

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

Pedro Elias Marques Pereira Silva

**Colaboração entre quimiocinas e peptídeos mitocondriais no
recrutamento e ativação de neutrófilos durante a lesão
hepática estéril**

Belo Horizonte

2012

Pedro Elias Marques Pereira Silva

**Colaboração entre quimiocinas e peptídeos mitocondriais no
recrutamento e ativação de neutrófilos durante a lesão
hepática estéril**

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

Belo Horizonte

2012

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Imunobiofotônica e de Imunofarmacologia, dos Departamentos de Morfologia e de Bioquímica e Imunologia, respectivamente, localizados no Instituto de Ciências Biológicas (UFMG). Também foi utilizado o Laboratório de Biofotônica, localizado no Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Contamos com o apoio financeiro das agências CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT Dengue.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por todo o carinho e suporte, mas principalmente pelo apoio ininterrupto, que permite que eu me dedique completamente ao caminho profissional que escolhi, e que amo fazer. Agradeço em especial ao meu irmão e colega de profissão Rafael Elias, que me ensina tanto por meio de nossas infinitas discussões científicas.

Ao meu amigo e orientador, Prof. Gustavo Batista de Menezes, cuja obstinação incontrolável e dedicação sem precedentes à minha orientação e a de meus colegas foram indispensáveis para a realização deste trabalho e para a minha constante formação. Tomarei seu exemplo de trabalho, talento e dedicação para toda e qualquer empreitada que enfrentarei no futuro por vir.

À Profa. Denise Carmona, cuja ampla experiência e habilidade me ajudam muito nos campos científico, técnico, motivacional, gramático, financeiro, administrativo e vários outros mais. Suas orientações foram essenciais à conclusão de mais esta etapa, e continuarão sendo!

À galera do Imunobiofotônica, Sylvia, Dani, Laura, Laís e Matheus, por me ajudar nos experimentos e tornar o ambiente do laboratório tão caloroso e cômico. Em especial, agradeço à Dani pelo auxílio (leia-se, escravidão) ao longo deste período, sem sua ajuda este trabalho não teria sido realizado; e por me dar o gostinho do que é orientar alguém, valeu! A você Sylvão, aquele abraço especial pela paciência, pela alimentação, e pelas inúmeras “mãozinhas” no lab, que salvam bem na hora que precisamos.

Aos amigos do N3 140, que são tantos e tão importantes em seus respectivos “nichos”. Garanto que meu prazer em ir e voltar ao ICB todo dia depende da presença de vocês. À Rafaela e Nathália, pela ótima companhia durante o “melhor horário para trabalhar no lab”.

Aos amigos do IMUNOFAR e LIMHO, com os quais eu divido um cobiçado espaço, ensinamentos, discussões e momentos hilários. Obrigado pela ajuda com tantas dúvidas, material e experimentos. E claro, pela sagrada pausa pro café e pelas festas espetaculares. Valeu Vivian, Flavão, Caio e Bráulio pelas inúmeras aberturas de freezer e alíquotas de qualquer coisa necessária!

*“Come in here dear boy have a cigar
You're gonna go far,
You're gonna fly high
You're never gonna die,
You're gonna make it if you try
They're gonna love you”*

“Have a Cigar” (Pink Floyd, 1975)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 ANIMAIS.....	20
3.2 O MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA.....	20
3.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E ANTICORPOS.....	21
3.4 VISUALIZAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL INTRAVITAL.....	21
3.5 QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE LESÃO HEPÁTICA POR DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANSFERASE NO SORO.....	22
3.6 ESTIMATIVA DA INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PELO ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE ...	22
3.7 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA.....	23
3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	23
3.9 CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	24
3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	24
3.11 CULTURA CELULAR.....	24
3.12 INDUÇÃO DE LESÃO POR PARACETAMOL EM CULTURA CELULAR.....	25
3.13 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	25
3.14 PURIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	25
3.15 CO-CULTURA DE HEPG2 E NEUTRÓFILOS PURIFICADOS.....	26
3.16 QUANTIFICAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL CIRCULANTE POR REAL-TIME PCR.....	26
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 A SOBREDOSE DE APAP CAUSA LESÃO HEPÁTICA EM UMA MANEIRA DOSE- E TEMPO- DEPENDENTE.....	28
4.2 A SOBREDOSE DE APAP INDUZ NECROSE HEPÁTICA GENERALIZADA.....	29
4.3 O ANTÍDOTO NAC PREVINE A LESÃO HEPÁTICA E A DEPLEÇÃO DE GLUTATIONA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP.....	31
4.4 A NECROSE HEPÁTICA CAUSADA POR APAP LEVA AO ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO.....	32
4.5 A MICROSCOPIA INTRAVITAL DO FÍGADO DE ANIMAIS TRATADOS COM APAP CONFIRMA UM INTENSO INFILTRADO NEUTROFÍLICO.....	34
4.6 DEXAMETASONA REDUZ A LESÃO HEPÁTICA POR APAP EM 34% MAS NÃO ALTERA O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO.....	35
4.7 A DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS PROTEGE CAMUNDONGOS DA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP.....	36
4.8 A SOBREDOSE DE APAP INDUZ A PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NO FÍGADO	37

4.9 O ANTAGONISMO DO RECEPTOR CXCR2 REDUZ LEVEMENTE A LESÃO HEPÁTICA, MAS CAUSA UMA REDUÇÃO MARCANTE NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO ..	39
4.10 O BLOQUEIO DA QUIMIOCINA CXCL1 / KC REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA POR APAP E INIBE EM UM TERÇO O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO	40
4.11 ELIMINAÇÃO DO ATP EXTRACELULAR REDUZ O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR APAP, MAS NÃO ALTERA O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS	41
4.12 DAMPS MITOCONDRIAIS SÃO LIBERADOS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA DURANTE A NECROSE HEPÁTICA INDUZIDA APAP	42
4.13 O BLOQUEIO DO RECEPTOR DE PEPTÍDEOS FORMILADOS FPR1 CAUSA UMA REDUÇÃO MODERADA DOS NÍVEIS DE ALT E INIBE EM 25% O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS	43
4.14 BOC-1 E DF2156 REDUZEM A PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NO FÍGADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À SOBREDOSE DE APAP	44
4.15 O TRATAMENTO COMBINADO COM OS ANTAGONISTAS DE CXCR2 E FPR1 REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA E O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO	46
4.16 A TOXICIDADE POR APAP PODE SER REPRODUZIDA IN VITRO NA LINHAGEM CELULAR HEPG2 DE MODO BASTANTE SIMILAR AO OBSERVADO IN VIVO	47
4.17 NEUTRÓFILOS REDUZEM A VIABILIDADE DE HEPG2 EM CO-CULTURA, A QUAL PODE SER REVERTIDA PELO TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CXCR2 E FPR1	48
4.18 A ADIÇÃO DE NEUTRÓFILOS POTENCIALIZA A MORTE CELULAR INDUZIDA POR APAP, QUE É TOTALMENTE REVERTIDO COM O TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE CXCR2 E FPR1	50
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	59
7 BIBLIOGRAFIA	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AIM-2 – Receptor tipo ausente em melanoma 2

ALT – Alanina aminotransferase

ANOVA – *Analysis of Variance*

APAP – *Acetaminophen*; Paracetamol

ATP – Adenosina trifosfato

CEBIO – Centro de Bioterismo da UFMG

CETEA – Comitê de ética em experimentação Animal da UFMG

CLR – Receptor de lectina tipo C

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

CT – *Cycle thresholds*

DAMP – *Damage-Associated Molecular Pattern*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTNB – ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FHA – Falência Hepática Aguda

f-MLP – Formil-metionil-leucil-fenilalanina

GFP – *Green Fluorescent Protein*; Proteína verde fluorescente

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona dissulfeto (oxidada)

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HMGB1 – *High-Mobility Group Box 1*

HSP – *Heat Shock Protein*; Proteína de choque térmico

HTAB – Brometo de hexadecil trimetilamônio

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

LDH – Lactato desidrogenase

MPO – Mieloperoxidase

MT – Metalotioneína

NAC – N-acetilcisteína

NAPQI – N-acetil-*para*-benzoquinonaimina

NET – *Neutrophil Extracellular Trap*

NK – Célula *Natural Killer*

NKT – Célula *Natural Killer T*

NLR – Receptor tipo NOD

PBS – *Phosphate Buffered Saline*; Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PMA – *Phorbol myristate acetate*

PRR – *Pattern Recognition Receptor*, Receptor de Reconhecimento de Padrões

RLR – Receptor tipo RIG-I

TLR – Receptor tipo Toll

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cascata de recrutamento de neutrófilos para a lesão focal estéril no fígado.....	18
Figura 2 – Cortes histológicos representativos do fígado de camundongos saudáveis ou submetidos à sobredose de APAP.....	30
Figura 3 – Infiltrado neutrofílico no tecido hepático de animais tratados com APAP, visualizado pela técnica de microscopia intravital.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) induzido por sobredose de paracetamol (APAP) em curva dose-resposta e tempo-resposta.....	28
Gráfico 2 – O antídoto N-acetilcisteína (NAC) previne o aumento de ALT sérica e a depleção de glutatona hepática (GSH) induzidos por APAP.	31
Gráfico 3 – APAP leva ao acúmulo de neutrófilos no parênquima hepático de forma dose- e tempo-dependente, fenômeno que é prevenido com o pré-tratamento com NAC.....	33
Gráfico 4 – Pré-tratamento com Dexametasona previne parcialmente a lesão hepática induzida por APAP, sem interferir no recrutamento de neutrófilos ao tecido.....	35
Gráfico 5 – A depleção de neutrófilos prévia à indução de lesão por APAP reduz nitidamente o dano hepático.	36
Gráfico 6 – A sobredose de APAP induz a produção de quimiocinas ligantes de CXCR2 e citocinas inflamatórias no fígado.	38
Gráfico 7 – Pré-tratamento com o antagonista de CXCR2, o composto DF2156A, previne parcialmente a lesão hepática induzida por APAP, mas reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido.....	39
Gráfico 8 – Pré-tratamento com o anticorpo anti-CXCL1/KC, previne a lesão hepática induzida por APAP e reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido.	40
Gráfico 9 – A degradação de ATP extracelular pela enzima apirase reduz a lesão hepática, mas não interfere no recrutamento de neutrófilos.	41
Gráfico 10 – A necrose hepática por APAP leva à liberação de DNA mitocondrial na circulação sanguínea.....	42
Gráfico 11 – O antagonista de FPR1, composto BOC-1, reduz moderadamente a lesão hepática por APAP, mas reduz em 25% o recrutamento de neutrófilos.	43
Gráfico 12 – O antagonismo de FPR1 e de CXCR2 inibe a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias no fígado necrótico.	45
Gráfico 13 – O bloqueio combinado de CXCR2 e FPR1 protege contra a lesão hepática e o influxo de neutrófilos induzidos por APAP.....	46
Gráfico 14 – Altas concentrações de APAP inviabilizam células HepG2.....	47
Gráfico 15 – Neutrófilos causam toxicidade direta às células HepG2, a qual é revertida por bloqueadores de FPR1 e CXCR2.....	49
Gráfico 16 – Neutrófilos potencializam a citotoxicidade promovida pelo APAP, que é revertida pelos bloqueadores de FPR1 e CXCR2	50

