

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

Sarah Cozzer Marchesi

**Metaloproteinases de matriz derivadas de
neutrófilos amplificam a lesão hepática induzida
por drogas**

Belo Horizonte

2016

Sarah Cozzer Marchesi

**Metaloproteinases de matriz derivadas de
neutrófilos amplificam a lesão hepática induzida
por drogas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Co-orientador: Dr. Pedro Elias Marques

Belo Horizonte

2016

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

Ào meu pai Paceli que me ensinou a dedicar
À minha mãe Conceição que me ensinou a acreditar
E à minha irmã Alana que me ensinou a compartilhar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e pelas bênçãos de todos os dias.

Agradeço à minha família que é tudo para mim. Pai, obrigada por toda dedicação e esforço para que nunca nos faltasse nada. Mãe, obrigada pelo conforto de suas palavras e o cuidado todos os dias. Irmã, obrigada por cuidar de mim desde sempre e pela companhia. Tudo o que eu faço é para que um dia eu seja para alguém um pouco do que vocês são para mim.

Agradeço ao Antenor por ficar do meu lado sempre, acreditar em mim e compartilhar dos meus sonhos. Obrigada, amor, por fazer meus dias mais felizes e por ser essa pessoa maravilhosa que você é para mim. Agradeço também à sua família que sempre me acolheu, me apoiou, e da qual eu me sinto parte.

Agradeço a Rita e a Iolanda que me deram um lar tão longe de casa.

Agradeço ao meu orientador Gustavo, por ter me acolhido como parte de sua equipe desde o primeiro aperto de mão. Obrigada, Gu, por ter me recebido, ter acreditado e confiado em mim. Você é um exemplo de pesquisador e de cientista. Você me ensinou a aproveitar o caminho e a fazer o que se ama!

Agradeço ao meu co-orientador Pedro, por ter sido essencial nos primeiros passos e sempre estar disponível para contribuir. Obrigada, Pedro, você foi fundamental para o nosso trabalho e só tenho a agradecer por toda a ajuda e pela amizade nesses dois anos.

Agradeço a todos os amigos que o laboratório me proporcionou. Débora que esteve comigo em todos os experimentos, muito obrigada pela ajuda e pela amizade. Aos demais integrantes desse grupo CGB, Bruna (Fumo), Maisinha, Riri, Brendinha, Lice, Alanzito, professor André, Moniquinha, Roberta e Hortência, vocês são pesquisadores competentes e pessoas incríveis que tive a felicidade de trabalhar e dividir minha vida nesses dois anos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço a Rafa, Lindys e Dani que não estão mais no lab, mas fizeram parte do trabalho e da minha vida no mestrado.

Agradeço aos amigos do NEI pelo bom convívio e a companhia ao longo desses dois anos.

Agradeço aos amigos do Imunofar, sempre dispostos a ajudar e contribuir para o trabalho.

Agradeço aos professores, funcionários e colegas da Pós Graduação em Biologia Celular por todo apoio e companheirismo.

E agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 ANIMAIS.....	26
4.2 O MODELO DE LESÃO HEPÁTICA	26
4.3 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DE AMOSTRAS	26
4.4 CONFECCÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA NECROSE HEPÁTICA.....	26
4.5 DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANFERASE (ALT)	27
4.6 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	27
4.7 ENSAIO DE ELASTASE	28
4.8 TESTE DE DEPURAÇÃO DE VERDE INDOCIANINA (INDOCYANINE GREEN – ICG).....	28
4.9 REAGENTES E INIBIDORES FARMACOLÓGICOS	29
4.10 DESENHO EXPERIMENTAL	30
4.11 MICROSCOPIA CONFOCAL INTRAVITAL	30
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5. RESULTADOS	32

5.1 DOSE DE 600 MG/KG DE APAP CAUSA LESÃO HEPÁTICA AGUDA	32
5.2 SOBREDOSE DE APAP LEVA A NECROSE DE HEPATÓCITOS	34
5.3 SOBREDOSE DE APAP CAUSA ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO	37
5.4 SOBREDOSE DE APAP CAUSA PERDA DA FUNÇÃO HEPÁTICA	41
5.5 INIBIÇÃO DA DEGRANULAÇÃO REDUZ A LESÃO E AUMENTA A FUNÇÃO HEPÁTICA APÓS SOBREDOSE DE APAP	44
5.6 INIBIÇÃO DE PROTEASES REDUZ A LESÃO HEPÁTICA CAUSADA POR OVERDOSE DE APAP	47
5.7 INIBIÇÃO DE SERINOPROTEASES, CISTEÍNOPROTEASES E ELASTASE NÃO INTERFEREM NA LESÃO E NEM NA FUNÇÃO HEPÁTICA CAUSADA POR SOBREDOSE DE APAP	49
5.8 INIBIÇÃO DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs) REDUZ A LESÃO HEPÁTICA CAUSADA PELA SOBREDOSE DE APAP	52
5.9 A DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE NEUTRÓFILOS NEM SEMPRE ESTÁ RELACIONADA A DIMINUIÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA	56
5.10 INIBIÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) NÃO DIMINUI A LESÃO E NÃO AUMENTA A FUNÇÃO HEPÁTICA APÓS SOBREDOSE DE APAP	59
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1: ESTRUTURA TRIDIMENCIONAL DO LÓBULO HEPÁTICO.....	16
ILUSTRAÇÃO 2: METABOLISMO DO PARACETAMOL PELO HEPATÓCITO.....	18
ILUSTRAÇÃO 3: CONTEÚDO DOS GRÂNULOS E DE VESÍCULAS SECRETÓRIAS DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	22
ILUSTRAÇÃO 4: COMPONENTES GRANULARES DE NEUTRÓFILO E AS DROGAS UTILIZADAS PARA SUA INIBIÇÃO.	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - AVALIAÇÃO DA SOBREDOSE DE APAP EM CAMUNDONGOS.....	33
FIGURA 2 - NECROSE DE HEPATÓCITOS CAUSADA POR SOBREDOSE DE APAP	36
FIGURA 3 - RECRUTAMENTO E ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO APÓS OVERDOSE DE APAP EM CAMUNDONGOS	40
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA APÓS SOBREDOSE DE APAP EM CAMUNDONGOS.....	42
FIGURA 5 - DIMINUIÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA E AUMENTO DA FUNÇÃO COM A ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR DE DEGRANULAÇÃO APÓS SOBREDOSE DE APAP.....	46
FIGURA 6 - REDUÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA E DO NÚMERO DE NEUTRÓFILOS COM ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR GERAL DE PROTEASES APÓS SOBREDOSE DE APAP ...	48
FIGURA 7 - MEDIDAS DE FUNÇÃO E LESÃO HEPÁTICA COM ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDORES ESPECÍFICOS DE PROTEASES APÓS SOBREDOSE DE APAP.....	51
FIGURA 8 - DIMINUIÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA E AUMENTO DA FUNÇÃO APÓS ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR DE MMPs EM ANIMAIS INTOXICADOS POR APAP	55
FIGURA 9 - DIMINUIÇÃO DO NÚMERO DE NEUTRÓFILOS NÃO É CAPAZ DE DIMINUIR A LESÃO QUANDO ADMINISTRADO INIBIDOR DE RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILO 6 HORAS APÓS APAP	58
FIGURA 10 - ANÁLISES DE LESÃO E FUNÇÃO HEPÁTICA DE ANIMAIS QUE RECEBERAM INIBIDORES DE ROS APÓS SOBREDOSE DE APAP	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: INIBIDORES UTILIZADOS NO TRABALHO	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- Abs. – Absorbância
- AEBSF – *4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*
- ALT – Alanina aminotransferase
- ALF – *acute liver failure*; falência hepática aguda
- ANOVA – Análise de variância
- APAP – *N-acetyl-p-aminophenol*; *Acetaminophen*; Paracetamol
- BSA – Albumina bovina sérica
- CEBIO – Centro de bioterismo
- CEUA – Comitê de ética no uso de animais
- CG – Catepsina G
- CXCR1 – *CXC chemokine receptor 1*
- CXCR2 – *CXC chemokine receptor 2*
- DAMPs – Padrões moleculares associados a dano
- DC – Célula dendrítica
- DILI – *Drug-Induced Liver Injury*; Lesão hepática induzida por medicamento
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPI – Diphenyleneiodonium chloride
- ECM – matriz extracelular
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- epm – Erro padrão da média
- E-64 – *N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide*
- GSH – Glutathiona
- hCAP-18 – Catelicidina
- HCl – Ácido clorídrico
- HClO – Ácido hipocloroso
- HETAB – *Hexadecyltrimethylammonium bromide*
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
- ICG – *indocyanine green*; Verde indocianina
- i.p. – Intraperitoneal

I/R – isquemia/reperfusão
i.v. – Intravenoso
IVM- *intravital microscopy*; Microscopia intravital
KC – Célula de kupffer
KO – knockout
MMPs – Metaloproteinases de matriz
MPO – Mieloperoxidase
NAC – N-acetilcisteína
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NAPQI – N-acetil-para-benzoquinona imina
NE – Elastase de neutrófilo
NETs – *Neutrophil extracellular traps*
NGAL – Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilo
NK – Célula *natural killer*
NKT – Célula *natural killer T*
 O_2^- – Superóxido
OH – Hidroxila
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Salina tamponada com fosfato
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR3 – Proteinase 3
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões
RCF – Força centrífuga relativa
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
TMB – Tetrametilbenzidina
4-ABAH – *4-aminobenzoic hydrazide*

RESUMO

O fígado possui papel vital desempenhando funções biosintéticas, metabólicas e detoxificantes. Apesar de sua conhecida capacidade de regeneração, em algumas condições como excesso de medicamentos, ele pode ser danificado, comprometendo suas funções e a vida do indivíduo. A lesão hepática induzida por droga (DILI) tem sido mais frequente em todo o mundo devido à maior facilidade de acesso a fármacos pela população. Dentre as diversas drogas comercializadas, o paracetamol (APAP) está sendo usado de forma indiscriminada, sendo a sobredose de APAP a maior causa de falência hepática aguda (ALF). A lesão estéril causada por APAP leva a um processo inflamatório com recrutamento de vários leucócitos ao fígado, mas em casos de inflamação aguda como na necrose hepática, neutrófilos são os primeiros a serem recrutados e migram em grande quantidade. Essas células amplificam a lesão hepática e pouco se sabe sobre o mecanismo efetor dessa amplificação. Considerando isso, tivemos como objetivo identificar os componentes granulares presentes nos neutrófilos responsáveis pela amplificação da lesão hepática após sobredose de APAP. Iniciamos o trabalho utilizando inibidores de degranulação e observamos uma diminuição da lesão hepática com o uso da doxiciclina e do cromoglicato nas doses de 50 e 100 mg/kg, e um aumento da função hepática com a maior dose de cromoglicato. Dentre os componentes presentes nos grânulos, inibimos primeiro as proteases com um coquetel inespecífico e observamos diminuição da lesão hepática e redução do número de neutrófilos com a dose de 1,4 mg/animal. Após isso buscamos identificar quais proteases estavam sendo responsáveis pelo resultado encontrado. Para isso, inibimos cada protease separadamente e observamos que a inibição de MMPs com 2 mg/kg do inibidor de MMP1 foi capaz de melhorar a lesão e a função hepática, além de reduzir em 40% a atividade de MPO. Para entendermos se a redução da lesão era decorrente da redução dos neutrófilos, inibimos o seu recrutamento, com o inibidor DF 2156A, e observamos que mesmo com a diminuição no número de neutrófilos a lesão não foi alterada. Inibimos também a produção de ROS por diversas vias e não houve alteração na lesão e na função hepática. Concluímos assim, que as MMPs são responsáveis por aumentar a morte de hepatócitos e diminuir a funcionalidade hepática após sobredose de APAP.

Palavras-chaves: neutrófilos, metaloproteinases de matriz, fígado, paracetamol, falência hepática aguda.

ABSTRACT

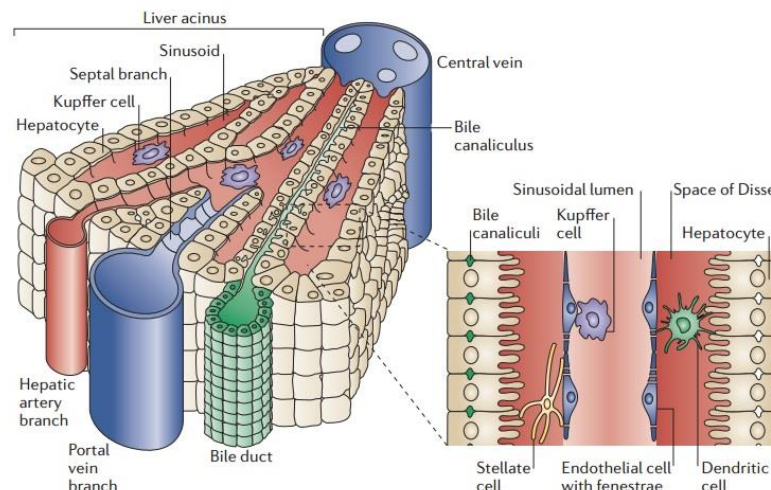
The liver plays pivotal role in biosynthetic, metabolic and detoxifying functions. Despite its known capacity for regeneration, in some conditions like excess medication, it can be damaged, compromising their function and the individual healthy. Drug-induced liver injury (DILI) has been more frequent in the world due to the easy access to drugs by the population. Among the several marketed drugs, acetaminophen (APAP) is being used indiscriminately, and the APAP overdose is the leading cause of acute liver failure (ALF). The sterile injury caused by APAP leads to inflammatory process with recruitment of many leukocytes to the liver, but in cases of acute inflammation, such as the liver necrosis, neutrophils are the first to be recruited and migrate in large numbers. These cells eventually amplify the liver damage and little is known about the effector mechanism of this amplification. Considering this, our objective was to identify the granular components present in neutrophils responsible for amplification of liver injury after APAP overdose. We started working using degranulation inhibitors and a reduction of the liver damage with the use of doxycycline and cromoglycate at doses of 50 and 100 mg/kg, and an increase in liver function with the highest dose of cromoglycate was observed. Among the components present in the granules, we first inhibit unspecific proteases with a cocktail and observed decreased liver damage and decreased number of neutrophils at the dose of 1.4 mg/mouse. After that, we tried to identify which proteases were being responsible for the results found. To this end, we inhibited each protease separately and found that the inhibition of MMPs with 2 mg/kg of MMP1 inhibitor was able to reduce the damage and improve liver function in addition to 40% reduction in MPO activity. To understand whether the reduction of the injury was due to the reduction of neutrophils, we inhibited neutrophils recruitment, with DF2156A inhibitor, and noted that even with the decrease in the number of neutrophils injury has not changed. We also inhibited ROS production in many pathways and there was no change in the injury and liver function. This way, we concluded that MMPs are responsible for increase hepatocyte death and decrease the hepatic functionality after APAP overdose.

Keywords: neutrophil, matrix metalloproteinases, liver, acetaminophen, acute liver injury.

1. INTRODUÇÃO

BIOLOGIA HEPÁTICA E ETIOPATOGENIA DA FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

O fígado é responsável por desempenhar funções metabólicas, detoxificantes e biosintéticas vitais para o organismo. Os hepatócitos, que constituem até 80% do total da massa hepática, são as células capazes de metabolizar nutrientes, armazenar vitaminas e glicogênio, sintetizar enzimas, proteínas, colesterol, fatores de coagulação sanguínea, albumina, bile e vitamina A (Reynolds, 1977; Rossaint e Zarbock, 2013). Microscopicamente, o fígado é dividido em lóbulos, que são diversas seções poliédricas constituídas pelos cordões de hepatócitos, capilares sinusoides e um vaso central, denominado veia centrolobular. Localizado na periferia dos lóbulos encontra-se o espaço porta, composto por ramos da veia porta, da artéria hepática e do ducto biliar. É pelo espaço porta que o fluxo sanguíneo entra no fígado, percorre o tecido por meio dos sinusoides e flui lentamente em direção à veia centrolobular e vasos subsequentes, deixando o órgão por meio da veia hepática. 30% do volume sanguíneo corpóreo passa pelo fígado a cada minuto, sendo a maior parte do sangue proveniente da veia porta e uma pequena parte proveniente da artéria hepática (Vollmar e Menger, 2009; Jenne e Kubes, 2013). (Ilustração 1)



(Adams e Eksteen, 2006)

Ilustração 1: estrutura tridimensional do lóbulo hepático

Organização dos componentes de um lóbulo hepático. Cordões de hepatócitos entremeados por capilares sinusoides, células de Kupffer residentes nos sinusoides, células dendríticas e estelares no espaço de Disse. Artéria hepática, veia porta e ducto biliar formando o espaço porta e veia central que é o destino do sangue proveniente do espaço porta.

O fígado também possui um elaborado sistema imune composto por macrófagos residentes (células de Kupffer – KCs), células *natural killer* (NK), T *natural killer* (NKT), linfócitos T, células dendríticas (DCs), componentes do complemento, e a capacidade de recrutar rapidamente um grande número de leucócitos do sangue periférico (Jenne e Kubes, 2013; Xu *et al.*, 2014a).

