through efferocytosis by tissue resident macrophages.³⁶ In liver, KCs may be key players in neutrophil elimination under physiologic conditions. However, in our hands, lower cell death rates in neutrophils across the whole experimental protocol were consistently detected, and full depletion of liver macrophages did not affect the frequency of dead neutrophils. Therefore, the consistency in enhanced neutrophil survival rates throughout the whole injury procedure, together with a relative inability to detect higher frequencies of dead neutrophils even in the absence of macrophages, indicate that emigrated neutrophils remained viable for long periods within necrotic liver. Consistent with this, adoptive transfer of RN resulted in reduction of liver inflammation and hepatic injury following APAP treatment.

In conclusion, we demonstrate that neutrophils are not end-target cells, but rather active players at the injury site to drive tissue repair. Thus, therapies aimed to block neutrophil recruitment, despite their putative effect in reducing collateral damage, should be carefully evaluated because emigrated neutrophils may be an essential feature for the return of injured tissues to physiologic states.

DISCLOSURES

Conceptualization, investigation and writing the original draft: M.S.M., R.M.R., G.B.M. Experiments, sample collection, data discussion: M.S.M., M.E.L., A.M.d.A., D.M.A., B.N.N., K.M., C.D.M.d.M., A.B.D., M.M.A., M.A.F.L., G.B.M. Data analysis: M.S.M., A.M.d.A., M.E.L., and G.B.M. Supervision and project administration: G.B.M.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPEMIG, CAPES, and CNPq (Brazil).

ORCID

Gustavo Batista Menezes  <https://orcid.org/0000-0001-9887-3616>

REFERENCES

- Marques PE, Amaral SS, Pires DA, et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*. 2012;56:1971-1982.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:519-531.
- Fantone JC, Ward G. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease. *Hum Pathol*. 1985;16:973-978.
- Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011;17:1381-1390.
- Sheron N, Bird G, Koskinas J, et al. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* (Baltimore, MD). 1993;18:41-46.
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55:1265-1272.
- David S, Hamilton JP. Drug-induced liver injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev*. 2010;6:73-80.
- Lee WM. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology*. 2007;46:966-970.
- Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet*. 1977;2:432-434.
- Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M, Prysopoulos N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. *J Clin Transl Hepatol*. 2016;4:131-142.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973;187:185-194.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2006;43:1220-1230.
- Amaral SS, Oliveira AG, Marques PE, et al. Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. *Cell Commun Signal*. 2013;11:10.
- Antunes MM, Araujo AM, Diniz AB, et al. IL-33 signalling in liver immune cells enhances drug-induced liver injury and inflammation. *Inflamm Res*. 2018;67:77-88.
- Marques PE, Oliveira AG, Pereira RV, et al. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*. 2015;61:348-360.
- Perretti M, Christian H, Wheller SK, et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int*. 2000;24:163-174.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*. 2001;2:612-619.
- Calvente CJ, Tameda M, Johnson CD, et al. Neutrophils contribute to spontaneous resolution of liver inflammation and fibrosis via microRNA-223. *J Clin Invest*. 2019;130:4091-4109.
- Alvarenga DM, Mattos MS, Lopes ME, et al. Paradoxical role of matrix metalloproteinases in liver injury and regeneration after sterile acute hepatic failure. *Cells*. 2018;7:247.
- Araujo AM, Antunes MM, Mattos MS, et al. Liver immune cells release type 1 interferon due to DNA sensing and amplify liver injury from acetaminophen overdose. *Cells*. 2018;7:88.
- Marques PE, Antunes MM, David BA, Pereira RV, Teixeira MM, Menezes GB. Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nat Protoc*. 2015;10:258-268.
- David BA, Rezende RM, Antunes MM, et al. Combination of mass cytometry and imaging analysis reveals origin, location, and functional repopulation of liver myeloid cells in mice. *Gastroenterology*. 2016;151:1176-1191.
- Ramachandran A, Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *J Clin Transl Res*. 2017;3:157-169.
- Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;369-405.
- O'Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, et al. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med*. 2015;65:96-113.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31:318-324.
- Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis. *Toxicol Sci*. 2002;67:322-328.
- Jaeschke H. How relevant are neutrophils for acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 2006;43:1191-1194.
- Bourke E, Cassetti A, Villa A, Fadlon E, Colotta F, Mantovani A. IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *J Immunol*. 2003;170:5999-6005.
- Gong Y, Koh DR. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res*. 2010;339:437-448.
- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*. 2003;278:8508-8515.
- Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*. 2000;165:5269-5277.
- Benelli R, Morini M, Carrozzino F, et al. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J*. 2002;16:267-269.
- Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*. 1992;90:1-7.
- Martin P, Palmer G, Vigne S, et al. Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions. *J Leukoc Biol*. 2013;94:791-802.
- Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. Neutrophils: new insights and open questions. *Sci Immunol*. 2018;3:eaat4579.
- Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:427-439.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Mattos MS, Lopes ME, de Araujo AM, et al. Prolonged neutrophil survival at necrotic sites is a fundamental feature for tissue recovery and resolution of hepatic inflammation. *J Leukoc Biol*. 2020;108:1199-1213. https://doi.org/10.1002/JLB.1MA0420_634R