RESUMO

Condições que afetam a fisiologia hepática causam um impacto profundo na homeostase, e frequentemente levam à morte. O paracetamol (APAP), um analgésico de uso comum, é capaz de causar lesão hepática em altas doses, levando à falência hepática aguda, um transtorno que provoca milhares de mortes anualmente e é responsável por 50% de todos os transplantes hepáticos no mundo. Nesta doença ocorre um fenômeno chamado de inflamação estéril, onde há participação de vários tipos leucocitários, mas onde especialmente os neutrófilos têm ganhado destaque por serem relacionados ao dano tecidual e amplificação desse tipo de lesão. Considerando isso, nossos objetivos foram determinar se os neutrófilos estão envolvidos neste tipo de lesão hepática e quais moléculas participam no seu recrutamento para o sítio de lesão. Nossos dados indicaram que neutrófilos participam na patogênese da lesão hepática por APAP, pois eles são recrutados durante o processo de lesão tecidual e sua depleção protege contra a morte celular induzida por APAP. Ainda, observamos um aumento nos níveis de quimiocinas e citocinas no fígado, e um aumento bastante intenso de DNA mitocondrial circulante no soro de camundongos submetidos à sobredose de APAP, ressaltando o papel de DAMPs como peptídeos formilados e DNA mitocondrial neste tipo de lesão. Neste contexto, fármacos que bloqueiam o recrutamento de neutrófilos, como antagonistas do receptor de quimiocinas CXCR2 e do receptor de peptídeos FPR1 são capazes não apenas de reduzir o influxo de neutrófilos para o fígado, mas também de reduzir significativamente a lesão e a inflamação tecidual quando administrados em conjunto ao animal. Desse modo, podemos concluir que a regulação do recrutamento de neutrófilos e do processo inflamatório que ocorre no fígado necrótico pelos antagonistas de CXCR2 e FPR1 é de grande potencial terapêutico para a falência hepática aguda e tantos outros males que são caracterizados pela inflamação estéril.

ABSTRACT

Conditions that affect liver physiology and function have a severe effect on homeostasis and frequently lead to death. Paracetamol (APAP), a widely used analgesic and antipyretic drug, can cause liver injury when ingested at high doses, leading to acute liver failure, a disorder responsible for thousands of deaths per year and 50% of all liver transplants. In this disease, a phenomenon named sterile inflammation occurs, in which many leukocytes participate, but neutrophils have been featured as tissue-damaging cells, aggravating any tissue injury already in process. Considering this, our objectives were to determine if neutrophils are involved in this type of liver injury and which molecules participate in neutrophil recruitment to the site of damage. Our data indicate that neutrophils participate in the pathogenesis of APAP-induced liver injury, because they are recruited during the process of tissue injury and its depletion protects mice from APAP-induced liver damage. Moreover, we observed a large increase in chemokine and cytokine production in the liver, and interestingly, an increase in circulating mitochondrial DNA in the serum of APAP-treated mice, highlighting the role of Damage-Associated Molecular Patterns such as formyl-peptides and mitochondrial DNA in this type of injury. In this context, drugs that block neutrophil recruitment, such as the chemokine receptor CXCR2 antagonist DF2156 and the formyl-peptide receptor antagonist BOC-1, are capable of not only reducing neutrophil influx to the liver, but also to significantly decrease liver injury and inflammation when applied simultaneously to mice. Considering this, we can conclude that the regulation of neutrophil recruitment and the inflammatory process occurring in the necrotic liver, by the CXCR2 and FPR1 antagonists, has great therapeutic potential for acute liver failure treatment and also for many other diseases characterized by sterile inflammation.

1 INTRODUÇÃO

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, pesando cerca de 1,5 kg em um indivíduo adulto. Ele se localiza na cavidade abdominal logo abaixo do diafragma, onde recebe um suprimento sanguíneo duplo, do qual 80% é sangue advindo da veia porta, rico em nutrientes absorvidos no intestino e pouco oxigenado. O restante é sangue rico em oxigênio, fornecido pela artéria hepática. Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, sob baixa pressão de perfusão e tensão de oxigênio, através de uma enorme rede de capilares de parede fina e endotélio fenestrado, chamados sinusóides. O fígado é dividido em inúmeras seções poliédricas - os lóbulos hepáticos - os quais contêm o hepatócito, a principal unidade metabólica funcional. Estas células se organizam em cordões entremeados por sinusóides, e se estendem do limite do lóbulo (onde se localizam os espaços porta) até o vaso central nomeado veia centrolobular. Os espaços porta contêm ramos da artéria hepática, veia porta e ducto biliar, sendo que o fluxo sanguíneo parte desta estrutura e segue em direção à veia centrolobular e vasos subseqüentes, chegando até a veia hepática e deixando o órgão.

A organização funcional e fluxo sanguíneo único do fígado permitem que ele realize inúmeras atividades. Dentre elas estão funções metabólicas, catabólicas, excretoras, secretoras, de síntese e de armazenamento. O fígado é capaz de, por exemplo, controlar a homeostase de glicose, sintetizar albumina e fatores da coagulação, remover amônia do sangue, armazenar glicogênio, triglicerídeos, ferro, vitaminas, e sintetizar e secretar a bile. Além disso, o fígado, ou mais especificamente o hepatócito, é conhecido por sua notável capacidade de degradar e detoxificar compostos, tanto endógenos quanto exógenos. Nesta lista estão hormônios esteróides, proteínas séricas, fármacos, toxinas, contaminantes ambientais, álcool e até produtos bacterianos originados do trato gastrointestinal (THOMSON & KNOLLE, 2010)

Considerando todas essas funções, as doenças que acometem o fígado são de grande importância médica. A falência hepática aguda (FHA), por exemplo, está relacionada a alto custo financeiro e alta mortalidade (BERNAL *et al*, 2010), e mesmo que um transplante hepático de emergência esteja disponível, mais de 20% dos pacientes não sobrevivem 1 ano após o procedimento (estatísticas europeias; WIGG *et al*, 2005).

A FHA provoca milhares de mortes anualmente e é responsável por 50% de todos os transplantes hepáticos no mundo (KHAN *et al*, 2006). Ela é definida como um distúrbio onde há necrose hepatocelular com perda extensa da função hepática, levando a uma rápida e progressiva falência múltipla de órgãos, associada ou não a encefalopatia (TREY & DAVIDSON, 1970; BHADURI & MIELI-VERGANI, 1996). Os sinais clínicos dessa doença são bem amplos, e incluem perda de peso e de massa muscular, icterícia, perda do controle glicêmico, coagulopatia, acidose láctica, hiperamonemia, lesão pulmonar aguda, hipotensão, pancreatite, falência renal, supressão da medula óssea e da atividade leucocitária, edema cerebral, encefalopatia, dentre outros (BERNAL *et al*, 2010).

A FHA pode ter várias causas, mas as principais são overdose de medicamentos e infecções virais. Os vírus da hepatite A, B e E são os principais causadores de falência hepática em países em desenvolvimento, enquanto que a hepatite medicamentosa prevalece nos EUA e Europa, com destaque para a hepatotoxicidade induzida por paracetamol, que predomina nos EUA e cresce em incidência em vários países (BERNAL *et al*, 2010).

Infelizmente, as opções terapêuticas para FHA são bastante escassas. Se a doença ainda não estiver em um estágio avançado, intervenções a fim de limitar o dano tecidual podem ser realizadas junto à unidade de tratamento intensivo, como o uso de glicocorticóides em hepatites autoimunes (ICHAH *et al*, 2007), ou antivirais como lamivudina e aciclovir nos casos de infecção viral (KUMAR *et al*, 2007). Carvão ativado e N-acetilcisteína (NAC) são as terapias estabelecidas para os casos de lesão hepática induzida por medicamento ou droga, especialmente em casos de overdose de paracetamol, no qual a NAC é a melhor terapia disponível (SAITO *et al*, 2010). Vale ressaltar que a maioria destes tratamentos está em caráter experimental e possuem eficácia reduzida ou a ser comprovada. Se ultrapassado o período inicial de 4 a 24 horas após o início da lesão, só resta uma única opção: transplante hepático de emergência.

Levando em conta a inexistência de tratamentos mais eficazes, a baixa disponibilidade de fígados para transplante e o custo exorbitante do cuidado médico dos pacientes, novas opções terapêuticas seriam extremamente valiosas. Portanto, o estudo dos mecanismos da lesão estéril é fundamental, pois possibilitará um maior entendimento não só da lesão hepática induzida por drogas, como o paracetamol, mas também proverá informações possivelmente úteis em várias outras enfermidades que compartilham o componente inflamatório da lesão estéril, como a

isquemia/reperfusão (ex.: infarto do miocárdio), gota, silicose, doença de Alzheimer, aterosclerose, dentre outras (ROCK *et al*, 2010).

A lesão hepática estéril pode ser estudada em camundongos através da administração de uma sobredose de paracetamol (WILLIAMS *et al*, 2010). Neste modelo, o animal sofre uma lesão hepática extensa desencadeada pelo acúmulo do metabólito do paracetamol chamado de N-acetil-*para*-benzoquinonaimina (NAPQI), uma molécula extremamente reativa. Em excesso, o metabólito NAPQI depleta os estoques celulares de glutathiona (GSH) e se liga covalentemente às biomoléculas, desestabilizando mitocôndrias, a estrutura celular e os sistemas enzimáticos do hepatócito, deixando-o altamente susceptível ao estresse oxidativo (HINSON *et al*, 2010). Esses eventos culminam na necrose de hepatócitos e inflamação hepática, o que pode levar à falência do órgão e morte.

A lesão estéril, como a causada por paracetamol, possui um componente imunológico bastante pronunciado, apesar da ausência de participação de microrganismos em seu desenvolvimento ou manutenção. Vários trabalhos têm relatado a presença dos parâmetros inflamatórios clássicos (*rubor, calor, tumor et dolor* – CELSUS, 30 A.C.) e a participação ativa de leucócitos nesse tipo de lesão (LIU *et al*, 2006; MCDONALD *et al*, 2010). Isto levou à descoberta da ativação dos receptores pró-inflamatórios por ligantes endógenos, moléculas que foram então denominadas DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). DAMPs podem ser liberados por virtualmente qualquer tipo celular encontrado sob estresse ou em necrose. Com a ruptura de organelas e da membrana plasmática, características desse tipo de morte celular, os constituintes internos são expostos ao meio extracelular (GREEN, 2011), onde podem estimular uma série de receptores nas células vizinhas, sejam elas do parênquima ou leucócitos residentes (CHEN & NUÑEZ, 2010).