Embora seja conhecida a grande capacidade de regeneração do fígado, em certas condições como injúrias induzidas por toxinas, bactérias, vírus, medicamentos e álcool, extensas lesões podem comprometer as funções hepáticas e o órgão perde a capacidade regenerativa (Luedde *et al.*, 2014). Essas condições podem levar a falência hepática aguda (ALF – *Acute liver failure*), que é uma doença caracterizada por lesão hepática rápida e grave, que leva a perda de função metabólica e imunológica do fígado e a sintomas como encefalopatia, coagulopatia, descontrole metabólico e falência múltipla de órgãos (Bernal *et al.*, 2010; Lee, 2012). As causas da ALF são muitas e variam de um país para outro. Nos países em desenvolvimento as principais causas são as hepatites virais, principalmente as do tipo A, B e E. Já em países desenvolvidos como os Estados Unidos e grande parte da Europa a ALF é predominantemente causada por drogas ou medicamentos (DILI – *Drug-Induced Liver Injury*). Além desses fatores, doenças hepáticas autoimunes, choque séptico e isquemia podem levar a ALF (Bernal *et al.*, 2010; Lee, 2012; Wang *et al.*, 2013). Apesar de ser uma doença rara que atinge menos de 10 indivíduos a cada 1 milhão de habitantes por ano, a ALF acomete indivíduos de qualquer faixa etária, possui alto índice de mortalidade e altos custos financeiros associados à doença (Suk e Kim, 2012; Bjornsson *et al.*, 2013).

A DILI vem sendo mais frequente em todo o mundo devido a maior facilidade de acesso a fármacos pela população. Dentre as diversas drogas comercializadas, o paracetamol (APAP - N-acetyl-p-aminophenol; *acetaminophen*) vem sendo usado de forma indiscriminada, sendo o analgésico mais consumido sem receita médica nos Estados Unidos e no norte da Europa (Bernal *et al.*, 2010). Sendo assim, a intoxicação por APAP é a maior causa de ALF e a sobredose não intencional é a forma mais comumente observada (Saito *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013).

A lesão hepática causada por APAP é devido ao excesso de N-acetil-parabenzoquinona imina (NAPQI), um metabólito extremamente reativo gerado por oxidação pelo citocromo P450. Em excesso, o metabólito NAPQI elimina os estoques celulares de glutathiona (GSH) e se liga covalentemente a biomoléculas, desestabilizando mitocôndrias, membranas, citoesqueleto, e os sistemas enzimáticos do hepatócito,

induzindo fragmentação de DNA e instabilidade genômica (Ray *et al.*, 1993; Hinson *et al.*, 2010). Esses eventos culminam na necrose de hepatócitos e perda da função hepática, o que pode levar à ALF e frequentemente à morte (Ilustração 2).

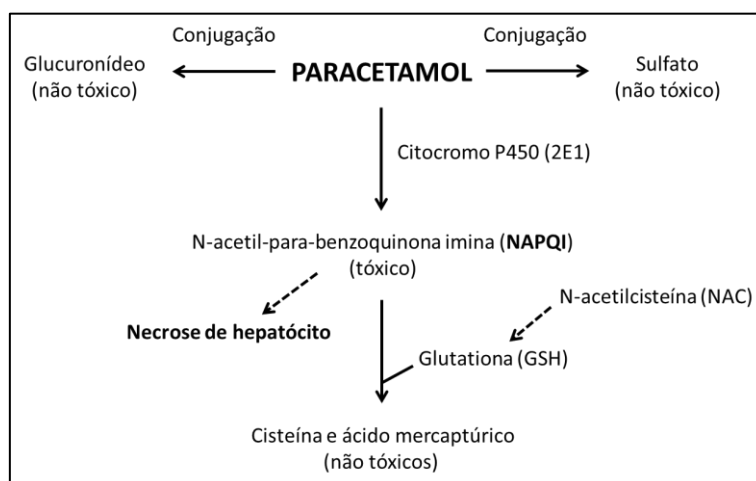


Ilustração 2: metabolismo do paracetamol pelo hepatócito

Formação de compostos não tóxicos e tóxicos no metabolismo do APAP. O componente tóxico NAPQI é o responsável por causar a morte de hepatócitos, sendo acumulado pela falta do GSH. Com a reposição do GSH pela NAC a toxicidade é revertida com a formação de componentes não tóxicos.

Tratamentos para ALF ainda são muito escassos. A utilização de N-acetilcisteína (NAC) é a terapia mais utilizada para casos de DILI, especialmente pela intoxicação por APAP, porém esse método só é eficaz se aplicado dentro das primeiras 24 horas (Saito *et al.*, 2010). Em casos refratários, a única alternativa é o transplante hepático de emergência, porém menos de 10% dos transplantes de fígado são realizados em pacientes com ALF (Bernal e Wendon, 2013). Sendo assim, é de grande importância o estudo e a descoberta de novos tratamentos que melhore a qualidade de vida dos pacientes e diminua a mortalidade e os gastos com a saúde.

Ainda que a DILI seja considerada uma doença que ocorre na ausência de microrganismos (também considerada lesão estéril), ocorre a ativação do sistema imune inato e a produção de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas que agem no recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (Licata, 2016). Além da DILI outras doenças de enorme importância clínica também apresentam esse mesmo perfil, como infarto do miocárdio, gota, silicose, doença de Alzheimer e aterosclerose (Rock *et al.*, 2010). À medida que o processo inflamatório se desenvolve, vários leucócitos são recrutados, mas em casos de inflamação aguda como na necrose hepática, neutrófilos

são as primeiras células a chegar ao sítio inflamatório, migrando em grande quantidade (McDonald *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2012).

FUNÇÕES IMUNOLÓGICAS E CONSEQUÊNCIAS DO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos compõem até 70% do total de leucócitos na circulação humana e até 25% em camundongos. Possuem núcleo lobulado e seu citoplasma possui grânulos e vesículas secretórias. Essa célula possui um tempo de vida curto na circulação, permanecendo por cerca de 8 horas em humanos e 1,5 horas em camundongos. Porém, quando essas células são ativadas e migram para os tecidos seu tempo de vida pode aumentar de 6 a 15 vezes (Kolaczkowska e Kubes, 2013; Xu *et al.*, 2014b). Para manter o número de células tão efêmeras na circulação, uma enorme quantidade de neutrófilos é produzida constantemente pela medula óssea. Cerca de 10^{11} células são produzidas diariamente e esse mesmo número é removido da circulação por macrófagos na medula óssea, fígado e baço, sendo esse processo estritamente bem regulado (Summers *et al.*, 2010). Durante um processo inflamatório, essas células são recrutadas para o tecido aderindo ao endotélio ativado e seguindo um gradiente quimiotático, que pode ser derivado da produção de quimiocinas, produtos bacterianos, mediadores lipídicos, componentes do sistema do complemento, ou ainda moléculas derivadas da necrose (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Uma vez que os neutrófilos chegam ao sítio alvo, eles iniciam suas funções como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), degranulação (liberação de enzimas granulares), fagocitose ou formação de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps* - armadilhas extracelulares de neutrófilos) (Brinkmann *et al.*, 2004). Essas funções são ativadas quando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*) são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – *Pattern recognition receptors*) presentes nos neutrófilos. Esses PAMPs são lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, RNA viral e DNA bacteriano. Porém os PRRs dos neutrófilos também estão envolvidos com o reconhecimento de padrões moleculares associados a dano (DAMPs – *Damage-associated molecular patterns*) que são componentes liberados pelas células necróticas como peptídeos formilados mitocondriais, DNA mitocondrial e proteínas como actina e histonas. Devido a isso, os neutrófilos respondem de forma semelhante à lesão

infeciosa e estéril, causando muitas vezes a morte de células saudáveis na lesão estéril (Jenne e Kubes, 2013; Kolaczowska e Kubes, 2013; Mayadas *et al.*, 2014).

A produção de ROS ocorre em um processo chamado “explosão oxidativa”, em que podem ser formados radicais livres como o superóxido (O_2^-) e a hidroxila (OH), ou compostos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO). Uma enzima chave para a produção de ROS é NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) que consiste em seis subunidades que se encontram separadas em condições fisiológicas, impedindo a produção de ROS e consequentes danos às células. Porém, quando essas subunidades se unem o complexo NADPH oxidase é ativado e ocorre a produção de compostos oxidantes. As proteínas p22phox e gp91phox estão presentes na membrana dos grânulos específicos, ou das vesículas secretórias, e juntas formam o citocromo b558, que é o núcleo catalítico da reação. Após a ativação do neutrófilo as três subunidades regulatórias, p67phox, p47phox e p40phox são fosforiladas e juntamente com a subunidade Rac2 são deslocadas do citoplasma para a membrana do fagolisossomo, ativando o complexo NADPH oxidase que é capaz de transferir elétrons do NADPH para o oxigênio molecular gerando O_2^- . Esse radical livre pode, espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD), ser transformado em H_2O_2 . Após a ativação no neutrófilo e liberação da enzima mieloperoxidase (MPO) no fagolisossomo, ocorre a formação de HClO, a partir do H_2O_2 , que pode destruir a membrana de microrganismos e exercer o seu papel microbicida (Faurichou e Borregaard, 2003). A formação de ROS é muito importante na ação antimicrobiana, uma vez que são compostos altamente reativos e podem matar patógenos dentro do fagolisossomo. Além disso, essas moléculas podem regular a resposta imune, pois são moléculas pequenas que difundem pela membrana e são rapidamente formadas e degradadas (Manda-Handzlik e Demkow, 2015).

Além da produção de ROS, pode ocorrer a degranulação do neutrófilo que também possui papel essencial na eliminação de patógenos e sinalização da inflamação. Os grânulos são formados pelo complexo de Golgi em diferentes estágios de maturação dos neutrófilos. Os grânulos azurófilos, também conhecidos como grânulos primários, são os maiores e os primeiros a serem formados durante a maturação. Eles contêm MPO (a enzima citada anteriormente responsável pela formação de HClO), defensinas, lisozimas e algumas serinoproteases como elastase de neutrófilo (NE), proteinase 3 (PR3) e catepsina G (CG). Essas serinoproteases possuem atividade proteolítica em componentes da matriz extracelular como a elastina, ficronectina, laminina, colágeno

tipo IV e vitronectina, além de possuírem propriedades antimicrobianas (Owen e Campbell, 1999; Faurschou e Borregaard, 2003). A segunda classe é composta pelos grânulos específicos, ou secundários, que são menores que os azurófilos e formados depois, no decorrer da maturação do neutrófilo. Eles contêm um amplo arsenal microbicida que inclui lactoferrina, NGAL (lipocalina associada a gelatinase de neutrófilo), hCAP-18 (catelicidina) e lisozimas, além de possuírem colagenase (metaloproteinase de matriz – 8 - MMP 8) e subunidades da NADPH oxidase em sua membrana (citocromo b558). A terceira classe, composta por grânulos gelatinase ou terciários, são menores que os grânulos específicos e os últimos a serem formados. Eles servem como local de armazenamento de algumas metaloproteinases (MMPs), tais como gelatinase (MMP 9) e leucolisina (MMP 25). Essa MMPs são armazenadas na forma inativa e depois de exocitadas sofrem ativação e são capazes de degradar as principais estruturas da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, proteoglicanos e laminina. Diferentemente dos outros grânulos, esses últimos são pobres em substâncias antibióticas (Faurschou e Borregaard, 2003; Amulic *et al.*, 2012; Kolaczowska e Kubes, 2013).

As vesículas secretórias são formadas por endocitose nas fases finais da maturação dos neutrófilos, possuindo em seu interior proteínas derivadas do plasma, como albumina. As membranas das vesículas secretórias contêm vários receptores importantes para a ativação e migração do neutrófilo, além de promover a reciclagem dos receptores da membrana e atuar como reservatório dos mesmos (Amulic *et al.*, 2012). (Ilustração 3).

Os compartimentos intracelulares de neutrófilos se diferenciam na capacidade de exocitose. Os grânulos gelatinase e as vesículas secretórias são exocitados mais facilmente. Eles são importantes reservatórios de enzimas que degradam matriz e de receptores de membranas necessários durante a aderência e a diapedese dos neutrófilos, diferentemente dos grânulos azurófilos e específicos, que têm pouca capacidade de exocitose, participando principalmente das atividades microbianas dos neutrófilos através da mobilização de enzimas antimicrobianas no fagossoma ou no exterior da célula (Faurschou e Borregaard, 2003; Borregaard *et al.*, 2007).

Azurophil granules		Specific granules		Gelatinase granules		Secretory vesicles	
Membrane	Matrix	Membrane	Matrix	Membrane	Matrix	Membrane	Matrix
CD63	Acid β -glycerophosphatase	CD11b/CD18	Cathelicidin (hCAP-18)	CD11b/CD18	Acetyltransferase	Alkaline phosphatase	Tetranectin
CD68		CD15		Cytochrome- <i>b</i> ₅₅₈	Annexin I		Hepatocyte growth factor
Presenilin-1	Acid	CD66a	Collagenase	Diacylglycerol	Gelatinase	CD10	
uPA receptor	mucopolysaccharide	CD66b	Gelatinase	deacetylating enzyme	Heparanase	CD11b/CD18	
V-type H ⁺ -ATPase	α ₁ -Antitrypsin	Cytochrome- <i>b</i> ₅₅₈	Heparanase		Hepatocyte growth factor	CD13	Plasma proteins (albumin)
	Azurocidin/CAP37/heparin-binding protein	fMLP receptor	Hepatocyte growth factor	fMLP receptor		CD14	
	Bactericidal/permeability-increasing protein	Fibronectin receptor	Histaminase	NRAMP-1	Lysozyme	CD16 (FcRIII)	
	Cathepsins	G protein α subunit	Human neutrophil lipocalin	SCAMP	β ₂ -Microglobulin	CR1 (CD35)	
	Elastase	Laminin receptor	Lactoferrin	SNAP-23, SNAP-25	SGP28 (CRISP-3)	C1q receptor	
	β -Glucuronidase	Leukolysin	Lysosome	uPA receptor	uPA	Cytochrome <i>b</i> -558	
	β -Glycerophosphatase	NB1 antigen	β ₂ -Microglobulin	VAMP-2		Decay-accelerating factor	
	Lysozyme	19-kDa (P1C3) protein	NGAL	V-type H ⁺ -ATPase		fMLP receptor	
	α -Mannosidase	Rap1, Rap2	SGP28 (CRISP-3)	Sialidase		Leukolysin	
	Myeloperoxidase	SCAMP	Sialidase	lipase		VAMP-2	
	<i>N</i> -Acetyl- β -glucosaminidase	SNAP-23, SNAP-25	Vitamin B ₁₂ -binding protein	Ubiquinone		Phospholipase D	
	Proteinase-3	Stomatin	YKL-40 (human cartilage glycoprotein 39)				
	Sialidase	Thrombospondin receptor					
	Ubiquitin-protein conjugates	TNF receptor					
	uPA	uPA receptor					
		VAMP-2					
		Vitronectin receptor					
		IL10 receptor					

fMLP *N*-formyl-methionine-leucine-phenylalanine, uPA urokinase-type plasminogen activator

(Oliveira *et al.*, 2013)

Ilustração 3: Conteúdo dos grânulos e de vesículas secretórias de neutrófilos humanos

Componentes presentes no interior e na membrana de grânulos e vesículas secretórias de neutrófilo.

Outra função bem conhecida dos neutrófilos é a fagocitose. Essas células são capazes de capturar microrganismos de forma rápida e eficaz. Uma série de cascatas de sinalização e rearranjos do citoesqueleto levam à fagocitose de microrganismos e posterior liberação dos grânulos primários e secundários ao fagossomo com liberação dos seus conteúdos antimicrobianos e a ativação do complexo NADPH oxidase (Kruger *et al.*, 2015).

O mecanismo mais recente descoberto realizado pelos neutrófilos é a produção de NETs que são fibras extracelulares constituídas de componentes nucleares e granulares e que são capazes de matar bactérias no espaço extracelular (Brinkmann *et al.*, 2004). O componente mais abundante em NETs é o DNA, que é liberado da célula na forma descondensada, e juntamente com ele encontra-se histonas, elastase de neutrófilo, catepsina G, MPO, lactoferrina e gelatinase (Brinkmann *et al.*, 2004).

A importância dos neutrófilos na amplificação da lesão tecidual tem sido um dos principais focos de estudos realizados por nosso grupo de pesquisa. Marques e colaboradores (2012) demonstraram que após a intoxicação por APAP, quimiocinas e componentes mitocondriais ajudam na ativação e migração de neutrófilos no fígado, amplificando a lesão e contribuindo para uma resposta inflamatória sistêmica. Mais recentemente, demonstraram que a sobredose de APAP gera uma grande liberação de

DNA no fígado, que se deposita no órgão e leva a uma intensa migração de neutrófilos principalmente para dentro das zonas de necrose hepática. Em ambos os trabalhos, a redução da inflamação hepática causada por DNA ou a remoção de neutrófilos do fígado leva a uma redução significativa da lesão hepática total (Marques *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2015).