Os DAMPs são moléculas de natureza bastante variada, como a proteína nuclear HMGB1 (*high-motility group box 1*), HSPs (*heat-shock proteins*) e proteínas de ligação ao cálcio S100; há também fragmentos de DNA mitocondrial, ácido úrico citoplasmático, ATP, peptídeos mitocondriais formilados e até componentes da matriz extracelular, como hialuronato e sulfato de heparan (ROCK *et al*, 2010). Levando em conta a semelhança da resposta inflamatória a microrganismos em relação à estéril, seria possível que os mesmos receptores do hospedeiro modulassem ambas as respostas. Isso se revelou verdadeiro na descoberta da participação de vários Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) na inflamação estéril, os quais

detectam motivos estruturais típicos de microrganismos, originalmente. As cinco classes de PRRs são: Receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG-I (RLR), receptores de lectina tipo C (CLR) e receptores tipo ausente em melanoma 2 (AIM2) (CHEN & NUÑEZ, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre as consequências da ativação destes receptores nos mecanismos da atividade de leucócitos na lesão estéril *in vivo*, sejam como possíveis estímulos quimiotáticos ou mesmo de função efetora, como indutores de explosão respiratória (produção de espécies reativas de oxigênio) desgranulação (liberação de enzimas e proteínas antimicrobianas granulares) ou formação de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*, redes de DNA associadas a proteínas, com atividade proteolítica e antimicrobiana – BRINKMANN *et al*, 2004).

Trabalhos publicados nos últimos anos relatam que células NK, NKT (LIU *et al*, 2004) e neutrófilos (LIU *et al*, 2006) podem participar do desenvolvimento da lesão estéril induzida por paracetamol, pois animais que não possuíam estas células desenvolveram uma lesão significativamente menor quando comparada àquela em animais normais. Além disso, dados recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que ATP e peptídeos formilados de origem mitocondrial participam da ativação de células e quimiotaxia de neutrófilos para o sítio de lesão, respectivamente, em um modelo de lesão estéril focal hepática (MCDONALD *et al*, 2010) (FIG.1). Esses dados, em conjunto com o conhecimento prévio sobre DAMPs e inflamação, sugerem que o sistema imune tem um papel importante na gênese e na severidade da lesão estéril, e, portanto representa um alvo para intervenções terapêuticas a fim de controlar tal fenômeno e as doenças do qual ele participa.

O neutrófilo é o primeiro leucócito a ser recrutado em sítios de inflamação aguda, como por exemplo, nos casos de necrose hepática aguda. Vários mediadores do recrutamento de leucócitos já são bem estabelecidos, como as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (homólogos murinos da CXCL8 humana) considerados agentes quimiotáticos clássicos (ZLOTNIK *et al*, 2006), o fator do complemento C5a, leucotrieno B4 e peptídeos formilados como f-MLP, dentre outros (BORREGAARD, 2010). Todas estas vias representam alvos terapêuticos para restringir a atividade de neutrófilos, pois alguns destes, como peptídeos formilados, são capazes não apenas de recrutar neutrófilos, mas também de induzir uma explosão respiratória nestas células, onde há intensa produção de espécies reativas de oxigênio, capazes de danificar tecidos e de estimular neutrófilos a formar NETs (BRINKMANN & ZYCHLINSKY, 2007).

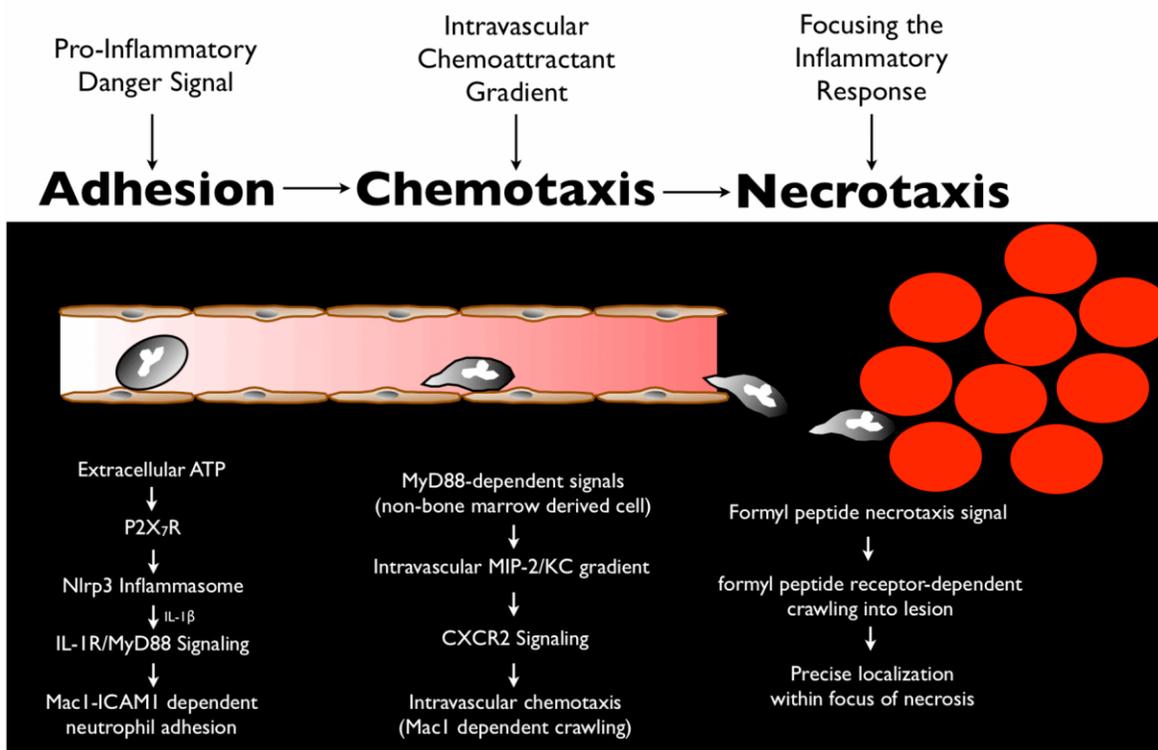


Figura 1 – Cascata de recrutamento de neutrófilos para a lesão focal estéril no fígado.

Em um artigo publicado recentemente no periódico *Science*, McDonald e colaboradores (2010) descreveram uma cascata de recrutamento de neutrófilos que envolvia principalmente duas etapas: a quimiotaxia através de um gradiente das quimiocinas MIP-2 e KC (CXCL1 e CXCL2, respectivamente) as quais se ligam a CXCR2, seguido de uma etapa de quimioatração por peptídeos formilados, agindo no receptor FPR1, através de uma área sem fluxo sanguíneo viável. Desse modo, foi descrito um mecanismo que guia neutrófilos precisamente até um ponto avascular de necrose tecidual.

Em vista do contexto da lesão hepática estéril, com seus vários mediadores e receptores putativos, restam questões importantes a serem respondidas, como a identificação de quais destas moléculas regulam o recrutamento de neutrófilos neste tipo de lesão. Ainda, quais são os mecanismos efetores desencadeados por estes ligantes em neutrófilos, que danificariam diretamente o tecido e que ainda não foram determinados. Definindo a contribuição do neutrófilo à lesão estéril, assim como os mecanismos pelos quais esta célula chega ao tecido e como o danifica diretamente, estaremos oferecendo uma promissora alternativa terapêutica não só para a falência hepática aguda, mas também para tantas outras doenças que compartilham do componente inflamatório estéril.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os mecanismos de recrutamento de neutrófilos e seu papel durante o processo inflamatório estéril hepático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Induzir a falência hepática aguda por paracetamol em camundongos
2. Quantificar o acúmulo de neutrófilos durante a falência hepática aguda induzida por sobredose de paracetamol;
3. Verificar o papel de neutrófilos na patogênese e exacerbação do dano hepático, por meio da depleção deste tipo celular e pelo uso de bloqueadores de agentes quimiotáticos;
4. Determinar as moléculas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o fígado necrótico;
5. Verificar a citotoxicidade mediada por neutrófilos através de co-cultura com HepG2 e por meio do antagonismo de seus receptores de ativação.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, a partir de quatro semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), com exceção da noite anterior aos experimentos, onde foram mantidos em jejum até o início do mesmo. Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 051/11). Também utilizamos animais que expressam a proteína verde fluorescente eGFP (Lysm-eGFP) apenas em seus neutrófilos, fornecidos pelo Prof. Paul Kubes da Universidade de Calgary, no Canadá.

3.2 O MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

O modelo de escolha deste projeto foi a lesão hepática induzida por sobredose de paracetamol. Baseado em nossos resultados preliminares (curva dose-resposta) e nos trabalhos de Williams *et al*, Hu *et al*, Liu *et al* e Imaeda *et al*, a dose padrão de paracetamol (*acetaminophen* - N-acetil-*para*-aminofenol - APAP) escolhida foi 500 mg/kg, e o tempo de sacrifício dos animais a 24^a hora após a administração do fármaco. APAP foi administrado por via oral (gavagem) dissolvido em salina estéril aquecida, enquanto que os animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Na 24^a hora ou no tempo determinado os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e submetidos a uma laparotomia. Foi feita uma sangria por cisão simultânea da artéria aorta e veia cava inferior, de onde uma amostra de sangue foi coletada para obtenção do soro e dosagem de ALT. O fígado foi retirado e seus lobos coletados em formaldeído 4% tamponado (PBS) para histologia, ou congelados em tubos para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO) e para dosagem de citocinas.

3.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E ANTICORPOS

Os tratamentos farmacológicos incluíram o uso de N-acetilcisteína (500 mg/kg), droga padrão usada no tratamento de intoxicação por paracetamol, administrada por gavagem 1 hora antes de APAP; Dexametasona (2 mg/kg) um potente anti-inflamatório esteroide, 1 hora antes por via subcutânea; BOC-1 (2 mg/kg), antagonista do receptor de peptídeos formilados FPR1, aplicado i.v. 1 hora antes de APAP; DF2156 (30 mg/kg), um composto experimental que bloqueia o receptor de quimiocinas CXCR2, por via oral; Apirase (25 U/animal) enzima capaz de degradar ATP extracelular livre. Utilizamos também um anticorpo anti-quimiocina CXCL1/KC (10 µg/animal) para bloqueio deste mediador; e realizamos a depleção de neutrófilos por administração de anticorpo anti-GR-1 (Ly-6G; 200 µg/animal; clone RB6-8C5), i.v., 24 horas prévias ao experimento. Como controles foram utilizados os veículos dos fármacos, ou os isotipos dos anticorpos.

3.4 VISUALIZAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL INTRAVITAL

A microscopia intravital é uma técnica bastante valiosa no que se refere à observação *in vivo* e em tempo real da microvasculatura e das interações das células, como os leucócitos, com estes vasos (MENEZES *et al*, 2009). Esta técnica permite a quantificação de leucócitos em rolamento e aderidos aos vasos, além daqueles transmigrados para o interior dos tecidos, os quais são eventos bem estabelecidos como indicativos de inflamação tecidual. Considerando isso, a microscopia intravital de fígado de camundongos foi realizada utilizando um microscópio confocal Olympus Fluoview e corantes fluorescentes. Para este fim, usando um pequeno suporte de acrílico, posicionamos um camundongo anestesiado e expusemos seu fígado a uma distância adequada da objetiva. Após esta pré-montagem, a camundongo recebeu uma injeção do corante fluorescente inespecífico Rodamina 6G (150 µL; 0,05%) ou do anticorpo fluorescente de escolha (5µL/animal), por via intravenosa. Em seguida, uma área do tecido hepático em boas condições foi selecionada e focalizada, a partir da qual foram coletadas imagens e vídeos para análise subsequente. O microscópio confocal está localizado no Departamento de Física (ICEX - UFMG), e será utilizado com o auxílio da Profa. Ana Maria de Paula.

3.5 QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE LESÃO HEPÁTICA POR DOSAGEM DE ALANINA AMINOTRANSFERASE NO SORO

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima de origem citoplasmática, cuja maior atividade está localizada no fígado. Seus níveis séricos encontram-se elevados em várias doenças hepáticas, incluindo hepatite viral ou tóxica, podendo aumentar entre cinquenta e até cem vezes em relação aos valores basais. Seu aumento é associado à necrose ou dano à membrana do hepatócito. Para determinar a atividade da ALT utilizamos o Kit Transaminase ALT cinético (Bioclin), e, como amostras, os soros obtidos por centrifugação do sangue dos camundongos testados. Em suma, o teste consiste em duas reações, onde primeiramente a ALT catalisa a transferência do grupamento amina da alanina para o alfa-cetoglutarato, levando à formação de piruvato e glutamato. O piruvato em presença de lactato desidrogenase (LDH) reage com o NADH, reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD^+ . A velocidade de diminuição da concentração de NADH é proporcional à atividade de ALT no soro analisado. As medidas são feitas como quatro leituras de absorbância a 340 nm, em intervalos de um minuto, cujo valor médio reflete a atividade da enzima na amostra. Este é o método recomendado pela *International Federation of Clinical Chemistry*.

3.6 ESTIMATIVA DA INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PELO ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE

A enzima mieloperoxidase (MPO) é expressa principalmente por neutrófilos. Quando presente no tecido, é indicativo de infiltrado neutrofílico no mesmo. Desse modo, a quantificação dessa enzima pode, mesmo que indiretamente, determinar a intensidade do infiltrado de neutrófilos no fígado. Resumidamente, parte do fígado dos animais foi coletada ao final do experimento e armazenada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para quantificação da atividade de MPO. Para tanto, o material foi pesado, macerado em homogeneizador com solução tampão (PBS - EDTA) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em NaCl 0,2% gelado, após 30 segundos foi adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelado. O material foi rapidamente homogeneizado e submetido à nova centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em PBS com HTAB 0,5%. As amostras foram rapidamente homogeneizadas e congeladas/descongeladas seguidamente três

vezes em nitrogênio líquido, submetidas novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 25µl de cada amostra foi adicionado à placa de 96 poços, em duplicata, onde o branco foi representado por PBS. Em seguida os poços receberam uma solução de DMSO com o substrato TMB, e a placa incubada em câmara escura por cinco minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 100µl de H₂SO₄ e a absorbância medida em 450 nm. As absorbâncias obtidas foram comparadas a uma curva-padrão de MPO de neutrófilos coletados da cavidade peritoneal sob estímulo de caseína, sendo os dados apresentados como número de neutrófilos relativo a essa curva.

3.7 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA

A glutathiona é um mecanismo não-enzimático de defesa contra estresse oxidativo. Ela é um tripeptídeo que permanece livre no citoplasma e serve para detoxificar peróxidos e outros agentes reativos. A glutathiona existe em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), sendo que em casos de estresse oxidativo ou intoxicação por APAP, os níveis de GSH são muito reduzidos. Portanto, para confirmar a intoxicação por APAP em nosso modelo, assim como excluir possíveis alterações no metabolismo de APAP por tratamentos farmacológicos prévios, a quantidade de GSH no fígado foi determinada colorimetricamente pela reação com ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) DTNB (*Ellman's reagent*). A absorbância das amostras foi lida em 450 nm, e comparada a uma curva-padrão de GSH.

3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

A produção de citocinas IL-6, IL-1β, TNF-α e quimiocinas CXCL1 e CXCL2 foram quantificadas pela técnica de ELISA em fragmentos de fígado de camundongos submetidos ou não à sobredose de APAP. Os fragmentos de fígado foram pesados e homogeneizados em tampão de extração de citocinas (contendo anti-proteases, Tween 20 e EDTA), e em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado até o dia do ensaio. Para a realização do ensaio utilizaremos kits Quantikine human immunoassay (R&D System, Abington, United Kingdom) para as referidas citocinas e quimiocinas.

3.9 CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Após a eutanásia dos camundongos, o fígado foi removido e lavado com salina. Em seguida, o lobo inferior (selecionado para a avaliação morfológica) foi retirado e fixado em formol 4% em PBS. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico de concentrações crescentes, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. A partir dos blocos, cortes teciduais de 5 µm de espessura foram obtidos utilizando um micrótomo e coletados em lâminas histológicas, as quais foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE).

3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise histopatológica do fígado é indício complementar de lesão hepática, quando considerado o aumento dos níveis de ALT sérica, mas também fornece informações valiosas no que se refere à morfologia do hepatócito, localização da lesão e tipo leucocitário predominante. Além da determinação das alterações celulares sofridas pelo hepatócito, como por exemplo, vacuolização e cariólise, é possível avaliar a porcentagem de áreas necróticas em relação à área total do corte histológico. As lâminas histológicas foram examinadas em microscópio óptico (BX41, Olympus) e as imagens obtidas utilizando uma câmera acoplada (Moticam 2500, Motic) e o *software* Motic Image Plus 2.0ML.

3.11 CULTURA CELULAR

Células da linhagem HepG2 (carcinoma hepático imortalizado) cedidas pela Prof. Maria de Fátima Leite (Laboratório de Sinalização de Cálcio, ICB, UFMG) foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram repicadas na proporção de 1:4 partes de meio de cultura, a cada 3 dias. Para os experimentos, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 por poço, em placas de 96 poços. Todos os experimentos envolvendo cultura celular foram realizados com o auxílio da mestranda Sylvia Amaral do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

3.12 INDUÇÃO DE LESÃO POR PARACETAMOL EM CULTURA CELULAR

Como método adicional do estudo da lesão hepática por paracetamol e para definir mecanismos da participação de leucócitos nesta doença, utilizamos uma versão *in vitro* do modelo de falência hepática aguda, que se baseia na incubação das células HepG2 com APAP. Avaliando nossos resultados preliminares e os trabalhos de Dai & Cederbaum, e Zhang *et al*, a dose padrão de paracetamol escolhida foi 5 mM, e o tempo de análise da viabilidade celular a 24^a hora após a administração de APAP. Os grupos experimentais receberam 150 µL de RPMI sem soro contendo APAP (concentração final 5 mM) e 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto que o grupo controle recebeu apenas RPMI e DMSO. Este protocolo foi repetido com a adição dos fármacos BOC-1 (100 µM) e DF2156 (10µM) à solução contendo APAP, e incubado por 24 horas. Na 20^a hora, o sobrenadante foi recolhido para análises posteriores, sendo substituído por 150 µL de meio RPMI para o ensaio com MTT.

3.13 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Para averiguar a viabilidade celular da linhagem HepG2 realizamos o teste de produção de cristais de formazan após incubação com o reagente MTT (3,4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Após 20 horas de incubação com APAP, os sobrenadantes foram retirados e os poços preenchidos com RPMI sem soro. MTT foi dissolvido em PBS na concentração de 5 mg/mL, e adicionado em um volume total de 15 µL por poço. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C 5% CO₂. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e os cristais de formazan formados foram solubilizados em 100 µL de DMSO por poço. A densidade óptica foi lida em um leitor de ELISA a uma absorbância de 595 nm. Grupos que não receberam APAP foram considerados como 100% viáveis; a viabilidade de cada amostra tratada foi apresentada como um percentual desta.

3.14 PURIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos presentes no sangue venoso de voluntários foram isolados por meio de um gradiente de densidade (Ficoll) utilizado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma

Chemical, St. Louis, MO). De forma resumida, a purificação de neutrófilos consiste em três etapas: 1) Sedimentação por centrifugação com dextrana, para remoção da maioria dos eritrócitos; 2) Lise hipotônica, para remoção de eritrócitos remanescentes e plaquetas; 3) Sedimentação por centrifugação em gradiente de densidade, para separar células mononucleares de polimorfonucleares. Os neutrófilos se localizam na fase inferior do gradiente. Uma proporção desejável de 95% de pureza foi confirmada por esfregaço da suspensão celular recuperada. Este protocolo encontra-se em submissão para avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG.

3.15 CO-CULTURA DE HEPG2 E NEUTRÓFILOS PURIFICADOS

Para determinar mecanismos de dano celular mediado por neutrófilos, conduzimos experimentos de co-cultura da linhagem hepática HepG2 com neutrófilos humanos purificados. Realizamos os experimentos com células tratadas ou não com APAP, e incubadas com quantidades crescentes de neutrófilos (1×10^2 até 1×10^5 neutrófilos por poço). Tratamentos farmacológicos das células, como o bloqueio de CXCR2 (DF2156A, $10\mu\text{M}$) e FPR1 (BOC-1, $100\mu\text{M}$) foram aplicados simultaneamente à incubação com APAP.

3.16 QUANTIFICAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL CIRCULANTE POR REAL-TIME PCR

A averiguação do extravasamento de conteúdo mitocondrial durante a necrose hepatocelular por APAP é um ponto de grande importância, pois atua como o principal embasamento para o questionamento da participação de DAMPs em nosso modelo. Para tanto, quantificamos DNA mitocondrial no soro de camundongos submetidos ou não à sobredose de APAP, determinando se DNA mitocondrial e, indiretamente, peptídeos mitocondriais são liberados durante a necrose hepática. Para isso, primeiramente realizamos a purificação de mitocôndrias do fígado de camundongos, baseado na metodologia descrita por PESTANA *et al*, 2009. Em seguida, o DNA mitocondrial foi extraído usando fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, e, com o DNA purificado foi confeccionada uma curva-padrão com concentrações variando entre 500 fg a 500 ng para os três genes mitocondriais avaliados: NADH desidrogenase,

Citocromo c oxidase e Citocromo B. Como amostras utilizamos 100 μ L de soro fresco, do qual foi extraído o DNA utilizando o kit Genomic DNA Purification (Fermentas K0512). As reações de Real-Time PCR foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, (Applied Biosystems) com anelamento dos primers a 60°C e 1 μ L do DNA mitocondrial extraído. Os *cycle thresholds* (CTs) coletados foram aplicados nas fórmulas de regressão linear obtidas das curvas-padrão dos genes selecionados. Os resultados foram expressos em η g de DNA mitocondrial por 100 μ L de soro. Estes experimentos foram feitos com o auxílio do Pós-Doutorando Frederico Soriani, do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre dois grupos será feita pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste será one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Se os dados não possuírem distribuição normal, o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunn serão aplicados. Todos os resultados serão apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm). O nível de significância foi definido como $p < 0.05$. Os gráficos e estatística serão feitos com o auxílio do *software* GraphPad Prism 4.

4 RESULTADOS

4.1 A SOBREDOSE DE APAP CAUSA LESÃO HEPÁTICA EM UMA MANEIRA DOSE- E TEMPO-DEPENDENTE

A administração de uma sobredose de APAP em camundongos causa necrose hepática, medida pelo aumento da atividade da transaminase hepática alanina aminotransferase (ALT) no soro sanguíneo destes animais. A atividade de ALT aumentou proporcionalmente à dose de APAP, atingindo seu pico em 500 mg/kg. Utilizando essa mesma dose, observamos que o pico de necrose hepática ocorre na vigésima quarta hora após a aplicação de APAP.