Além dos nossos trabalhos, vários grupos de pesquisa relataram a amplificação da lesão hepática pelo neutrófilo em diferentes modelos, como na lesão por isquemia-reperfusão (Jaeschke, 2006), hepatite alcoólica (Mookerjee *et al.*, 2007), choque séptico (Jaeschke *et al.*, 1991), colestase (Gujral *et al.*, 2003) e também durante hepatotoxicidade induzida por halotano (You *et al.*, 2006) e concavalina A (Bonder *et al.*, 2004).

Apesar da capacidade do neutrófilo de amplificar a lesão hepática ser conhecida, ainda não é sabido o mecanismo efetor e quais dos seus componentes intracelulares são responsáveis por essa amplificação.

2. JUSTIFICATIVA

Os neutrófilos são células imprescindíveis para o bom funcionamento do organismo, pois são responsáveis pela eliminação de patógenos, indução e resolução da inflamação, remodelação tecidual, dentre outras funções. Porém, na lesão estéril causada por APAP, eles são responsáveis por amplificar a lesão hepática. Não se sabe quais componentes do neutrófilo são responsáveis pelo aumento da lesão. Sendo assim, buscamos elucidar os fatores responsáveis pelo aumento da morte de hepatócitos na lesão aguda estéril mediada por neutrófilo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos efetores de neutrófilos que são relevantes na amplificação da lesão hepática aguda causada por APAP.

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer parâmetros de avaliação da lesão e da função hepática em camundongos intoxicados por APAP;
2. Investigar o efeito dos seguintes inibidores sobre a lesão hepática induzida por APAP:
 - Inibidores de degranulação;
 - Inibidores de proteases granulares;
 - Inibidores de enzimas envolvidas na geração de ROS, incluindo MPO e NADPH oxidase;
3. Avaliar o recrutamento de neutrófilos para a lesão, por meio de IVM, com o uso dos diferentes tipos de inibidores.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 10 a 12 semanas de idade provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (22°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA protocolo n°. 331 / 2015).

4.2 O modelo de lesão hepática

O modelo utilizado foi o de lesão hepática induzida por sobredose de APAP. Neste modelo, os camundongos são submetidos a jejum de 15 horas na noite anterior ao experimento e, posteriormente, são tratados com uma única administração intragástrica (gavagem) de APAP dissolvido em salina estéril aquecida. Os animais controle receberam apenas salina aquecida pela mesma via. Os animais foram sacrificados 24 horas após a administração do APAP.

4.3 Eutanásia e obtenção de amostras

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) diluídos em salina fisiológica. Após anestesia foram submetidos a laparotomia seguida de sangria por cisão simultânea da artéria aorta e veia cava inferior, de onde a amostra de sangue foi retirada para obtenção do soro e posteriores análises. O fígado foi retirado e dividido em fragmentos para realização de análises histológicas e ensaios bioquímicos.

4.4 Confeção de lâminas histológicas e avaliação quantitativa da necrose hepática

O fígado coletado foi lavado com salina e um fragmento do lobo superior fixado em formol 4% tamponado por no mínimo 48 horas. Posteriormente, as amostras foram

desidratadas em soluções de álcool etílico de concentrações crescentes, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. Cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando micrótomo e corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). A partir dos cortes histológicos foram realizadas análises quantitativas, sendo mensuradas as áreas necróticas. Imagens de três campos por animal (10x) foram capturadas a partir de uma microcâmara Moticam 2500 (Motic) acoplada a um microscópio óptico BX41 (Olympus). As imagens foram analisadas com a utilização do *software* ImageJ. Os resultados foram obtidos a partir da média de cada grupo e expressos em porcentagem de necrose hepática/área.

4.5 Dosagem de alanina aminotranferase (ALT)

A dosagem de ALT foi realizada no soro dos animais para quantificar a lesão hepática. O ensaio cinético é o método recomendado pela *International Federation of Clinical Chemistry*, desta forma, a atividade de ALT foi determinada utilizando-se o Kit Transaminase ALT cinético (Bioclin), adaptado conforme as instruções do fabricante. Para realização do teste, foram incubados 20 µL das amostras em placas de poliestireno com 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) e posteriormente acrescidos 200 µL/poço do reagente de trabalho (37° C), presente no Kit utilizado. Quando necessário as amostras foram diluídas em solução salina 1:10 ou 1:20. Após um minuto, foi realizada a primeira leitura (340 nm) em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader) e leituras subsequentes foram efetuadas após 1, 2 e 3 minutos a partir da primeira leitura, totalizando 4 leituras. Por fim, a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minutos}$) das 4 leituras foi calculada e o resultado obtido por meio da fórmula $\Delta A/\text{minutos} \times 2494$. Os resultados foram expressos em unidade/litro (U/L).

4.6 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A enzima mieloperoxidase é expressa especificamente por neutrófilos, então quando encontrada no tecido é indicativo de que houve infiltrado neutrofílico. Desse modo, a quantificação dessa enzima pode, mesmo que indiretamente, determinar a intensidade do infiltrado de neutrófilos no tecido. Resumidamente, parte do fígado coletado e armazenado a -20 °C foi pesado, macerado em solução de extração de citocinas (PBS 1x, NaCl 0,4M, Tween 20 – 0,05%, BSA 0,076M, PMSF 0,098mM,

DMSO 0,1%, cloreto de benzetônio 0,1mM, EDTA 1mM e aprotinina 24µg) e centrifugado a 806400 RCF por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado com solução tampão (PBS - Na₂ EDTA 0,015M) e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em NaCl 0,2% gelado, após 20 segundos foi adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelado. O material foi rapidamente homogeneizado e submetido a nova centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em solução tampão (PBS - HETAB 0,5%). As amostras foram rapidamente homogeneizadas e congeladas e descongeladas seguidamente três vezes em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 25 µL de cada amostra foi adicionado à placa de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), onde o branco foi representado por PBS. Em seguida os poços receberam uma solução de DMSO com o substrato TMB 1,6 mM, e a placa incubada em câmara escura por cinco minutos a 37°C. Adicionado H₂O₂ 0,002% em PBS - HETAB 0,5% e incubado novamente nas mesmas condições. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M e a placa lida a absorvância de 450 nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader).

4.7 Ensaio de elastase

O ensaio de elastase foi feito com o mesmo sobrenadante coletado para MPO. 100 µL de cada amostra foram adicionados à placa de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), em seguida, adicionado uma solução do substrato de elastase (Tris / HCl 0,1 M, DMSO 20% e N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide - M4765-Sigma - 400µM) e a placa incubada em câmara escura, a 37°C por 90 minutos. Após esse tempo de reação foi feita a leitura da placa a absorvância de 405 nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader).

4.8 Teste de depuração de verde indocianina (indocyanine green – ICG)

O verde indocianina é um corante que não sofre transformação química e é rapidamente excretado pelo fígado, sendo possível fazer uma avaliação da função hepática de acordo com o *clearance* desse corante. Desta forma, animais controle e APAP receberam por via intravenosa uma solução de 20 mg/kg de verde indocianina

(Cardiogreen, Sigma Aldrich) diluído em água de injeção estéril. Após 20 minutos os animais foram anestesiados, eutanasiados e o soro coletado para análise. As amostras foram diluídas em água de injeção e plaqueadas (240 µL/poço) em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark). A absorbância foi medida em 800 nm em leitor de microplacas (Versa Max Microplate reader). O resultado obtido foi comparado a uma curva padrão do corante e expresso em µg/mL.

4.9 Reagentes e inibidores farmacológicos

Os animais receberam por via intravenosa diferentes tratamentos com inibidores dos mais diversos componentes presentes nos neutrófilos. Como inibidor de degranulação foi utilizado Cromoglicato (SIGMA), Doxiciclina (SIGMA) e Sulfasalazine (SIGMA).

As proteases foram inibidas primeiramente por um coquetel inibidor de proteases (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free) composto por inibidores de serinoproteases (AEBSF 2 mM; Aprotinin 0,2 µM), cisteínoproteases (E-64 14 µM), serino e cisteínoproteases (Leupeptin 1 µM), aminopeptidases (Bestatin 130 µM), proteases ácidas (Pestatin A 10 µM) e metaloproteinases (Phosphoramidon 1 µM). Após essa inibição inespecífica foram utilizadas drogas de maior especificidade como: inibidor de serinoproteases e cisteínoproteases (Leupeptin – Boehringer Mannheim), inibidor de serinoproteases (Aprotinin from bovine lung – SIGMA), inibidores de elastase (Sivelestat sodium salt hydrate – SIGMA; e Elastase Inhibitor II – CALBIOCHEM) e inibidores de metaloproteinases (Batimastat – SIGMA; MMP inibitor I – CALBIOCHEM; e Ilomastat – SIGMA).

Para inibição de ROS foi utilizado Apocinina (Apocynin - SIGMA) e DPI (Diphenyleneiodonium chloride - CALBIOCHEM) que são inibidores da NADPH oxidase e 4-ABAH (4-aminobenzoic hydrazide - SIGMA) que é inibidor de MPO.

Os animais receberam os inibidores por via intravenosa 6, 12 e 18 horas após a administração do APAP. Os inibidores foram diluídos em salina (cloreto de sódio 0,9%), DMSO (máximo 5%), etanol (máximo 5%) ou metanol (máximo 5%) dependendo da sua solubilidade.

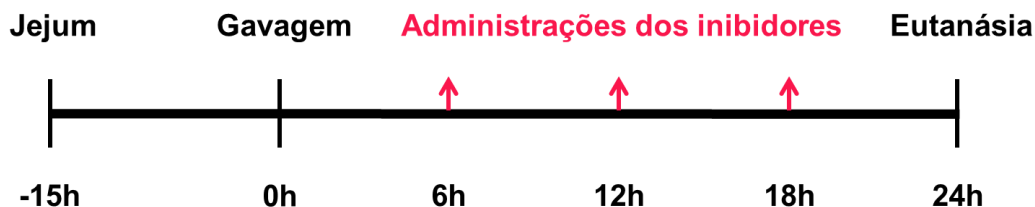
Para inibir o recrutamento de neutrófilos, foi utilizado 30mg/kg de DF 2156A diluído em salina e administrado com uma dose 6 horas após o APAP. (Tabela 1).

Inibidor	Solubilidade	Dose
Cromoglicato	Salina	5; 50 e 100mg/kg
Sulfassalazina	DMSO	1 e 10mg/kg
Doxiciclina	Salina	5; 50 e 100mg/kg
Coquetel inibidor de proteases	Salina	0,28; 1,4 e 2,8mg/animal
Leupeptina	Salina	20mg/kg
Aprotinina	Salina	1; 10 e 100µg/animal
Sivelestat	Salina	40mg/kg
Inibidor elastase II	Metanol	0,1; 1 e 10mg/kg
Batmastat	DMSO	0,2; 2 e 20mg/kg
Inibidor MMP1	Salina	0,2; 2 e 20mg/kg
Ilomastat	DMSO	0,12; 1,2 e 12mg/kg
Apocinina	Etanol	10mg/kg
DPI	DMSO	0,2 e 2mg/kg
4-ABAH	Salina	80mg/kg
DF 2156A	Salina	30mg/kg

Tabela 1: Inibidores utilizados no trabalho

Os diferentes inibidores utilizados ao longo do estudo com a sua respectiva solubilidade e a dosagem utilizada.

4.10 Desenho experimental



4.11 Microscopia confocal intravital

A microscopia intravital do fígado de camundongos foi realizada utilizando microscópio confocal Nikon Ti C2 equipado com objetiva de 10x. Usando um pequeno suporte de acrílico, posicionamos o camundongo anestesiado e expusemos o fígado a uma distância adequada da objetiva. Em seguida, uma área do tecido hepático foi selecionada e focalizada, a partir da qual imagens e vídeos foram coletados para análises subsequentes. Contagem de neutrófilos foi feita usando o programa Volocity (PerkinElmer).

4.12 Análise estatística

A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste usado foi one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Se os dados não possuíam distribuição normal, o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunn foram aplicados. Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm). O nível de significância foi definido como $p < 0,05$. Os gráficos e estatística foram feitos com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Dose de 600 mg/kg de APAP causa lesão hepática aguda

Para iniciar nosso estudo, realizamos uma curva tempo-resposta com a dose de 600 mg/kg de APAP já previamente estabelecida pelo nosso grupo (Marques *et al.*, 2015). Foi confirmada que a sobredose de 600 mg/kg de APAP por via oral causa lesão hepática aguda nos camundongos. Observou-se uma mortalidade de aproximadamente 40% dos animais tratados com APAP já na sexta hora após a administração (Figura 1-A). Os níveis séricos de ALT dos animais que receberam APAP estavam aumentados já na sexta hora após a administração, e permaneceram altos até a trigésima sexta hora (Figura 1-B). Com isso, concluímos que a dose de 600 mg/kg é eficaz em causar lesão hepática em camundongos, e que ela atinge o pico 12 horas após a administração.

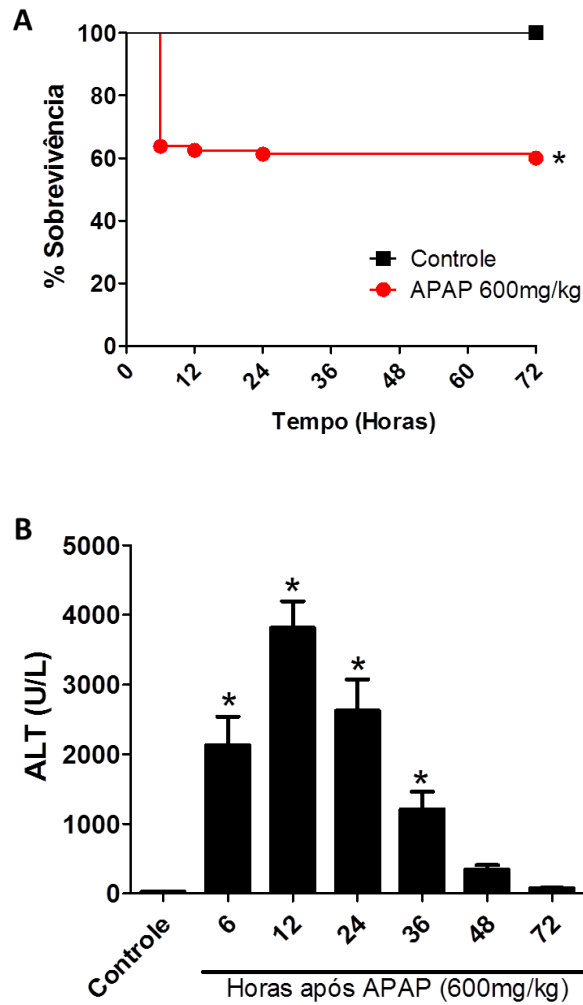
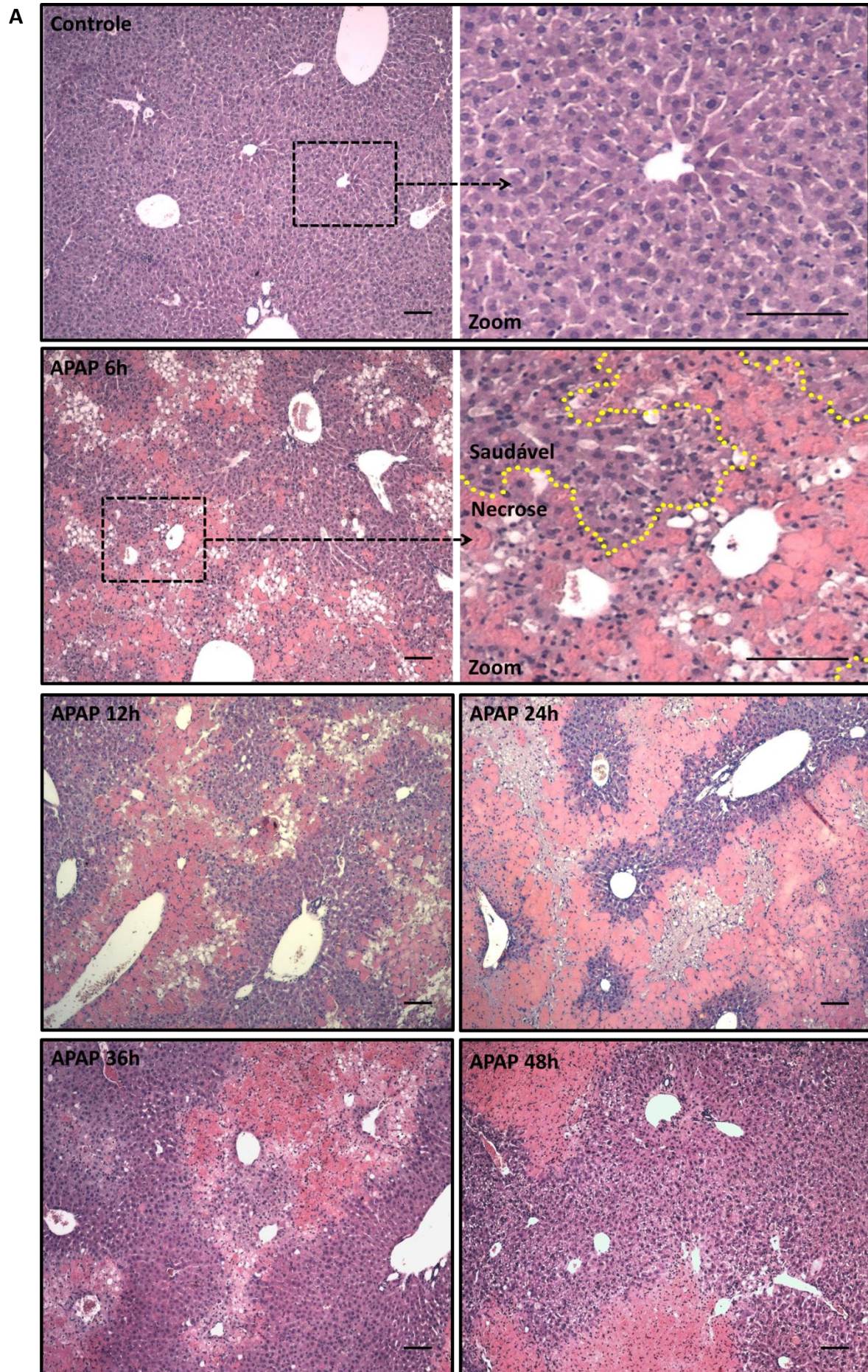


Figura 1 - Avaliação da sobredose de APAP em camundongos

(A) Tempo de sobrevivência de camundongos gavados com 600 mg/kg de APAP e salina (controle). (B) Dosagem dos níveis de ALT sérica ao longo de 72 horas após administração de 600 mg/kg de APAP. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2 Sobredose de APAP leva a necrose de hepatócitos

Após administração da sobredose de APAP observamos, por histologia, que o fígado apresenta necrose ao redor da veia centrolobular, chegando a até 65% da área quantificada (Figura 2-A e B). Nos cortes histológicos corados com H&E pudemos observar os hepatócitos íntegros encontrados nos camundongos controle. Nos camundongos tratados com APAP, após 6 horas observamos grandes áreas de necrose. A quantificação da necrose confirma a eficácia da dose de 600 mg/kg de APAP em causar lesão hepática já na sexta hora após administração, e mostra que é possível observar o dano microscopicamente.