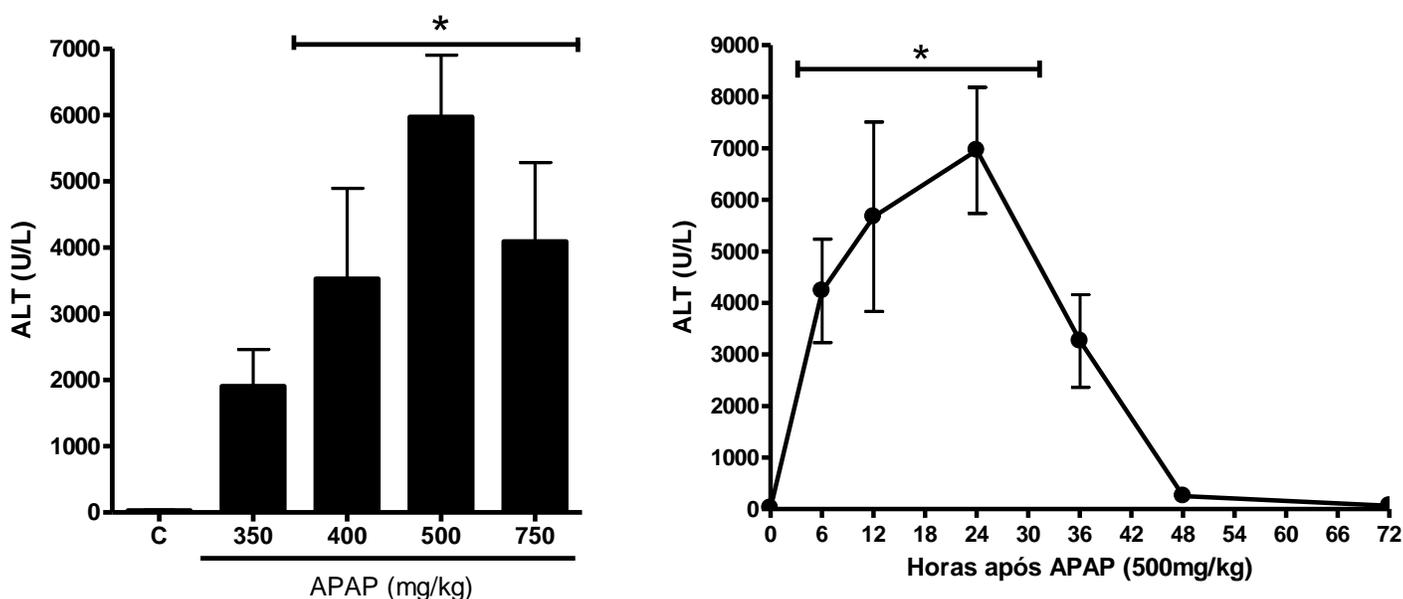


Gráfico 1 – Aumento dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) induzido por sobredose de paracetamol (APAP) em curva dose-resposta (esquerda) e tempo-resposta (direita).

APAP foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP ou nos tempos determinados na curva tempo-resposta. A dose de APAP na curva-tempo resposta foi 500mg/kg. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (C ou 0 hora) e os grupos tratados.

4.2 A SOBREDOSE DE APAP INDUZ NECROSE HEPÁTICA GENERALIZADA

Corroborando o aumento de ALT sérica de camundongos após a sobredose de APAP, a histologia do fígado destes animais evidencia uma necrose oncótica centrolobular intensa e disseminada por todo o órgão, uma lesão característica do envenenamento por APAP (JAMES *et al*, 2003). É possível observar graves alterações morfológicas no parênquima hepático de animais tratados, quando comparados a animais que não receberam APAP. Na área de necrose e seus arredores há vacuolização, cariólise e uma desorganização completa da estrutura dos hepatócitos (FIG. 2B e 2D).

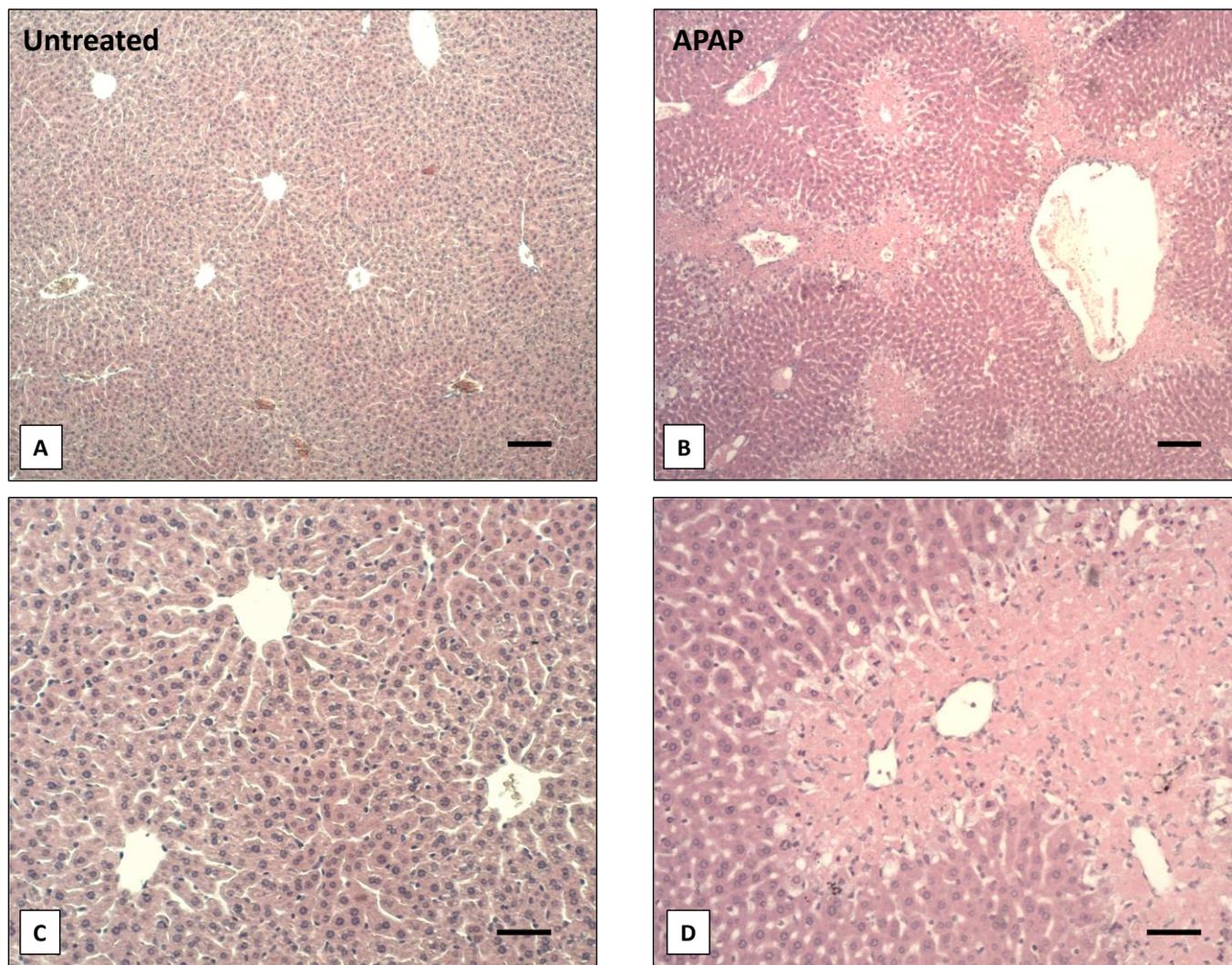


Figura 2 – Cortes histológicas representativas do fígado de camundongos saudáveis (A e C) ou submetidos à sobredose de APAP (B e D).

APAP (500mg/kg) foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP e seus fígados fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. A escala em menor aumento (A e B) corresponde a 100 μ m e em maior aumento (C e D) corresponde a 50 μ m.

4.3 O ANTÍDOTO NAC PREVINE A LESÃO HEPÁTICA E A DEPLEÇÃO DE GLUTATIONA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP

O aminoácido N-acetilcisteína (NAC) é o tratamento de escolha em casos de intoxicação por paracetamol. NAC é o precursor de glutatona (GSH), um tripeptídeo antioxidante que é depletado durante a intoxicação. A administração de NAC previamente à overdose de APAP reduz a necrose hepática, como indicado pelo baixo nível de ALT sérica, assim como aumenta o nível de GSH hepático. Estes resultados indicam que nosso modelo reproduz dados publicados na literatura e que responde a intervenções terapêuticas, como aquelas já utilizadas na clínica.