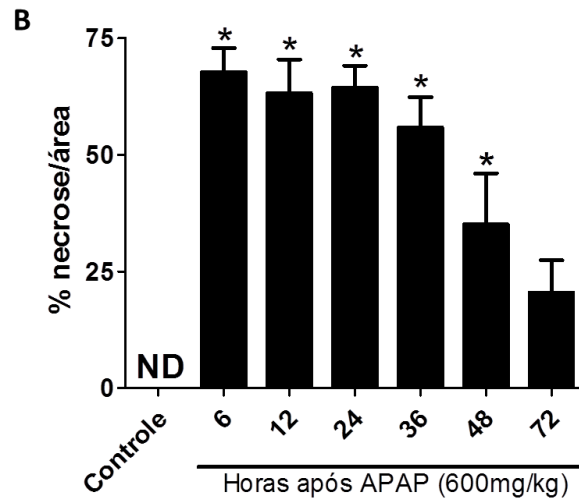


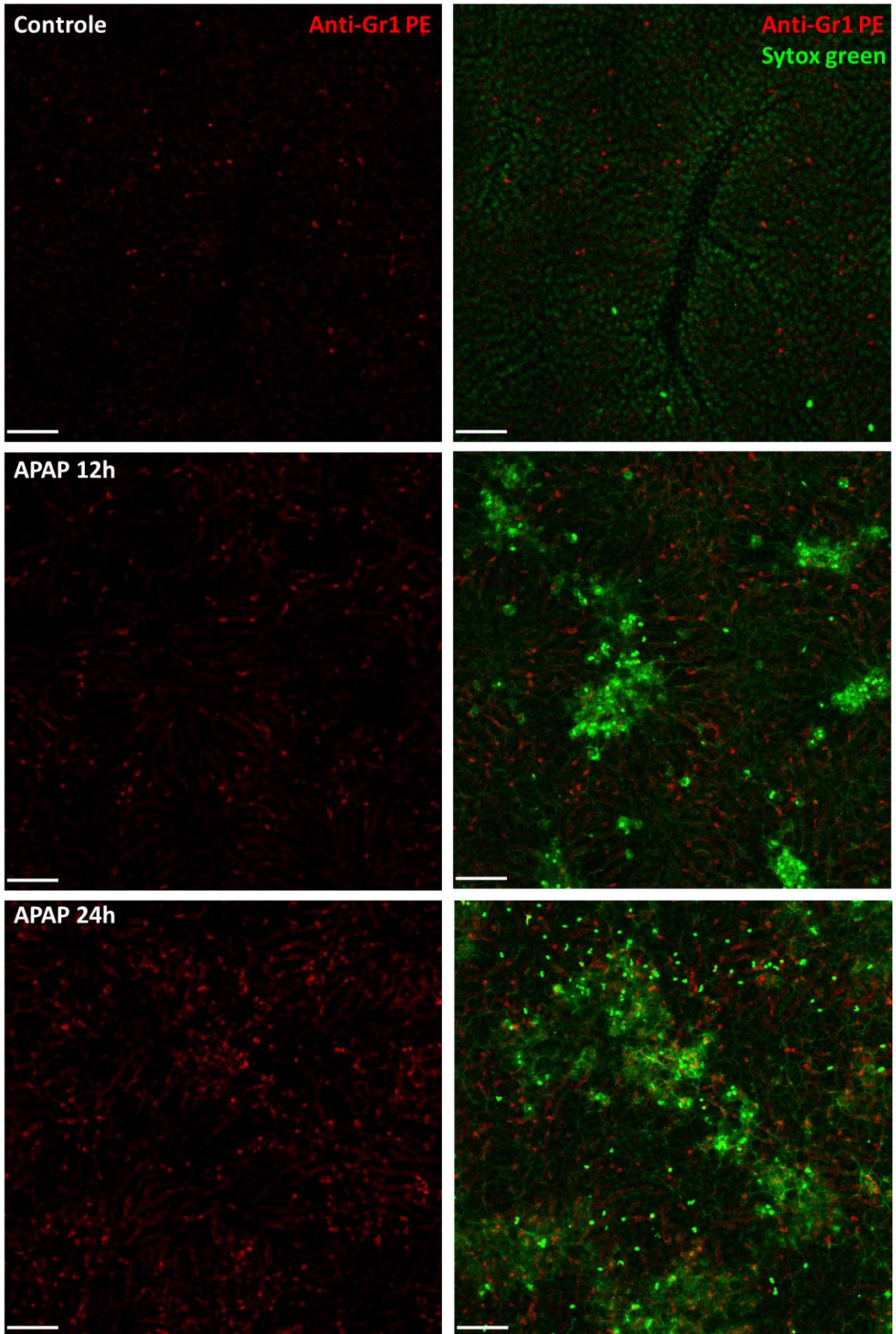
Figura 2 - Necrose de hepatócitos causada por overdose de APAP

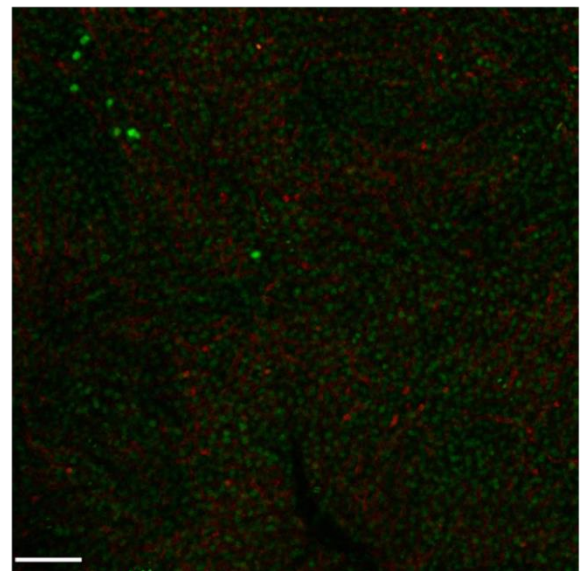
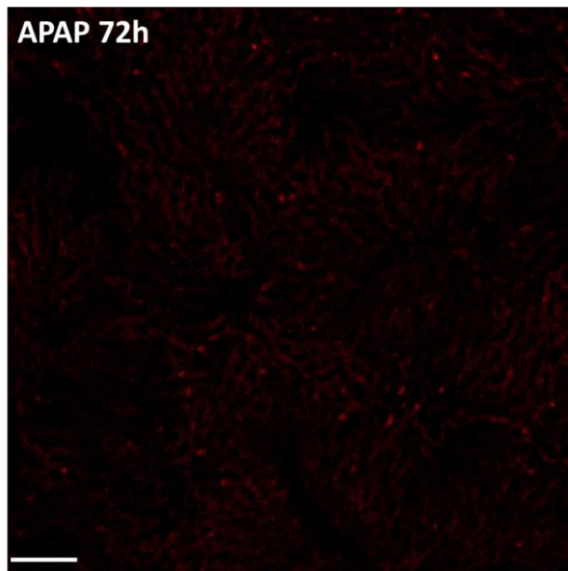
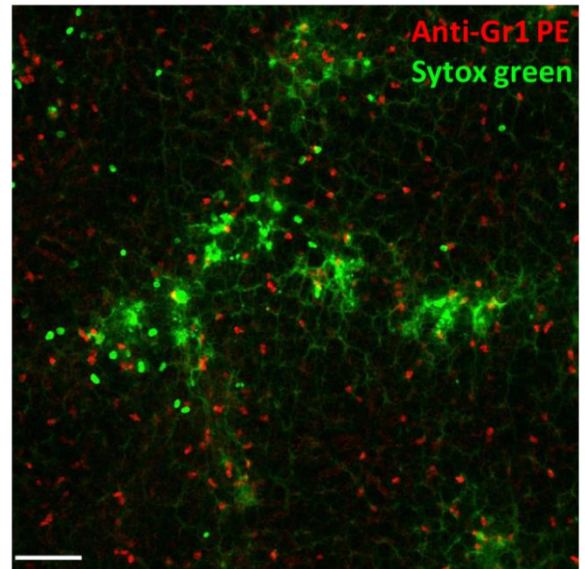
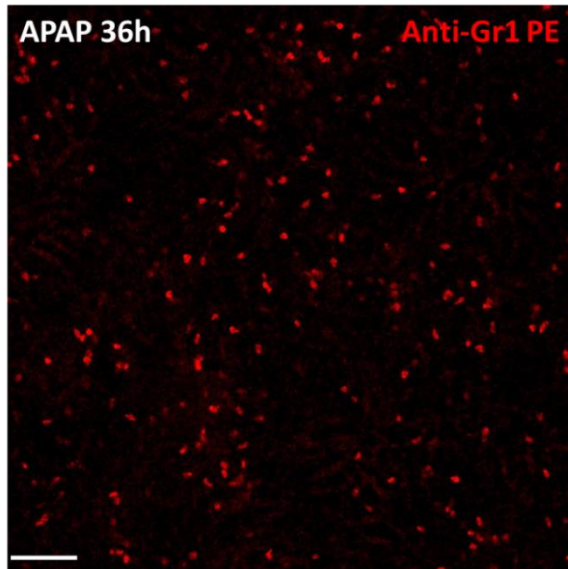
(A) Fotos de cortes histológicos de fígado corados com H&E. Primeira imagem à direita zoom de hepatócitos saudáveis e segunda imagem à direita zoom da área de necrose. Escala: 100 μ m. (B) Quantificação da área de necrose hepática a partir das fotos adquiridas na histologia. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.3 Sobredose de APAP causa acúmulo de neutrófilos no fígado

Utilizando microscopia intravital (IVM- *intravital microscopy*) foi possível observar e quantificar o acúmulo de neutrófilos no fígado, principalmente nas áreas ricas em DNA (Figura 3-A e B) e, ainda, observar a intensa deposição de DNA no tecido hepático. Observamos também um aumento da atividade da enzima MPO que está diretamente relacionada à quantidade de neutrófilos no tecido, e apresenta-se aumentada na décima segunda e na vigésima quarta hora após administração do APAP (Figura 3-C). Com esse experimento foi possível observar, no decorrer do tempo, a mobilização de neutrófilos para o fígado, atingindo o pico na vigésima quarta hora após administração do APAP.

A





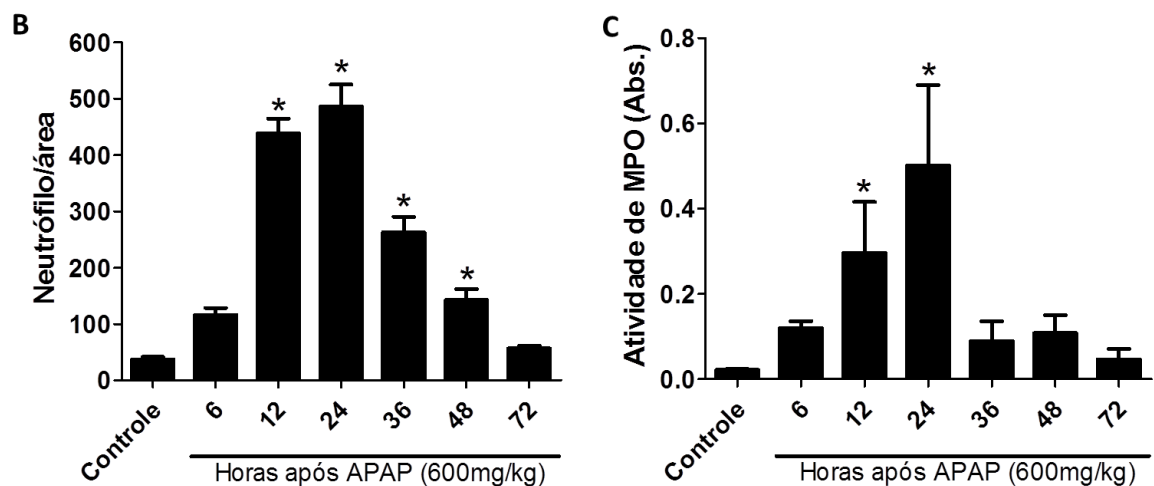


Figura 3 - Recrutamento e acúmulo de neutrófilos no fígado após sobredose de APAP

(A) IVM de fígado de animais tratados com APAP. DNA evidenciado em verde (Sytox green) e neutrófilos em vermelho (anti-GR1 PE). Escala: 100 μ m. (B) Quantidade de neutrófilos por campo obtido a partir de imagens de IVM. (C) Atividade de MPO no fígado de animais tratados com APAP ao longo de 72 horas. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5.4 Sobredose de APAP causa perda da função hepática

Os parâmetros até então utilizados neste trabalho, e pelo nosso grupo de pesquisa, medem a lesão hepática e mostram a morte de hepatócitos, porém, nenhum dos parâmetros avaliavam a funcionalidade do fígado após a sobredose de APAP. Em busca dessa medida, padronizamos a avaliação da função hepática a partir da depuração do corante verde indocianina (ICG- *indocyanine green*). Esse corante se liga a proteínas do plasma, como a albumina, sendo eliminado exclusivamente pelos hepatócitos, juntamente com a bile, sem sofrer alteração. Assim, o *clearance* desse corante nos revela como está a função dos hepatócitos, de forma que quanto menor a quantidade do corante encontrada no sangue, melhor a função hepática. É o teste quantitativo de função hepática mais utilizado na clínica e muitos estudos mostram sua utilidade para avaliar a função hepática de pacientes com sepse, com falência hepática aguda e pacientes que tiveram secção parcial do fígado ou foram submetidos a transplante (Hoekstra *et al.*, 2013; Halle *et al.*, 2014; Levesque *et al.*, 2016). Com a avaliação da depuração do ICG no nosso modelo, foi possível observar que a função hepática está prejudicada até o terceiro dia após APAP, apresentando função semelhante aos animais controle no sexto dia (Figura 4-A).