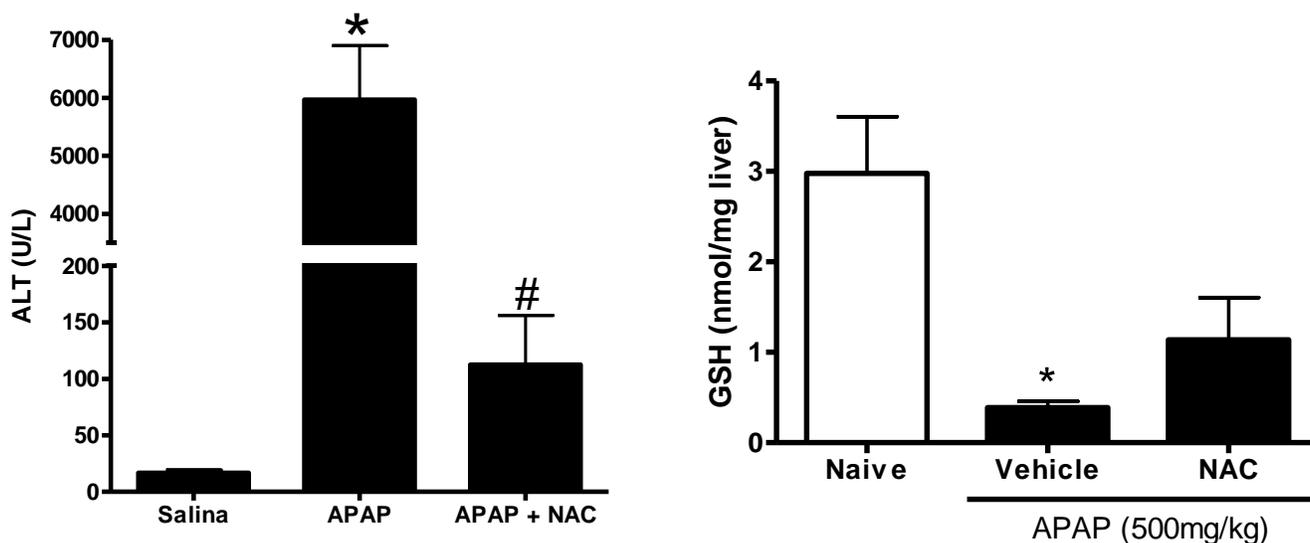
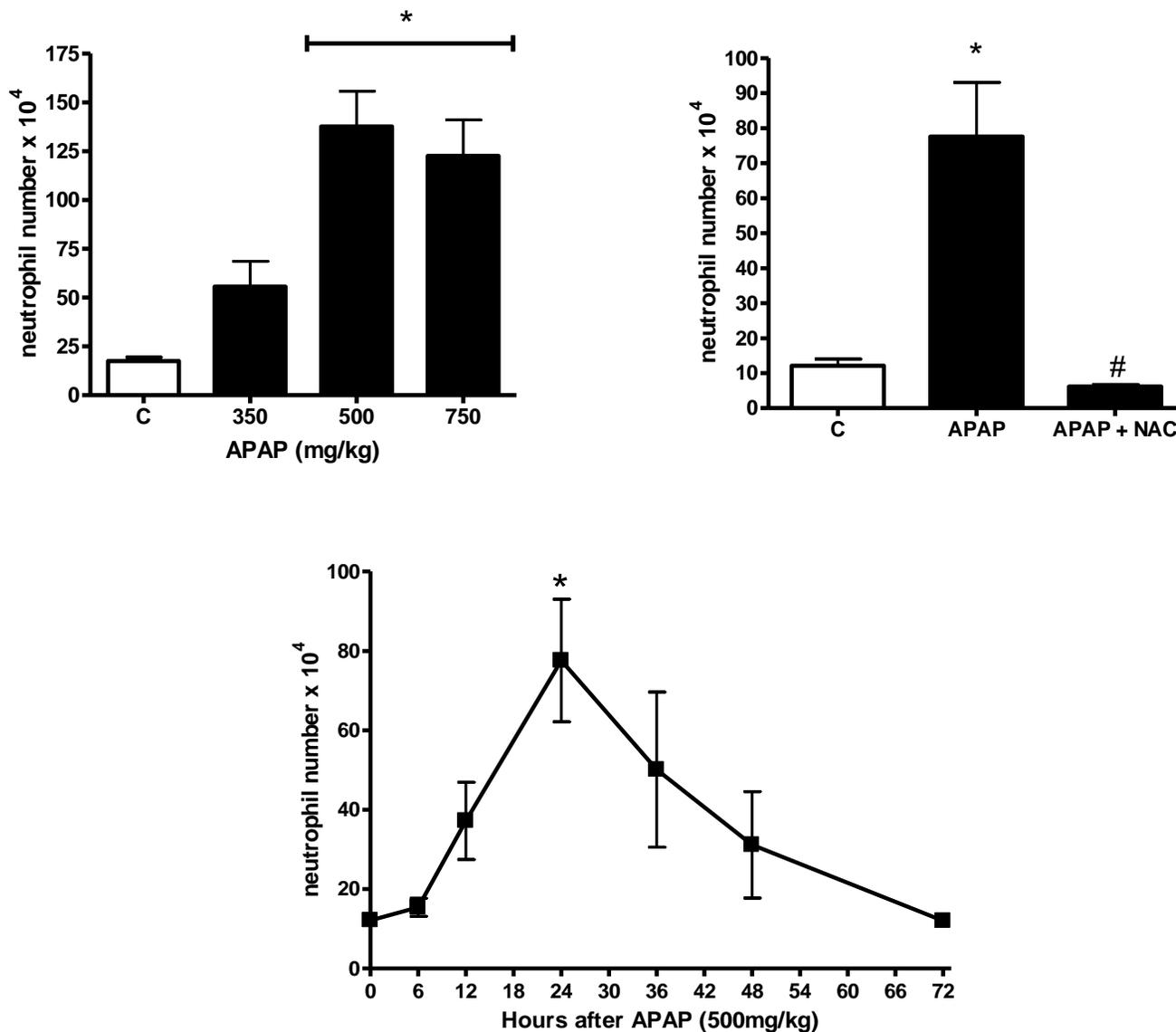


Gráfico 2 – O antídoto N-acetilcisteína (NAC) previne o aumento de ALT sérica e a depleção de glutatona hepática (GSH) induzidos por APAP.

Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP (500mg/kg), administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. NAC (500mg/kg) foi aplicada 1 hora antes de APAP, também por gavagem. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (C) e o grupo APAP; # indica diferença significativa entre grupo APAP e grupo APAP+NAC.

4.4 A NECROSE HEPÁTICA CAUSADA POR APAP LEVA AO ACÚMULO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO

A necrose hepática induzida por sobredose de APAP é acompanhada por infiltração de neutrófilos no fígado, quantificada pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido. O influxo de neutrófilos ocorre proporcionalmente à dose de APAP utilizada, atingindo seu pico também na dose de 500 mg/kg, a mais eficaz em induzir necrose hepática. O pré-tratamento com o antídoto NAC previne o recrutamento de neutrófilos para o fígado, do mesmo modo que previne a indução de lesão. A curva tempo-resposta, utilizando a dose de 500mg/kg, revela que o pico de influxo de neutrófilos coincide com o momento de ALT máxima, a vigésima quarta hora.



4.5 A MICROSCOPIA INTRAVITAL DO FÍGADO DE ANIMAIS TRATADOS COM APAP CONFIRMA UM INTENSO INFILTRADO NEUTROFÍLICO

Através da visualização do parênquima hepático pela técnica de microscopia intravital, e da utilização de camundongos transgênicos que expressam GFP em seus neutrófilos (LysmeGFP), confirmamos que o principal tipo de leucócito recrutado ao fígado é o neutrófilo. Também observamos que, na 24^a hora, o influxo de neutrófilos aparentemente se localiza em áreas circunscritas onde não se percebe a arquitetura convencional do tecido, ou seja, prováveis zonas de tecido necrótico, como as observadas na Figura 1.

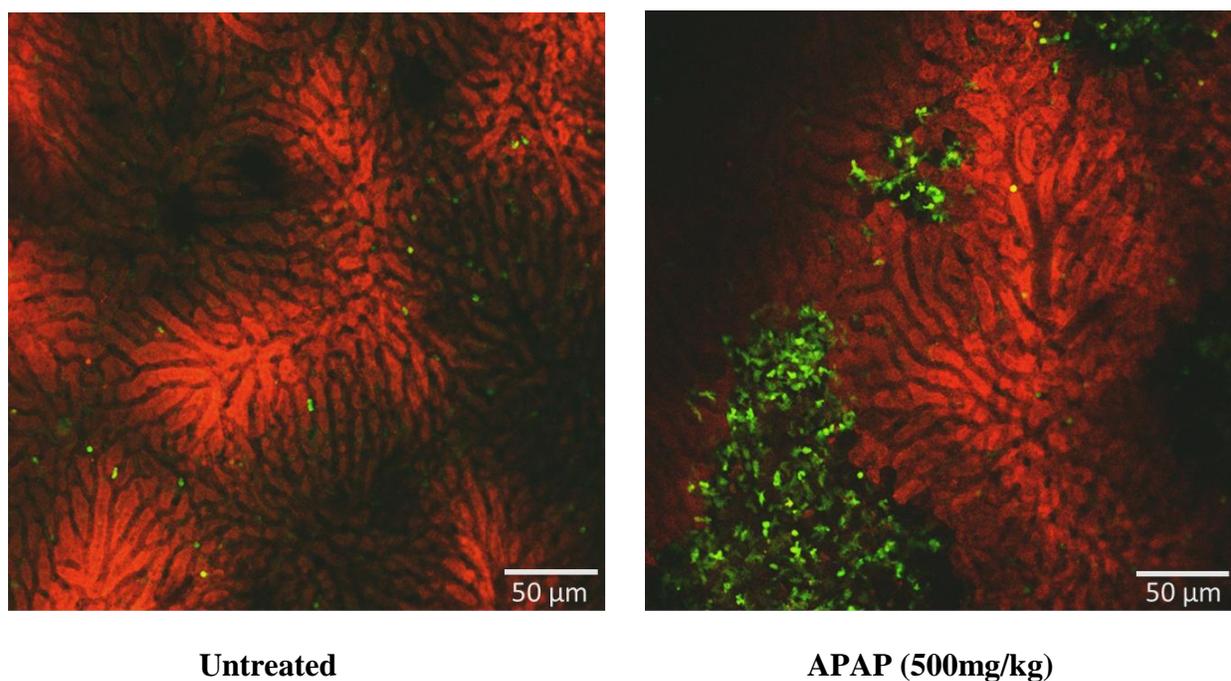


Figura 3 – Infiltrado neutrofilico no tecido hepático de animais tratados com APAP, visualizado pela técnica de microscopia intravital.

Observa-se o parênquima hepático corado em vermelho pela rodamina 6G (0.05%) e neutrófilos em verde (camundongo Lysme-GFP). APAP (500mg/kg) foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Os animais tiveram seu fígado exposto e visualizado 24 horas após a administração de APAP.

4.6 DEXAMETASONA REDUZ A LESÃO HEPÁTICA POR APAP EM 34% MAS NÃO ALTERA O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO

A dexametasona é um potente anti-inflamatório esteroideal, utilizado na clínica em transtornos inflamatórios graves e auto-imunes. Com o objetivo de eliminar o componente imunológico da lesão hepática por APAP, pré-tratamos nossos animais com esse medicamento. Observamos que há uma inibição de aproximadamente 30% da lesão hepática, medido por ALT, mas não há alteração apreciável da atividade de MPO. Desse modo, decidimos adotar outra abordagem mais específica, a depleção de neutrófilos por anticorpo monoclonal (GRÁF. 5).

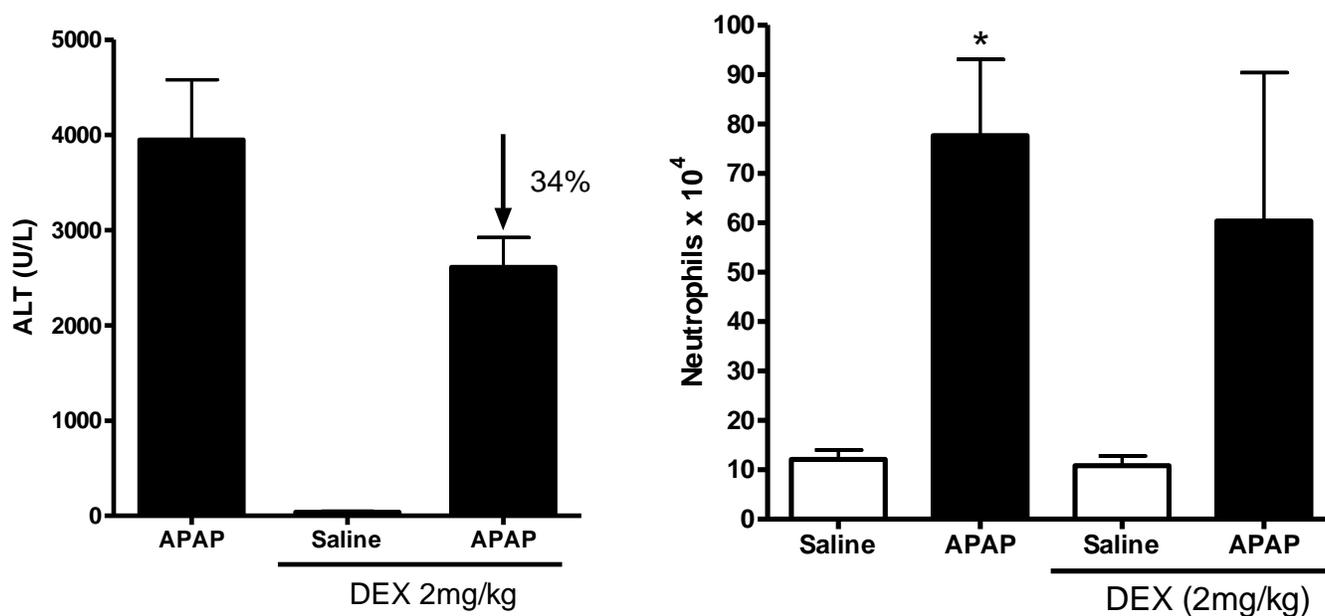


Gráfico 4 – Pré-tratamento com Dexametasona previne parcialmente a lesão hepática induzida por APAP, sem interferir no recrutamento de neutrófilos ao tecido.