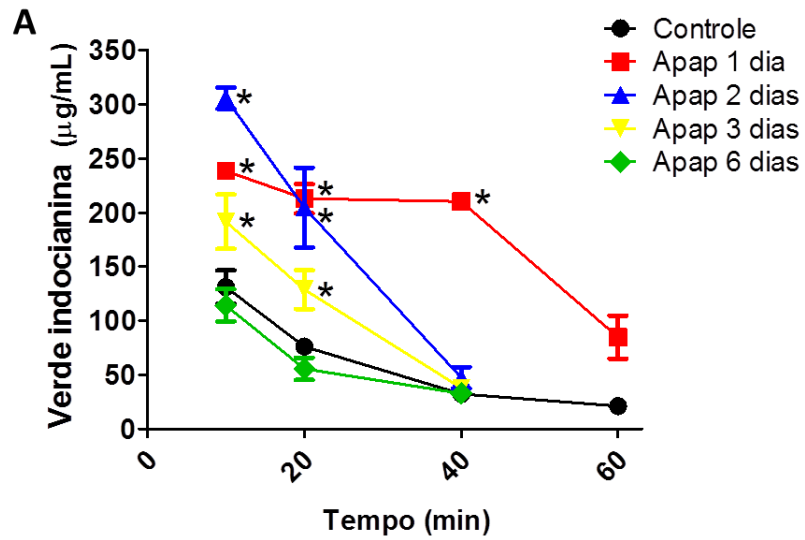


Figura 4 - Avaliação da função hepática após sobredose de APAP em camundongos

(A) *Clearance* do corante ICG no soro de animais controle e com 1, 2, 3 e 6 dias após administração de APAP. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Com a lesão hepática por APAP estabelecida e padronizada utilizamos inibidores dos diversos componentes presentes nos neutrófilos para verificar a ação dos mesmos na lesão. O esquema a seguir mostra os principais componentes granulares do neutrófilo e as respectivas drogas que utilizaremos para sua inibição (Ilustração 4):

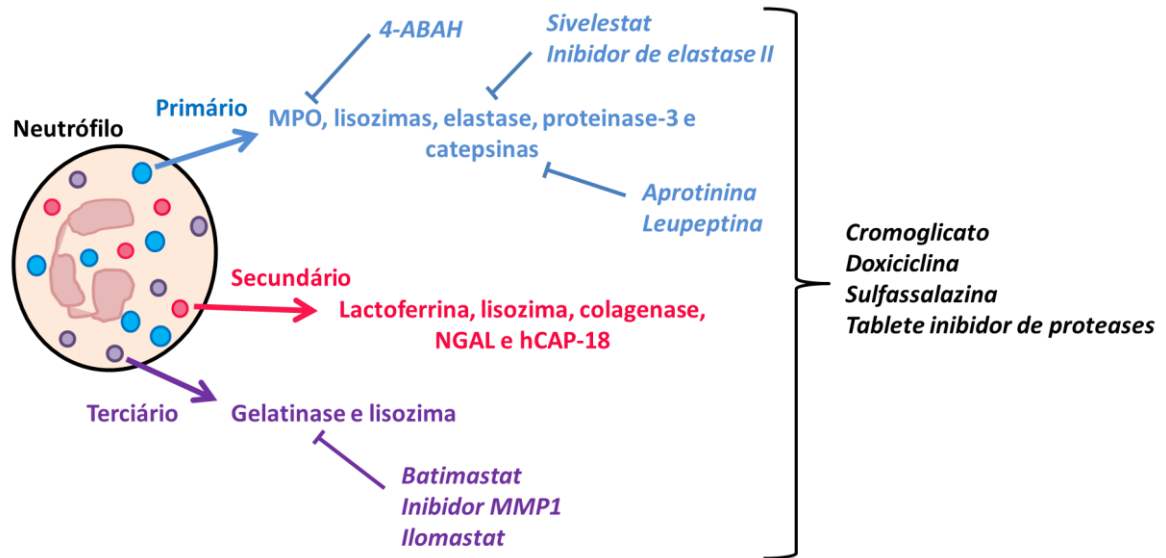
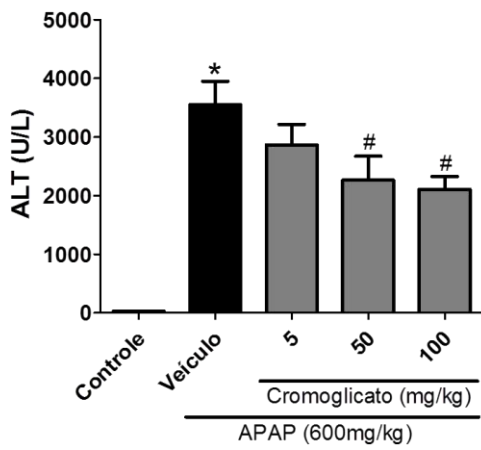


Ilustração 4: Componentes granulares de neutrófilo e as drogas utilizadas para sua inibição.

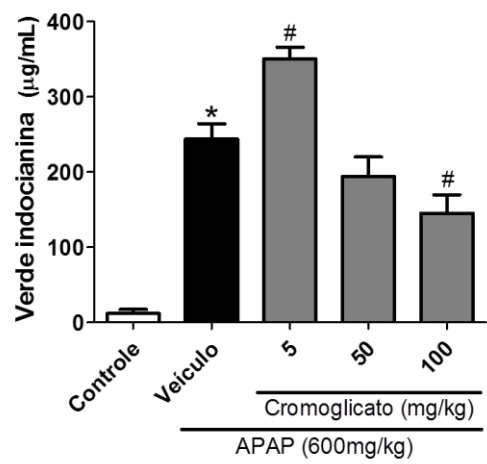
5.5 Inibição da degranulação reduz a lesão e aumenta a função hepática após sobredose de APAP

Utilizamos inibidores de degranulação para observarmos o que aconteceria com a lesão e a função hepática se impedíssemos a liberação dos conteúdos granulares dos neutrófilos. Utilizamos cromoglicato, doxiciclina e sulfassalazina (Figura 5-A, B e C, respectivamente) e constatamos que a inibição com cromoglicato gerou redução da lesão e aumento na função hepática, e o uso da doxiciclina foi capaz de diminuir a lesão hepática após sobredose de APAP. Apesar dessas mudanças, a atividade de MPO não se alterou com o uso do cromoglicato e foi maior com a dose de 100 mg/kg de doxiciclina. Com o uso dos inibidores foi possível confirmar que componentes presentes nos grânulos dos neutrófilos são responsáveis pela amplificação da lesão e perda da função hepática causada por APAP.

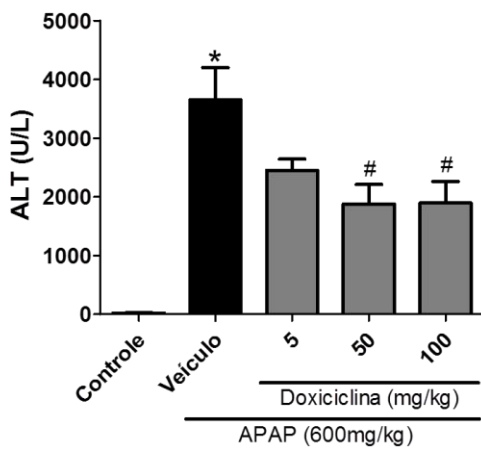
A-1) inibidor de degranulação



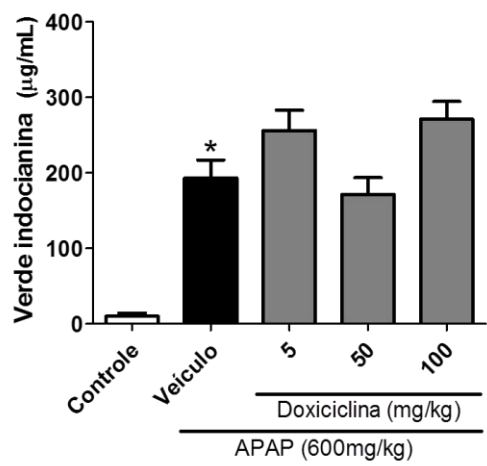
A-2) inibidor de degranulação



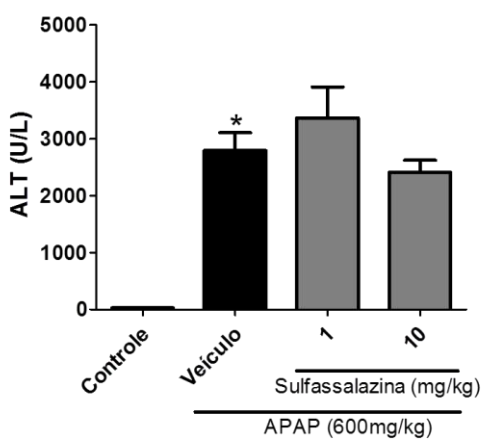
B-1) inibidor de degranulação



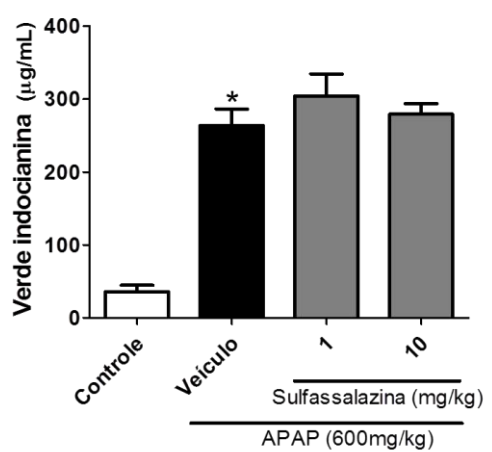
B-2) inibidor de degranulação



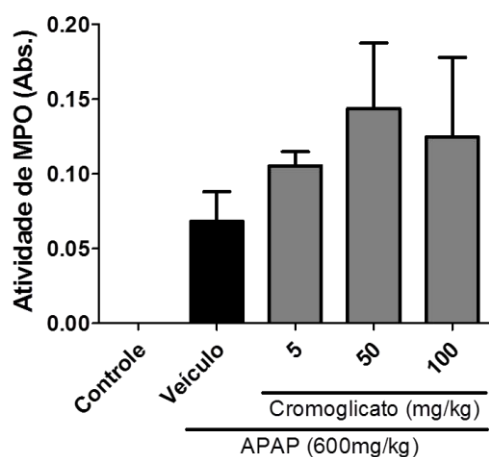
C-1) inibidor de degranulação



C-2) inibidor de degranulação



D) inibidor de degranulação



E) inibidor de degranulação

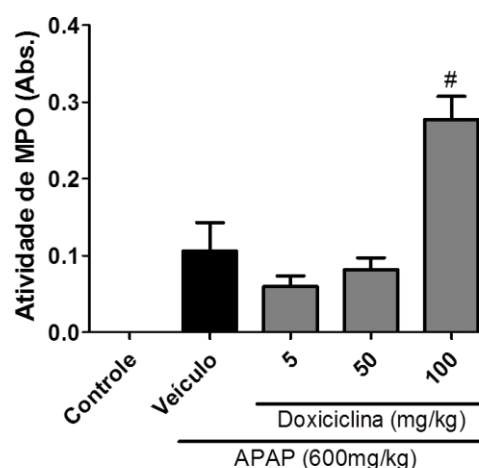


Figura 5 - Diminuição da lesão hepática e aumento da função com a administração de inibidor de degranulação após sobredose de APAP

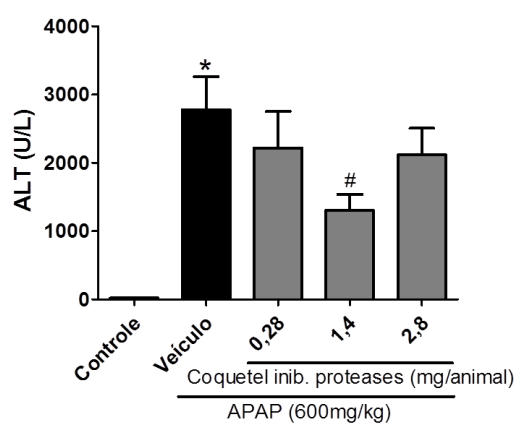
(A, B e C) Níveis de ALT (1) e ICG (2) no soro de animais gavados com APAP e tratados com diferentes doses de cromoglicato, doxíciclina e sulfassalazina, respectivamente. (D e E) Níveis de MPO no fígado de animais administrados com APAP e tratados com diferentes doses de cromoglicato e doxíciclina, respectivamente. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # = $p < 0,05$ em relação ao grupo APAP (veículo).

5.6 Inibição de proteases reduz a lesão hepática causada por sobredose de APAP

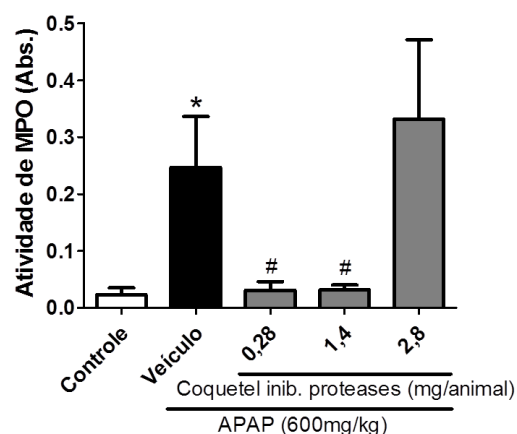
Iniciamos a busca pelos componentes de neutrófilo responsáveis pela amplificação da lesão usando um inibidor amplo para proteases. Utilizamos um coquetel composto por inibidor de serinoproteases (AEBSF - *4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride*), de aminopeptidases (*bestatin*), de serino e cisteínoproteases (leupeptina), de cisteínoproteases (E-64 - *N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide*), de serinoproteases (aprotinina), de proteases ácidas (Pepstatina A) e de metaloproteinases (Fosforamidon). Com a utilização desse coquetel inespecífico observamos a diminuição dos níveis de ALT sérico (Figura 6-A), assim como os níveis hepáticos de MPO e elastase (Figura 6-B e C, respectivamente). A partir das análises de imagens IVM, observamos também uma redução na quantidade de neutrófilos recrutados nos animais tratados com o inibidor de proteases (Figura 6-D).

Com esse resultado foi possível observar a redução da lesão hepática e do recrutamento de neutrófilo na dose de 1,4 mg/animal do coquetel inibidor após sobredose de APAP, mostrando que uma ou mais proteases inibidas por este coquetel tem papel no aumento da lesão hepática.

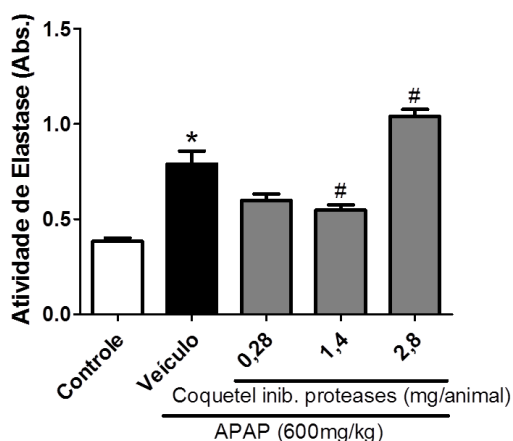
A) inibidor de proteases



B) inibidor de proteases



C) inibidor de proteases



D) inibidor de proteases

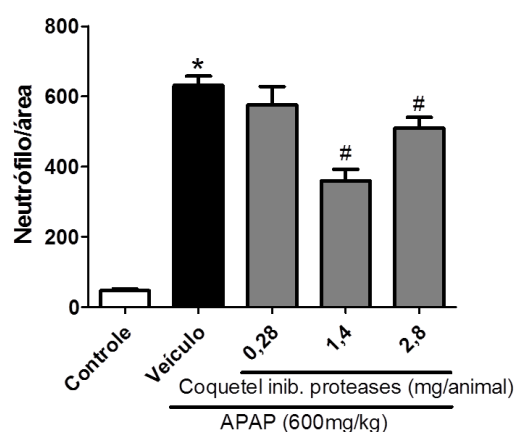


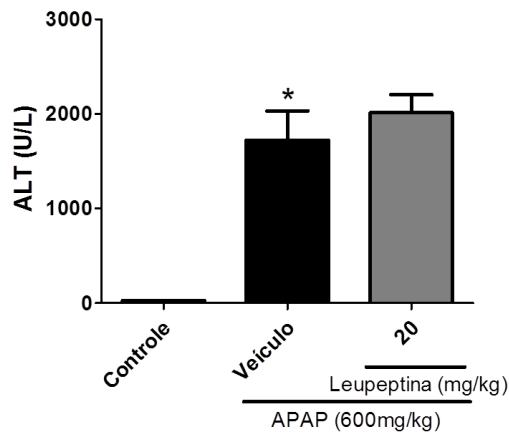
Figura 6 - Redução da lesão hepática e do número de neutrófilos com administração de inibidor geral de proteases após sobredose de APAP

(A) Dosagem dos níveis de ALT sérica e atividade de (B) MPO e (C) elastase no fígado de camundongos gavados com APAP e tratados com diferentes doses do coquetel inibidor de proteases. (D) Quantidade de neutrófilo no fígado de animais que receberam APAP e foram tratados com diferentes doses de inibidor de proteases. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # = $p < 0,05$ em relação ao grupo APAP (veículo).

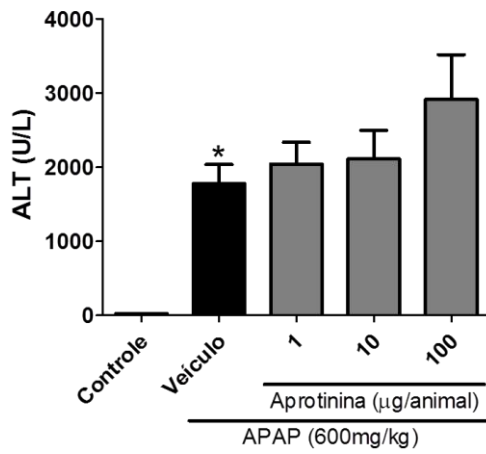
5.7 Inibição de serinoproteases, cisteínoproteases e elastase não interferem na lesão e nem na função hepática causada por sobredose de APAP

Após o indicativo de que alguma protease seria importante na amplificação da lesão hepática, começamos a utilizar inibidores específicos para os diferentes tipos de proteases. Começamos pelos inibidores de serino e cisteínoproteases (Leupeptina - Figura 7-A), de serinoproteases (Aprotinina - Figura 7-B) e de elastase de neutrófilo (Sivelestat e inibidor de elastase II - Figura 7-C e D, respectivamente). A inibição de cada uma dessas proteases isoladamente não causou alteração na lesão e na função hepática.

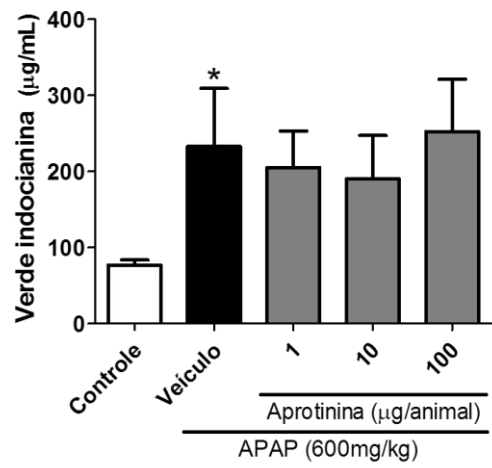
A) inibidor de serino e cisteinoproteases



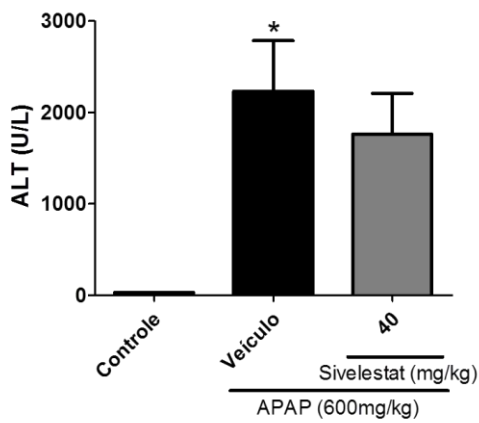
B-1) inibidor de serinoproteases



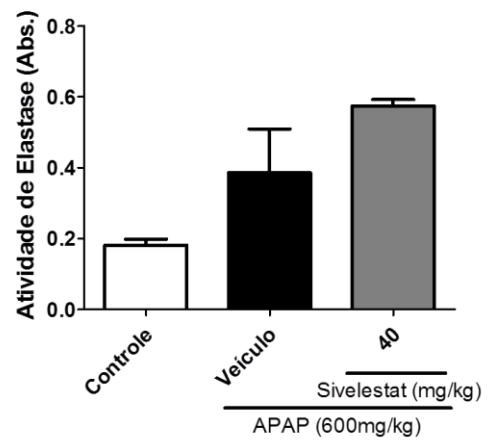
B-2) inibidor de serinoproteases



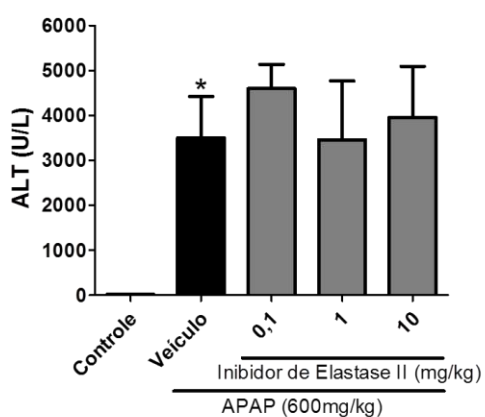
C-1) inibidor de elastase de neutrófilo



C-2) inibidor de elastase de neutrófilo



D-1) inibidor de elastase de neutrófilo



D-2) inibidor de elastase de neutrófilo

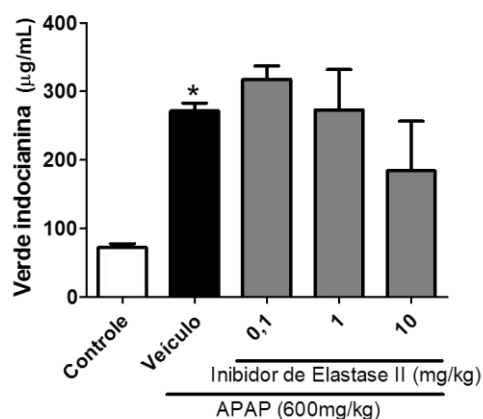


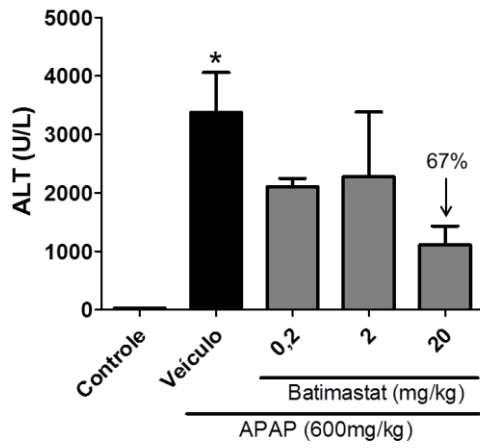
Figura 7 - Medidas de função e lesão hepática com administração de inibidores específicos de proteases após sobredose de APAP

(A) Níveis de ALT sérica de animais que receberam APAP e foram tratados com leupeptina. (B) Níveis de ALT (1) e ICG (2) no soro de animais administrados com APAP e tratados com diferentes doses de aprotinina. (C) Dosagem de ALT (1) e elastase (2) de animais administrados com APAP e tratados com sivelestat. (D) Níveis de ALT (1) e ICG (2) de animais gavados com APAP e tratados com diferentes doses de inibidor de elastase II. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

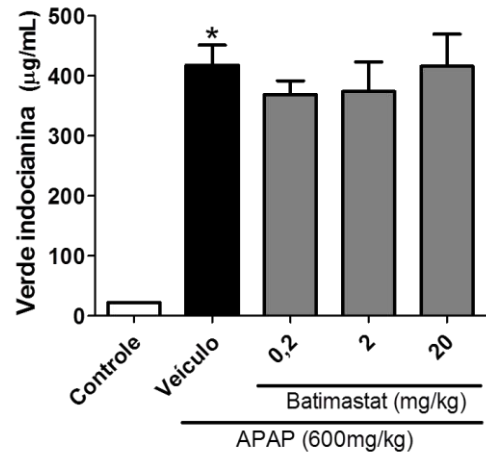
5.8 Inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs) reduz a lesão hepática causada pela sobredose de APAP

Ainda inibindo proteases, utilizamos três drogas diferentes para inibir MMPs, que foram: Batimastat, que inibe MMP 1, 2, 3, 7 e 9; ilomastat, que inibe MMP 1, 2, 3, 8 e 9; e inibidor de MMP1, capaz de inibir MMP 1, 3, 8, e 9. (Figura 8-A, B e C, respectivamente). O inibidor de MMP1 foi capaz de reduzir a lesão e aumentar a função hepática, como observado na redução dos níveis séricos de ALT e dos níveis de ICG nos camundongos tratados com a dose de 2 mg/kg desse inibidor (Figura 8 – C-1 e C-2, respectivamente). A diminuição da lesão pode ser observada por imagens de cortes histológicos e obtidas a partir de IVM (Figura 8 – C-5 e C-6, respectivamente). Além disso, a atividade de MPO reduziu 40%, e a necrose 23%, nos animais que receberam a droga (Figura 8 – C-3 e 8 – C-4, respectivamente). O batimastat foi capaz de diminuir a lesão hepática em 67% na dose de 20 mg/kg (Figura 8 – A-1). Esse resultado nos mostra que MMPs são importantes na amplificação da lesão hepática causada por neutrófilo.

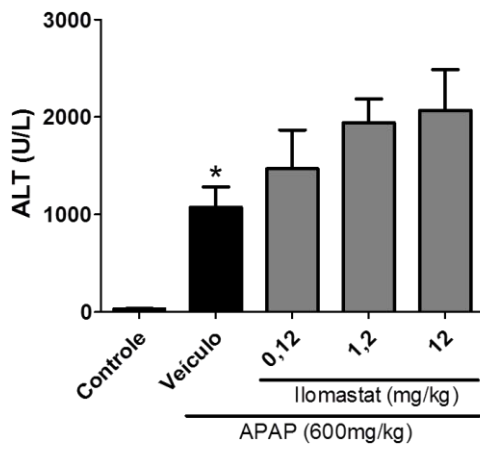
A-1) inibidor de MMP



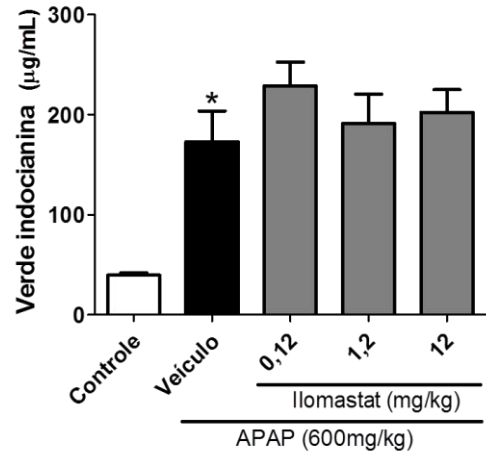
A-2) inibidor de MMP



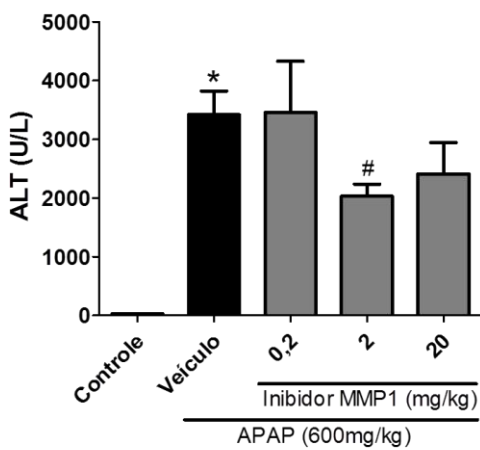
B-1) Inibidor de MMP



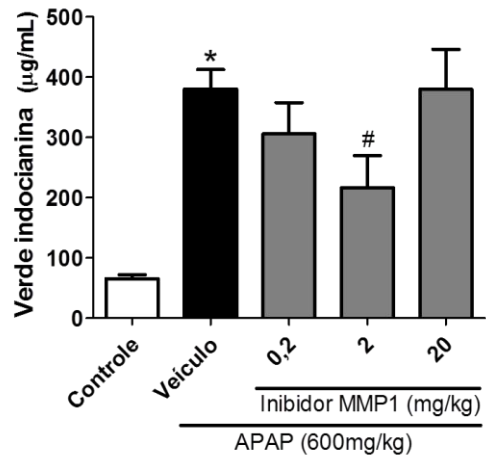
B-2) inibidor de MMP



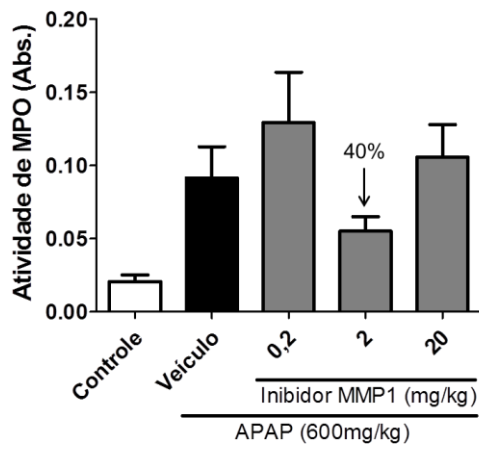
C-1) inibidor de MMP



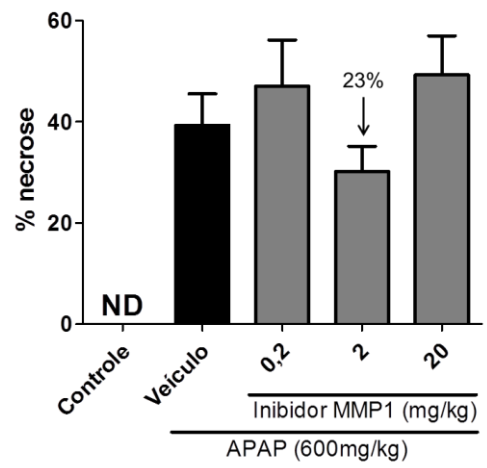
C-2) inibidor de MMP



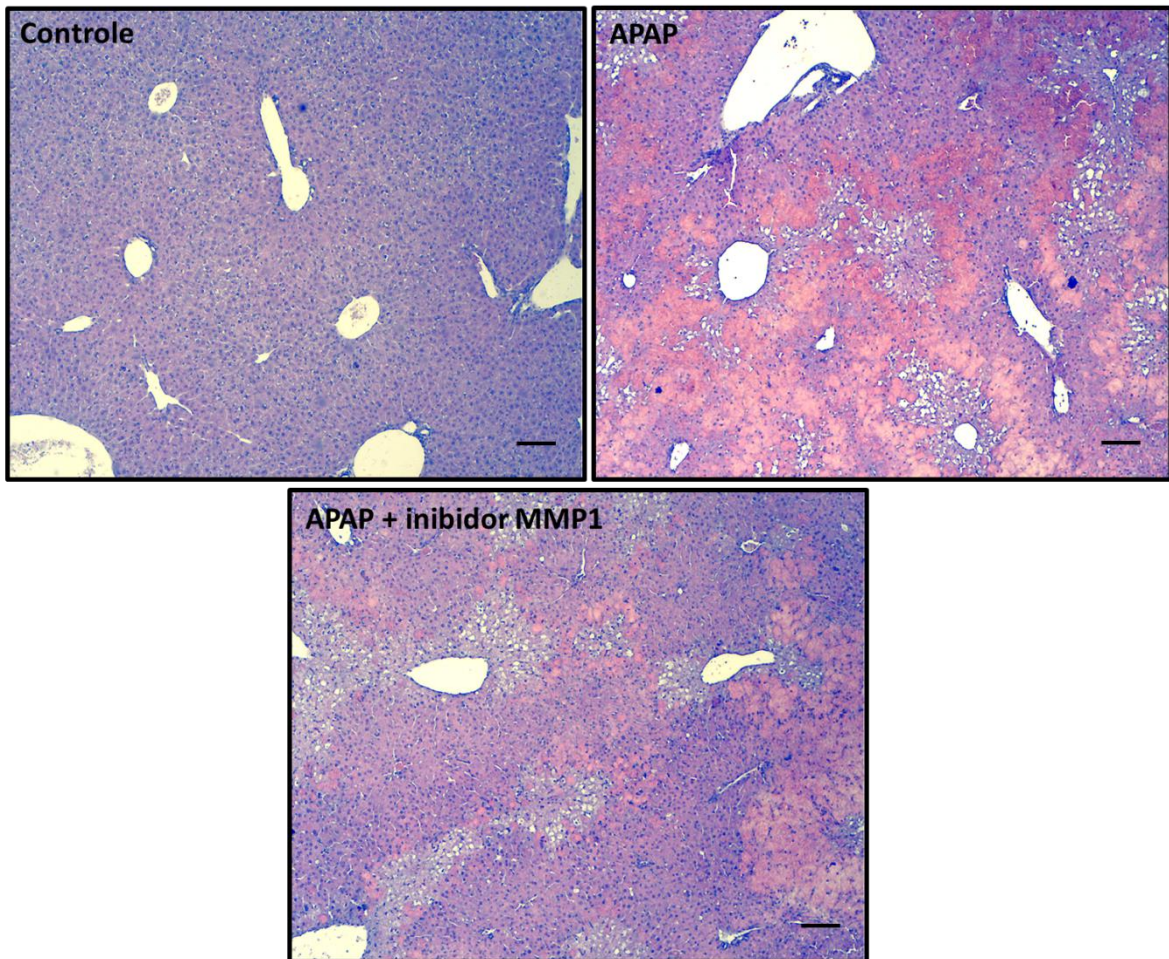
C-3) inibidor de MMP



C-4) inibidor de MMP



C-5)