A lesão hepática foi estimada pelo aumento de ALT sérica (esquerda) e o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO tecidual (direita). APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. Dexametasona (DEX, 2mg/kg) foi administrado 1 hora antes de APAP, s.c.. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP.

4.7 A DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS PROTEGE CAMUNDONGOS DA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP

A eliminação de neutrófilos com o uso de anticorpo anti-GR1 previne a lesão hepática induzida por sobredose de APAP. Atingimos uma depleção de aproximadamente 86% de neutrófilos circulantes, averiguada por esfregaço sanguíneo. Quando submetidos à sobredose de APAP, camundongos depletados apresentaram uma necrose hepática 75% menor que a de animais não tratados.

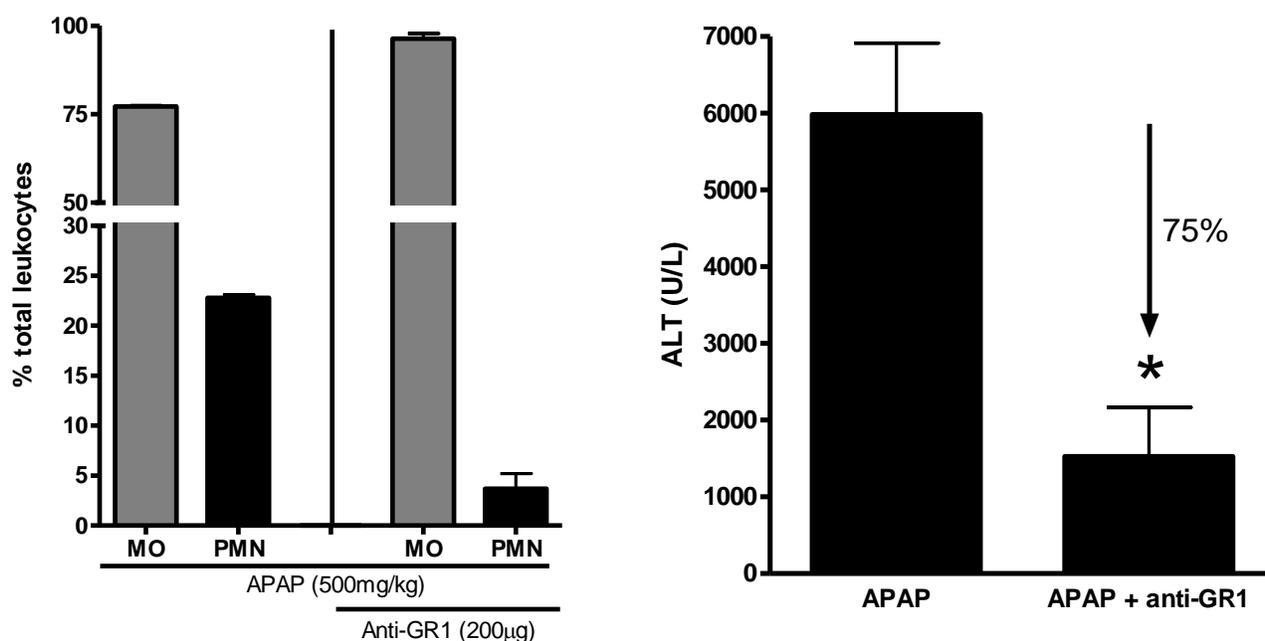


Gráfico 5 – A depleção de neutrófilos prévia à indução de lesão por APAP reduz nitidamente o dano hepático. A depleção foi realizada com anticorpo anti-GR1 (RB6-8C5; 200µg/animal) aplicado i.v., e confirmada por esfregaço sanguíneo (esquerda). O dano hepático foi quantificado pelo nível de ALT sérica (direita). APAP foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a aplicação de APAP. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre o grupo APAP e o grupo APAP + anti-GR1.

4.8 A SOBREDOSE DE APAP INDUZ A PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NO FÍGADO

As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são mediadores estabelecidos como potentes indutores do recrutamento de neutrófilos, através da ativação do receptor CXCR2 nestas células. Na 24^a hora após a sobredose de APAP, observamos um aumento significativo de ambas quimiocinas no tecido hepático, o que indica que estas podem ter um papel no recrutamento de neutrófilos para o fígado observado neste modelo (FIG. 2).

Citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-6 são conhecidas por seu papel pró-inflamatório no organismo. Observamos que também há um aumento da concentração de IL-1 β e TNF α no fígado, principalmente na 24^a após APAP, acompanhando o aumento de CXCL1 e CXCL2 neste momento. A concentração de IL-6 não sofreu variações apreciáveis. Estes dados nos indicam mais uma vez que um processo inflamatório ocorre no fígado necrótico, o qual pode estar causando dano excessivo a este tecido.

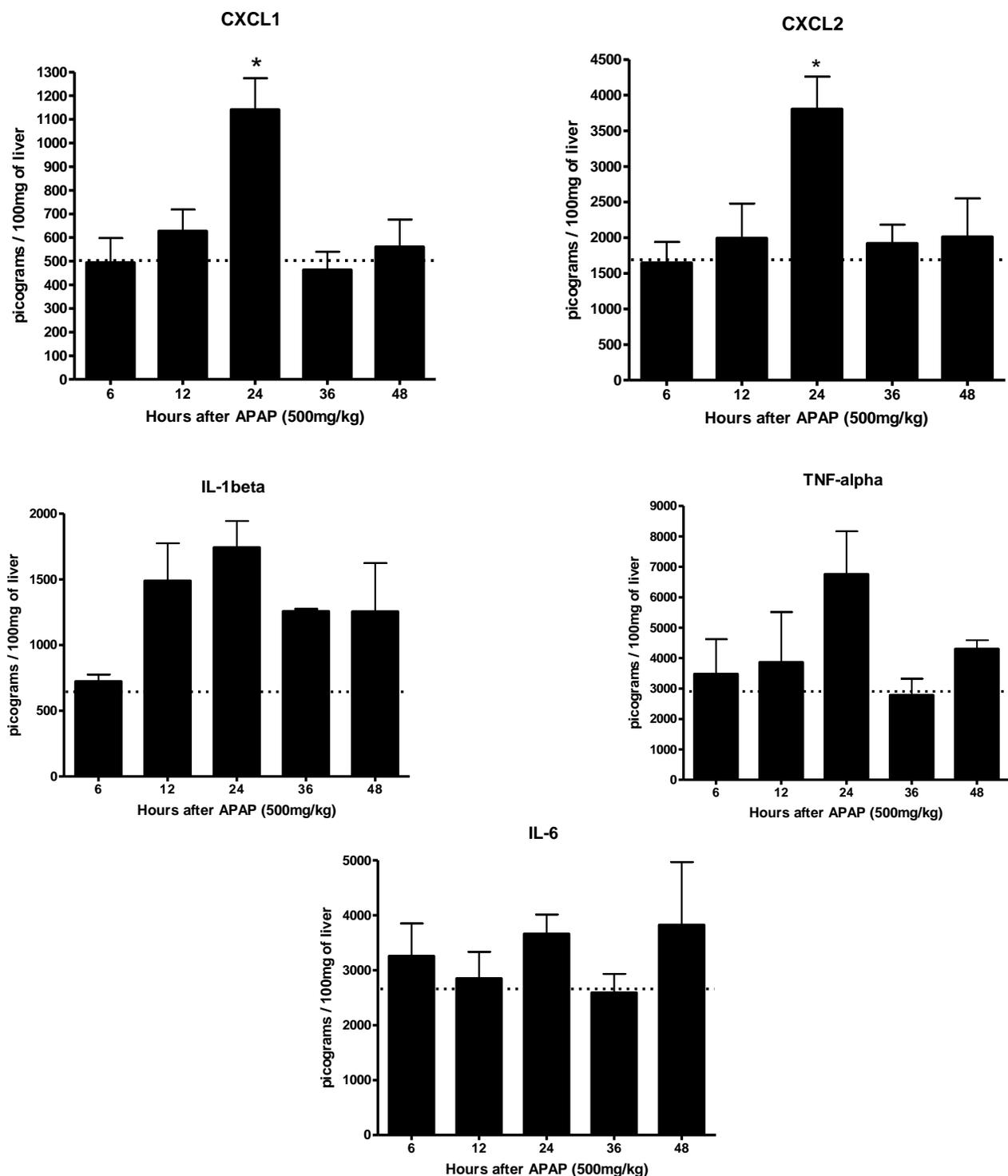


Gráfico 6 – A sobredose de APAP induz a produção de quimiocinas ligantes de CXCR2 e citocinas inflamatórias no fígado.

APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados no período de 6 a 48 horas após APAP, quando fragmentos de fígado foram coletados para extração de citocinas. A quantificação foi feita com o kit Quantikine human immunoassay (R&D Systems). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores basais (linha pontilhada) e os grupos APAP.

4.9 O ANTAGONISMO DO RECEPTOR CXCR2 REDUZ LEVEMENTE A LESÃO HEPÁTICA, MAS CAUSA UMA REDUÇÃO MARCANTE NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO

O receptor de quimiocinas CXCR2 induz a quimiotaxia de neutrófilos quando ativado por seus ligantes CXCL1 e CXCL2. O bloqueio deste receptor pelo composto DF2156A inibe parcialmente a lesão hepática induzida por APAP, mas reduz em 50% o recrutamento de neutrófilos para o fígado. Este dado é indicativo adicional da participação do sistema de quimiocinas no recrutamento de neutrófilos para a lesão hepática estéril.