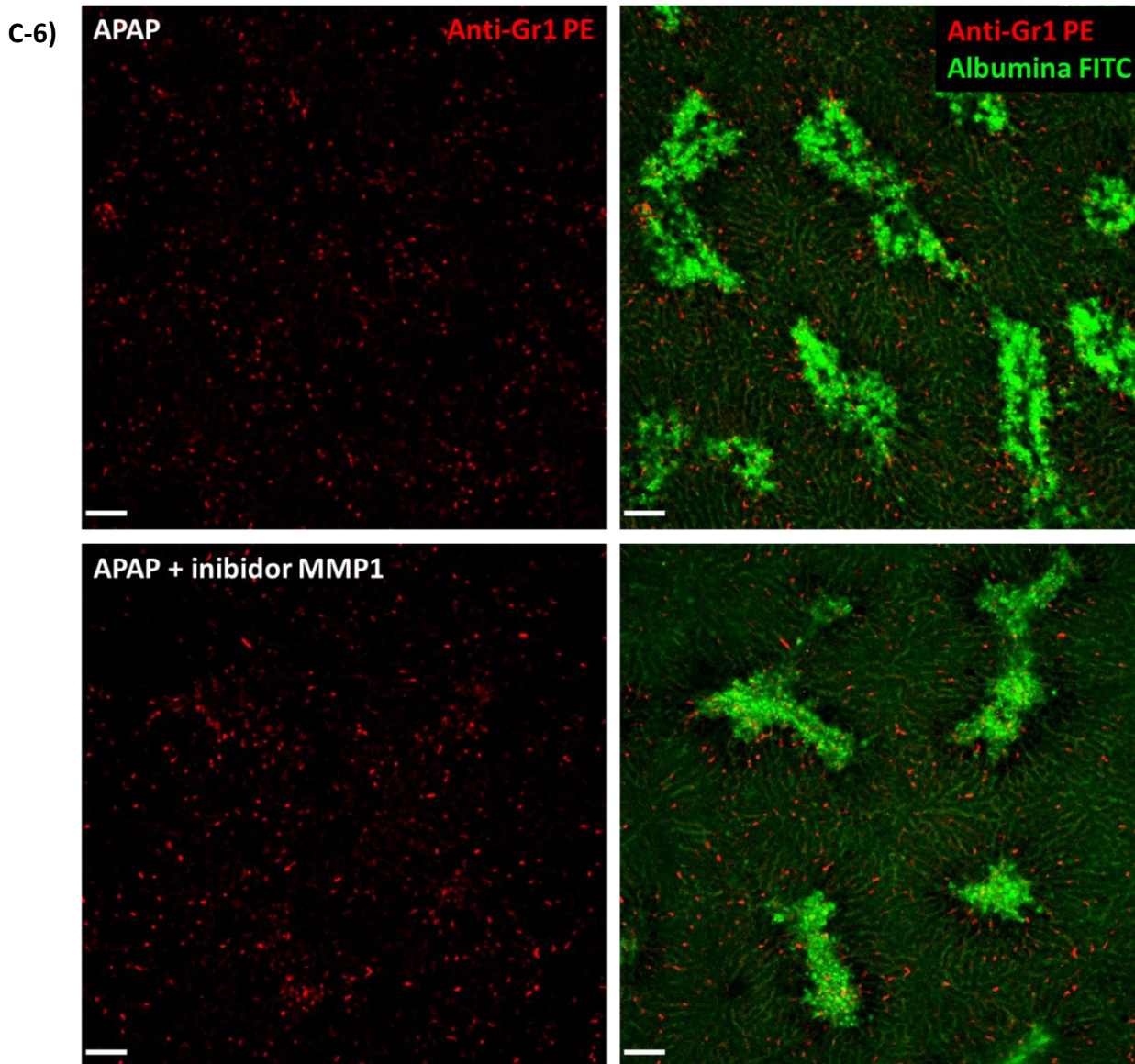


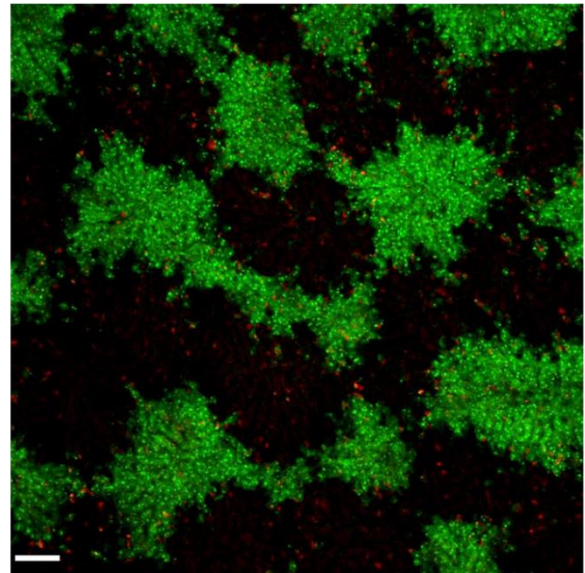
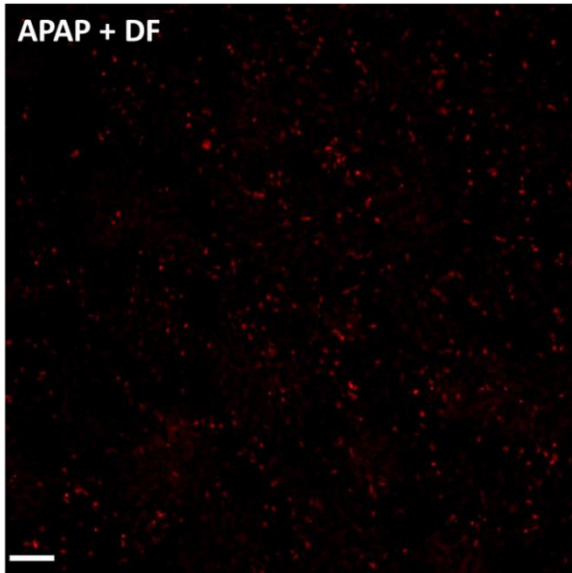
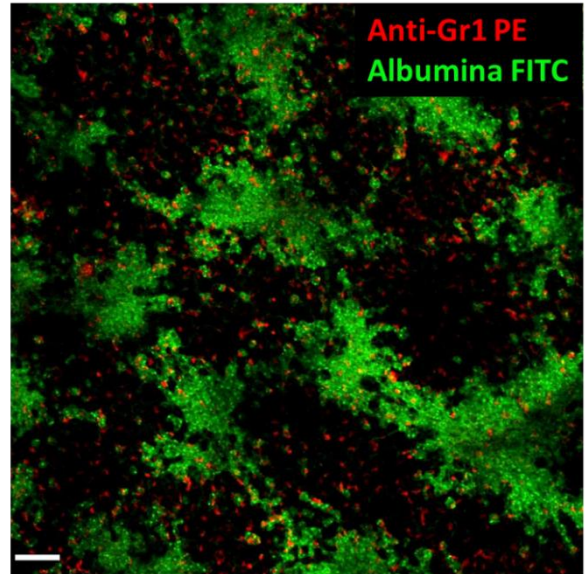
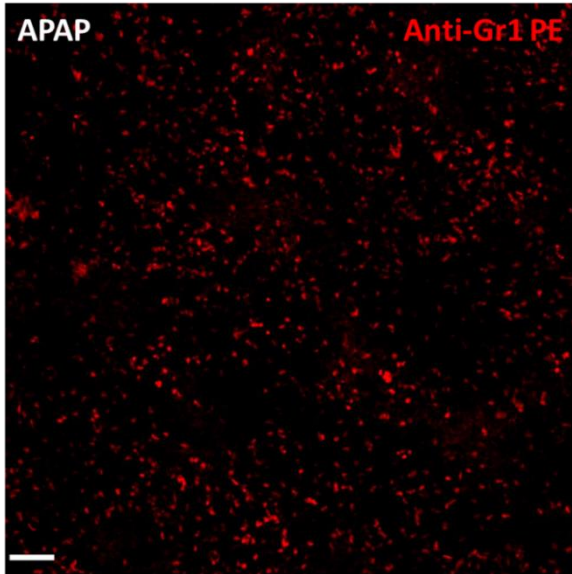
Figura 8 - Diminuição da lesão hepática e aumento da função após administração de inibidor de MMPs em animais intoxicados por APAP

(A e B) Níveis de ALT (1) e ICG (2) no soro de animais administrados com APAP e tratados com diferentes doses de batimastat e ilomastat, respectivamente. (C) Dosagem dos níveis de ALT (1), ICG (2), MPO (3) e porcentagem de necrose (4) de animais administrados com APAP e tratados com diferentes doses do inibidor de MMP1. (5) Imagens de cortes histológicos e (6) obtidas a partir de IVM de fígado de animais tratados com APAP e APAP + inibidor de MMP1 na dose de 2 mg/kg. Nas imagens de IVM observamos a necrose evidenciada em verde (Albumina FITC) e neutrófilos corados em vermelho (anti-GR1 PE). Escala: 100 μ m. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # = $p < 0,05$ em relação ao grupo APAP (veículo).

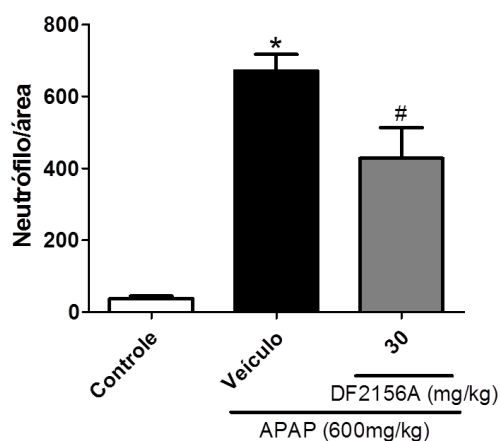
5.9 A diminuição do número de neutrófilos nem sempre está relacionada a diminuição da lesão hepática

A diminuição da lesão hepática causada pelo inibidor de MMP1 poderia ser devido à diminuição da quantidade de neutrófilos (40%). Para isso utilizamos um inibidor alostérico não competitivo, seletivo para CXCR1 e CXCR2 (DF 2156A), que inibe o recrutamento de neutrófilos (Bertini *et al.*, 2012). Com administração de 30 mg/kg de DF 2156A, 6 horas após sobredose de APAP observamos por IVM (Figura 9-A) que mesmo com a diminuição do número de neutrófilos (Figura 9-B) a lesão hepática não diminui (Figura 9-C).

A)



B) inibidor de recrutamento de neutrófilo



C) inibidor de recrutamento de neutrófilo

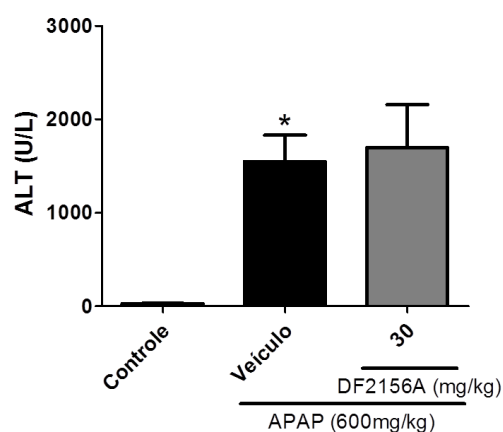


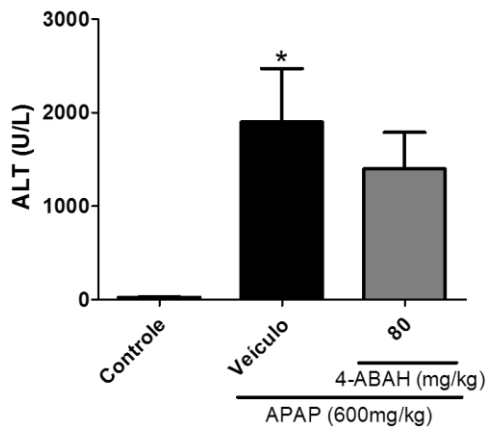
Figura 9 - Diminuição do número de neutrófilos não é capaz de diminuir a lesão quando administrado inibidor de recrutamento de neutrófilo 6 horas após APAP

(A) Imagens obtidas a partir de IVM de fígado de animais tratados com APAP e APAP + DF 2156A. Necrose evidenciada em verde (Albumina FITC) e neutrófilos em vermelho (anti-GR1 PE). Escala: 100 μ m. (B) Número de neutrófilos por área obtido a partir de IVM e (C) Níveis de ALT no soro de animais tratados com uma dose de 30 mg/kg de DF 2156A 6 horas após administrados com APAP. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # = $p < 0,05$ em relação ao grupo APAP (veículo).

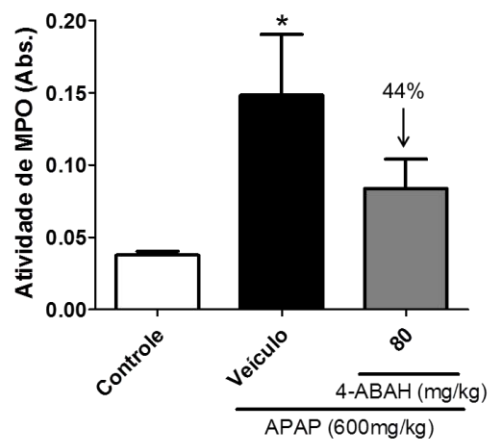
5.10 Inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS) não diminui a lesão e não aumenta a função hepática após sobredose de APAP

Após a inibição das proteases fomos investigar se ROS também estariam envolvidas com a amplificação da lesão hepática mediada por neutrófilos. Três inibidores foram utilizados: 4-ABAH - inibidor de MPO (Figura 10-A); e DPI e apocinina - inibidores de NADPH oxidase (Figura 10-B e C, respectivamente). Foram usados também camundongos knockout (KO) gp91phox que não apresentam a proteína gp91phox da NADPH oxidase e, portanto, não produzem ROS por essa via (Figura 10-D). Nenhum inibidor de ROS utilizado e nem os animais KO apresentaram diminuição na lesão ou aumento da função hepática. Concluindo assim, que a produção de ROS não é responsável pela amplificação encontrada na lesão com a participação dos neutrófilos.

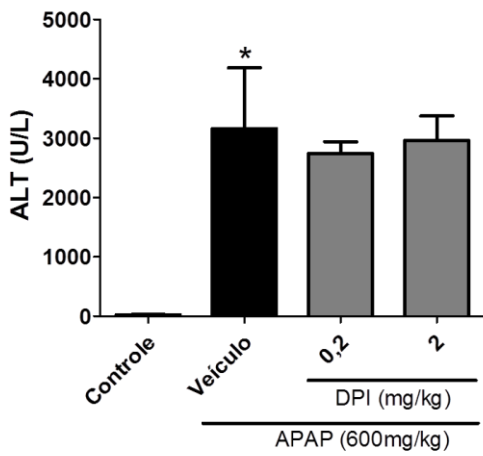
A-1) inibidor de MPO



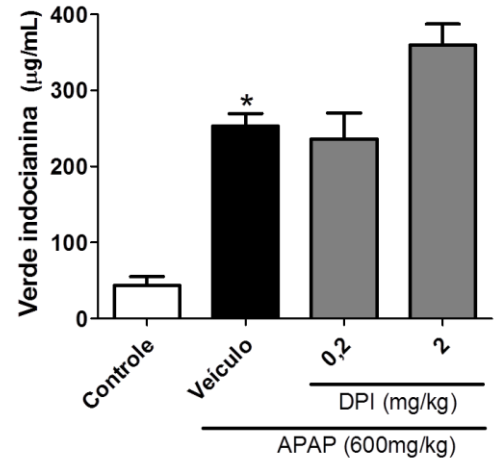
A-2) inibidor de MPO



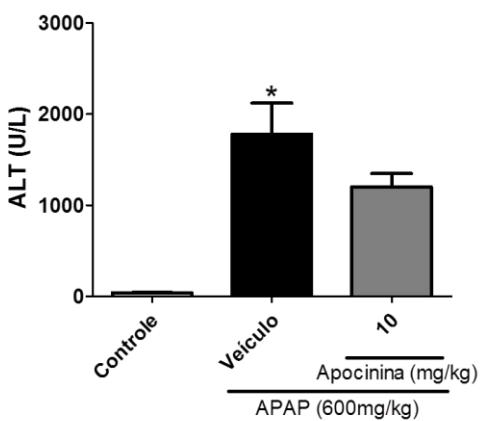
B-1) inibidor de NADPH oxidase



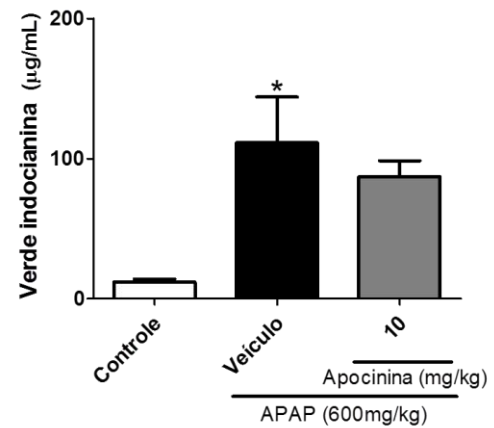
B-2) inibidor de NADPH oxidase



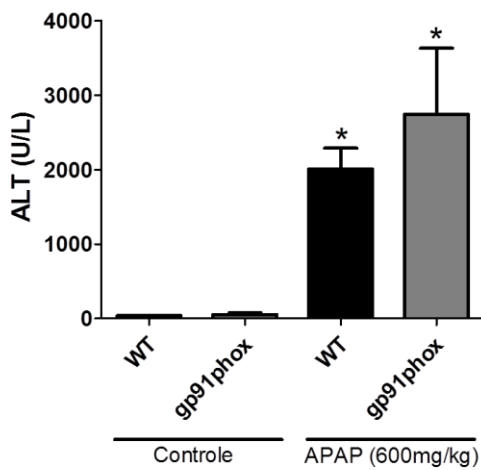
C-1) inibidor de NADPH oxidase



C-2) inibidor de NADPH oxidase



D-1) animal KO gp91phox



D-2) animal KO gp91phox

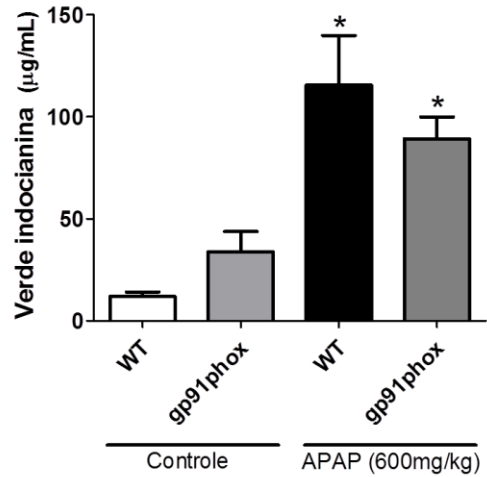


Figura 10 - Análises de lesão e função hepática de animais que receberam inibidores de ROS após sobredose de APAP

(A) Níveis de ALT (1) no soro e MPO (2) no fígado de animais administrados com APAP e tratados com 4-ABAH. (B e C) Níveis de ALT (1) e ICG (2) no soro de animais gavados com APAP e tratados com DPI e apocinina, respectivamente. (D) Níveis de ALT (1) e ICG (2) no soro de animais KO que receberam APAP. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho focamos no papel amplificador de neutrófilos na lesão hepática aguda. Para isso, partimos de dados prévios de nosso grupo que demonstraram que a depleção de neutrófilos protege os animais de uma lesão hepática grave por APAP (Marques *et al.*, 2015) e queríamos então saber quais componentes presentes no neutrófilo seriam responsáveis por essa amplificação. Para isso, nosso trabalho teve início com a avaliação do dano causado pelo APAP e posterior uso de inibidores de componentes granulares de neutrófilos.

Avaliando a sobredose de 600 mg/kg de APAP, confirmamos que ela causa lesão hepática grave, justificada pela necrose de hepatócitos e recrutamento de neutrófilos para o fígado (Figura – 1, 2 e 3). Concomitante com a lesão hepática, observamos também a perda de função hepática (Figura – 4). Estabelecida a lesão e os parâmetros de análise, utilizamos inibidores para diversos componentes presentes nos neutrófilos. Ao todo, já foram encontradas mais de 700 proteínas nos grânulos dos neutrófilos (Kruger *et al.*, 2015), dentre essas escolhemos as classes mais representativas e as mais conhecidas para inibirmos. Os inibidores utilizados são amplamente encontrados em estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* e as doses usadas no nosso trabalho foram baseadas na literatura.

Começamos os estudos utilizando inibidores de degranulação. A inibição com cromoglicato foi capaz de reduzir a lesão e aumentar a função hepática após sobredose de APAP (Figura – 5). Assim como no nosso trabalho, no modelo de I/R hepática foi observado uma diminuição dos níveis de ALT em animais tratados com essa droga (El-Shitany (El-Shitany e El-Desoky, 2015)). O cromoglicato é um inibidor de degranulação de mastócitos amplamente utilizado como um medicamento para asma (Edwards e Howell, 2000). Seu efeito em mastócitos é conhecido e ocorre pela estabilização da membrana celular, bloqueando a liberação de histamina e outros mediadores pró-inflamatórios (Radley e Grounds, 2006). Além do cromoglicato, a doxiciclina também foi capaz de diminuir a lesão hepática no nosso modelo de estudo (Figura – 5). Essa droga é conhecida por suas ações antibióticas, mas alguns estudos também mostram que ela age como inibidor da degranulação (Gabler e Creamer, 1991; Chopra, 2002). O efeito desses inibidores em neutrófilos ainda não é claro, mas é possível que ocorra também estabilização da membrana dos neutrófilos e isso impeça a liberação dos seus grânulos para o meio extracelular.

Depois de observado que a inibição da liberação de conteúdos granulares de neutrófilos, causa melhora da lesão e da função hepática, buscamos inibir os diversos componentes presentes nos grânulos separadamente para ver qual seria responsável por essa melhora. Começamos utilizando o coquetel inibidor de proteases para verificar se alguma protease poderia estar envolvida no processo de amplificação. Observamos que uma ou mais proteases estavam sendo responsáveis por aumentar a lesão hepática (Figura – 6). Partimos então para a inibição de proteases específicas como serinoproteases, cisteínoproteases, elastase e metaloproteinases (MMPs). Os resultados nos mostraram que a inibição de MMPs tem efeito na diminuição da lesão e no aumento da função hepática (Figura – 8). A utilização do inibidor de MMP1 foi capaz de diminuir a lesão e melhorar a função hepática na dose de 2 mg/kg. Além desse inibidor, o batimastat foi capaz de reduzir 67% da lesão na dose de 20 mg/Kg. As metaloproteinases de matriz constituem uma família de mais de 26 proteases dependentes de zinco que estão envolvidas com a degradação da matriz extracelular (ECM - extracellular matrix) e da membrana basal (Amălinei *et al.*, 2010). A migração de leucócitos através da ECM é dependente da degradação da matriz, não somente por facilitar a permeabilidade, mas também pela geração de fragmentos da matriz que são quimiotáticos para leucócitos (Coito, 2011). Outros estudos demonstraram que MMPs contribuíram para o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação (Keck *et al.*, 2002) e estão associadas com o início da lesão hepática após hepatectomia (Ohashi *et al.*, 2013). A inibição de MMPs pode ter diminuído a quebra de componentes da matriz e devido a isso a quimiotaxia pode ter sido menor, diminuindo o recrutamento de neutrófilos ao longo do tratamento com a droga (40% em relação ao veículo, apesar da diferença não ser estatística).

Após esse resultado, nos perguntamos se apenas a diminuição da quantidade de neutrófilos seria responsável pela diminuição da lesão hepática encontrada com o uso do inibidor de MMP1. Para responder essa pergunta utilizamos um inibidor de recrutamento de neutrófilos (DF 2156A) para verificar se, com a diminuição do número de neutrófilos, haveria também diminuição da lesão. Esse experimento nos mostrou que mesmo com um número reduzido de neutrófilos a lesão dos animais tratados com DF 2156A era semelhante à lesão dos animais que não receberam o inibidor (Figura – 9). Dessa forma, concluímos que a diminuição encontrada na lesão com o inibidor de MMP1 não é pela diminuição no número de neutrófilos recrutados, e sim pela inibição das MMPs.

Sabe-se que a adesão célula-matriz regula a homeostase dos tecidos. Com a destruição da ECM ocorrem alterações na sinalização das células. Integrinas presentes na ECM regulam o comportamento celular por meio de conexões com o citoesqueleto de actina, receptores de fator de crescimento e cascata de transdução de sinais intracelulares (Reddig e Juliano, 2005). A ruptura dessa ligação com a ECM tem efeitos deletérios na sobrevivência da célula, podendo gerar mediadores de morte celular e dar início a apoptose ou necrose (Defamie *et al.*, 2008). Esse processo leva a um tipo específico de apoptose conhecido como *anoikis* que é causado pelo deslocamento da célula de sua matriz de suporte (Frisch e Francis, 1994). Esse fenômeno é conhecido em células epiteliais, endoteliais (Frisch e Francis, 1994), na formação de metástase (Paoli *et al.*, 2013), e já foi relatado em cultura de hepatócitos primários, onde foi observado que a sobrevivência dos hepatócitos depende de β 1-integrina para sua fixação na ECM (Smets *et al.*, 2002; Pinkse *et al.*, 2004). Isso explicaria a piora na funcionalidade hepática e no aumento da lesão devido à presença de MMPs, tendo em vista a capacidade das MMPs de degradar a ECM.

A inibição das demais proteases não teve efeito na lesão hepática induzida por APAP nas doses em que foram usadas (Figura – 7), embora sejam amplamente utilizadas na literatura e apresentem efeito em outros modelos. Concluímos assim, que entre as proteases existentes nos neutrófilos as MMPs são as responsáveis pela amplificação da lesão hepática induzida por APAP.

Outra classe de enzimas inibidas foram as responsáveis pela produção de ROS. Utilizamos inibidores de MPO, de NADPH oxidase, e camundongos NADPH oxidase KO, porém nenhuma dessas condições levou a mudanças na lesão e na função hepática no nosso modelo (Figura – 10). Dessa maneira, concluímos que ROS não são responsáveis por amplificar a lesão hepática no modelo de APAP.

Na lesão por APAP os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados do sangue e já estão em quantidades aumentadas na décima segunda hora após a administração do APAP (Figura – 3), apesar disso, nos perguntamos se outras células poderiam estar sofrendo os efeitos das drogas utilizadas. Monócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e ainda mastócitos, poderiam ser recrutados ou estar presentes no tecido hepático e ter efeito na mudança encontrada com o uso dos inibidores. Pesquisando então sobre essas células, encontramos trabalhos sobre recrutamento de monócitos na lesão hepática mostrando que os mesmos possuem recrutamento mais lento, sendo encontrados no fígado de 24 a 48 horas após a administração do APAP

(Dambach *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2008). Os eosinófilos também apresentam um aumento em pacientes com DILI, porém em pacientes com lesão por APAP, somente de 2 a 8% dos leucócitos no fígado são eosinófilos e eles não degranulam, uma vez que não são encontradas citocinas e componentes presentes nos grânulos dos eosinófilos no tecido hepático desses pacientes (Pham *et al.*, 2001). Os basófilos são os leucócitos encontrados em menor quantidade na circulação cerca de 1% em humanos e camundongos. Eles migram em direção ao tecido durante reações alérgicas e principalmente infecção parasitária onde liberam histaminas, proteases, citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Eberle e Voehringer, 2016), devido a isso não são estudados na lesão por APAP. Diferentes modelos de lesão hepática aguda sugerem que as células NK, NKT e T podem contribuir para a hepatotoxicidade, mas os mecanismos ainda não são claros (Krenkel *et al.*, 2014). Os mastócitos, diferente das demais células já citadas, são residentes do tecido conjuntivo e tem ampla distribuição nos tecidos dos animais, sendo encontrados especialmente perto de superfícies expostas ao ambiente, como pele, vias respiratórias, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Essa localização é fundamental uma vez que essas células são umas das primeiras, juntamente com os macrófagos, a interagir com antígenos, alérgenos, patógenos ou toxinas de invasores, tendo sua função voltada para eliminação de patógenos (Galli *et al.*, 2011). Com essas informações, entendemos que o órgão estudado, o regime de tratamento aplicado e o tempo em que a lesão foi avaliada favorecem que os efeitos observados foram devido à atuação das drogas em neutrófilos principalmente.

É certo que os neutrófilos amplificam a lesão em diversas doenças, e mostramos nesse trabalho que as MMPs são as principais causadoras dessa amplificação no fígado. Mais estudos são necessários para entendermos como as MMPs estão de fato aumentando a lesão, para que assim possamos intervir e diminuir os seus efeitos deletérios durante a lesão hepática.

7. CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que:

- Sobredose de APAP causa lesão e perda de função hepática, com concomitante ativação de neutrófilos e seu recrutamento para o fígado;
- O tratamento com inibidores de degranulação reduz a lesão e a perda da função hepática após sobredose de APAP;
- As MMPs são responsáveis por amplificar a lesão e a perda de função hepática, causada pela sobredose APAP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. H.; EKSTEEN, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 244-51, Mar 2006.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459-89, 2012.

AMĂLINEI, C. et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, v. 51, n. 2, p. 215-28, 2010.

BERNAL, W. et al. Acute liver failure. **Lancet**, v. 376, n. 9736, p. 190-201, Jul 17 2010.

BERNAL, W.; WENDON, J. Acute liver failure. **N Engl J Med**, v. 369, n. 26, p. 2525-34, Dec 26 2013.

BERTINI, R. et al. Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 2, p. 436-54, Jan 2012.

BJORNSSON, E. S. et al. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1419-25, 1425 e1-3; quiz e19-20, Jun 2013.

BONDER, C. S. et al. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. **J Immunol**, v. 172, n. 1, p. 45-53, Jan 2004.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**, v. 28, n. 8, p. 340-5, Aug 2007.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004.

CHOPRA, I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 3-4, p. 119-25, 2002 Jul-Aug 2002.

COITO, A. J. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 16, n. 1, p. 34-40, Feb 2011.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-45, Aug 2008.

DAMBACH, D. M. et al. Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p. 1093-103, May 2002.

DEFAMIE, V. et al. Matrix metalloproteinase inhibition protects rat livers from prolonged cold ischemia-warm reperfusion injury. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 177-85, Jan 2008.

EBERLE, J. U.; VOEHRINGER, D. Role of basophils in protective immunity to parasitic infections. **Semin Immunopathol**, Apr 2016.

EDWARDS, A. M.; HOWELL, J. B. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr R. E. C. Altounyan. **Clin Exp Allergy**, v. 30, n. 6, p. 756-74, Jun 2000.

EL-SHITANY, N. A.; EL-DESOKY, K. Cromoglycate, not ketotifen, ameliorated the injured effect of warm ischemia/reperfusion in rat liver: role of mast cell degranulation, oxidative stress, proinflammatory cytokine, and inducible nitric oxide synthase. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 5237-46, 2015.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1317-27, Nov 2003.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J Cell Biol**, v. 124, n. 4, p. 619-26, Feb 1994.

GABLER, W. L.; CREAMER, H. R. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. **J Periodontal Res**, v. 26, n. 1, p. 52-8, Jan 1991.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1035-44, Nov 2011.

GUJRAL, J. S. et al. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 355-63, Aug 2003.

HALLE, B. M.; POULSEN, T. D.; PEDERSEN, H. P. Indocyanine green plasma disappearance rate as dynamic liver function test in critically ill patients. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 58, n. 10, p. 1214-9, Nov 2014.

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

HOEKSTRA, L. T. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. **Ann Surg**, v. 257, n. 1, p. 27-36, Jan 2013.

JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; SMITH, C. W. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. **Am J Physiol**, v. 261, n. 6 Pt 1, p. G1051-6, Dec 1991.

JAESCHKE, H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. **Am J Physiol**, v. 290. p G1083-88, 2006.

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

KECK, T. et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 188-201, Jan 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, Mar 2013.

KRENKEL, O.; MOSSANEN, J. C.; TACKE, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. **Hepatobiliary Surg Nutr**, v. 3, n. 6, p. 331-43, Dec 2014.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 3, p. e1004651, Mar 2015.

LEE, W. M. Acute liver failure. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 33, n. 1, p. 36-45, Feb 2012.

LEVESQUE, E. et al. Current use and perspective of indocyanine green clearance in liver diseases. **Anaesth Crit Care Pain Med**, v. 35, n. 1, p. 49-57, Feb 2016.

LICATA, A. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. **Eur J Intern Med**, v. 28, p. 9-16, Mar 2016.

LUEDDE, T.; KAPLOWITZ, N.; SCHWABE, R. F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 765-783 e4, Oct 2014.

MANDA-HANDZLIK, A.; DEMKOW, U. Neutrophils: The Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Health and Disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 857, p. 51-60, 2015.

MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1971-82, Nov 2012.

_____. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 348-60, Jan 2015.

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

MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 15 2010.

MOOKERJEE, R. P. et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. **Hepatology**, v. 46, n. 3, p. 831-40, Sep 2007.

OHASHI, N. et al. Matrix metalloproteinase-9 in the initial injury after hepatectomy in mice. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 20, p. 3027-42, May 2013.

OLIVEIRA, A. G. et al. Tumor-Associated Neutrophils. R. R. Resende and H. Ulrich (eds.), **Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research**. Chapter 18. p. 479-501, © Springer Science+Business Media Dordrecht 2013.

OWEN, C. A.; CAMPBELL, E. J. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 2, p. 137-50, Feb 1999.

PAOLI, P.; GIANNONI, E.; CHIARUGI, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3481-98, Dec 2013.

PHAM, B. N. et al. Eotaxin expression and eosinophil infiltrate in the liver of patients with drug-induced liver disease. **J Hepatol**, v. 34, n. 4, p. 537-47, Apr 2001.

PINKSE, G. G. et al. Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix. **Liver Int**, v. 24, n. 3, p. 218-26, Jun 2004.

RADLEY, H. G.; GROUNDS, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 2, p. 387-97, Aug 2006.

RAY, S. D. et al. Ca²⁺ antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. **Faseb Journal**, v. 7, n. 5, p. 453-63, Mar 1993.

REDDIG, P. J.; JULIANO, R. L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. **Cancer Metastasis Rev**, v. 24, n. 3, p. 425-39, Sep 2005.

REYNOLDS, E. S. Environmental aspects of injury and disease: liver and bile ducts. **Environ Health Perspect**, v. 20, p. 1-13, Oct 1977.

ROCK, K. L. et al. The sterile inflammatory response. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 321-42, 2010.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. **J Innate Immun**, v. 5, n. 4, p. 348-57, 2013.

SAITO, C.; ZWINGMANN, C.; JAESCHKE, H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 246-54, Jan 2010.

SMETS, F. N. et al. Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. **Mol Genet Metab**, v. 75, n. 4, p. 344-52, Apr 2002.

SUK, K. T.; KIM, D. J. Drug-induced liver injury: present and future. **Clin Mol Hepatol**, v. 18, n. 3, p. 249-57, Sep 2012.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends Immunol**, v. 31, n. 8, p. 318-24, Aug 2010.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1269-339, Oct 2009.

WANG, D. W.; YIN, Y. M.; YAO, Y. M. Advances in the management of acute liver failure. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 41, p. 7069-77, Nov 7 2013.

XU, R. et al. The role of neutrophils in the development of liver diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 11, n. 3, p. 224-31, May 2014a.

_____. The role of neutrophils in the development of liver diseases. **Cell Mol Immunol**, v. 11, n. 3, p. 224-31, May 2014b.

YOU, Q. et al. Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. **Hepatology**, v. 44, n. 6, p. 1421-31, Dec 2006.