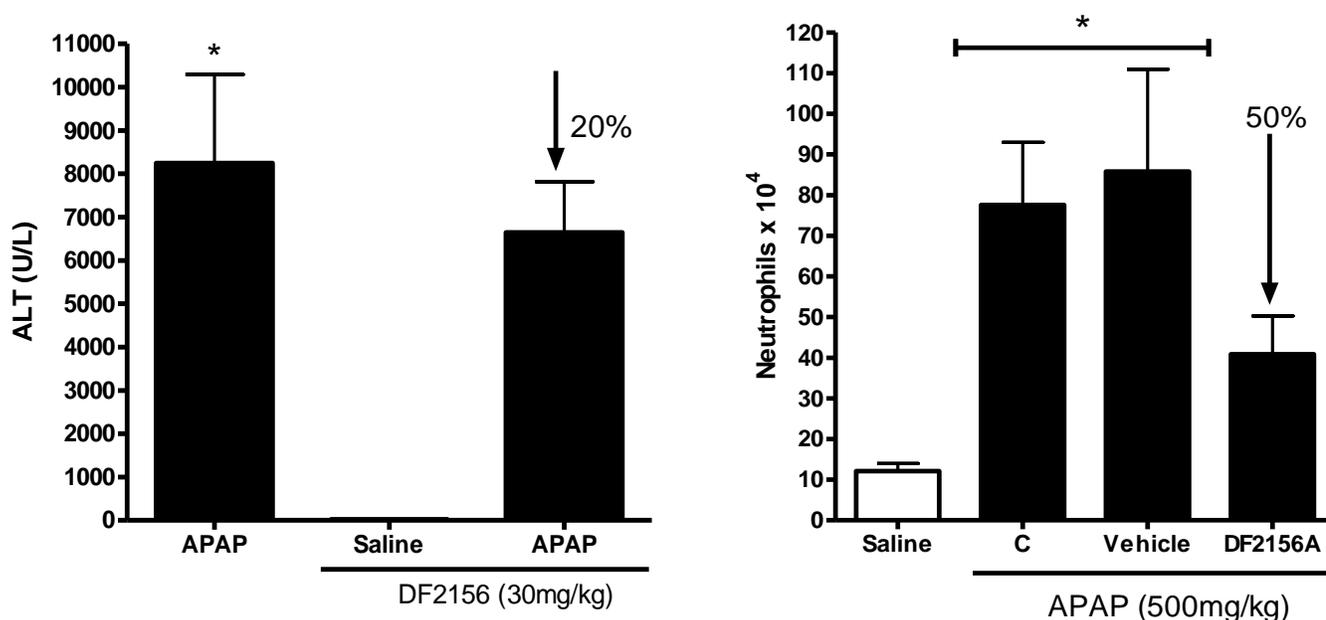


Gráfico 7 – Pré-tratamento com o antagonista de CXCR2, o composto DF2156A, previne parcialmente a lesão hepática induzida por APAP, mas reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido.

A lesão hepática foi estimada pelo aumento de ALT sérica (esquerda) e o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO tecidual (direita). APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. DF2156 (30mg/kg) foi administrado 1 hora antes de APAP, por gavagem. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP.

4.10 O BLOQUEIO DA QUIMIOCINA CXCL1 / KC REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA POR APAP E INIBE EM UM TERÇO O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO

Demonstramos que a quimiocina CXCL1 é produzida no fígado necrótico após a sobredose de APAP (GRÁF. 6). O bloqueio da ação desta quimiocina pelo pré-tratamento com anticorpo anti-CXCL1 protege os camundongos da lesão hepática induzida por APAP e reduz em 35% o recrutamento de neutrófilos para o tecido. Em conjunto, os dados dos gráficos 5, 6, 7 e 8 sugerem que a ativação do receptor CXCR2 pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL2 é um mecanismo importante de recrutamento de neutrófilos e indução de dano adicional por estas células durante a lesão hepática estéril.

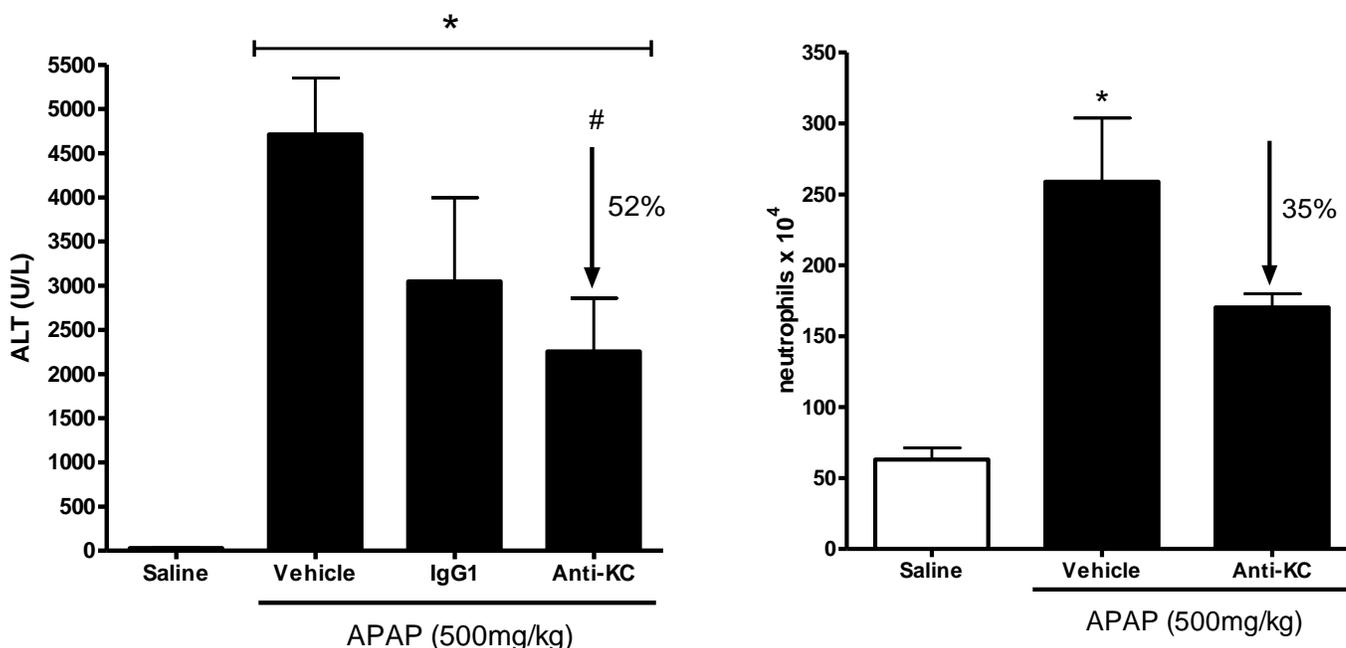


Gráfico 8 – Pré-tratamento com o anticorpo anti-CXCL1/KC, previne a lesão hepática induzida por APAP e reduz o recrutamento de neutrófilos para o tecido.

A lesão hepática foi estimada pelo aumento de ALT sérica (esquerda) e o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO tecidual (direita). APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. O anticorpo anti-KC (10 μ g/animal) foi administrado 2 horas após APAP, via i.v.. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP. # indica diferença entre o grupo veículo e anti-KC.

4.11 ELIMINAÇÃO DO ATP EXTRACELULAR REDUZ O DANO HEPÁTICO INDUZIDO POR APAP, MAS NÃO ALTERA O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS

Após nossos estudos envolvendo o sistema de quimiocinas, decidimos explorar a questão de quais DAMPs estariam envolvidos no recrutamento e ativação de neutrófilos em nosso modelo. Considerando os dados previamente publicados pelo nosso grupo (MCDONALD *et al*, 2010), ATP e peptídeos formilados originados de mitocôndrias representam bons candidatos para mediar tais processos em neutrófilos. Desse modo, primeiramente, avaliamos o papel do ATP extracelular através da aplicação endovenosa da enzima apirase, que degrada este mediador, após a aplicação da sobredose de APAP. Na ausência de ATP extracelular, observamos que há uma proteção significativa da lesão induzida por APAP, apesar de que o recrutamento de neutrófilos se mantém inalterado.

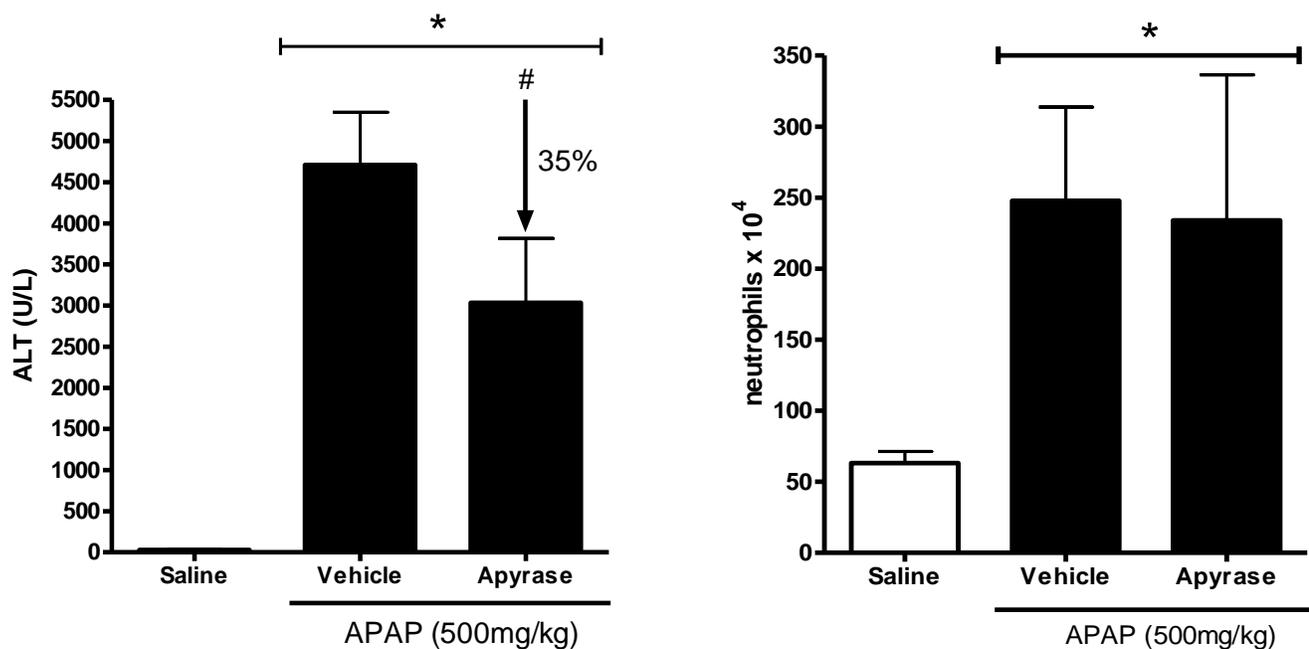


Gráfico 9 – A degradação de ATP extracelular pela enzima apirase reduz a lesão hepática, mas não interfere no recrutamento de neutrófilos.

A lesão hepática foi estimada pelo aumento de ALT sérica (esquerda) e o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO tecidual (direita). APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. A enzima apirase (25 U/animal) foi administrada 2 horas após APAP, via i.v.. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP. # indica diferença entre os grupos APAP.

4.12 DAMPS MITOCONDRIAIS SÃO LIBERADOS NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA DURANTE A NECROSE HEPÁTICA INDUZIDA APAP

A lesão hepática por APAP consiste em uma necrose hepatocelular intensa, que pode levar à falência hepática aguda (HINSON *et al*, 2010). Considerando a abundância de mitocôndrias em hepatócitos e a extensa necrose que ocorre nestas células quando expostas a APAP, é plausível supor que o conteúdo intracelular, incluindo material mitocondrial, extravase para o meio extracelular e aja como um forte estímulo inflamatório (JAESCHKE *et al*, 2012). Levando em conta que peptídeos formilados mitocondriais já foram caracterizados como agentes quimiotáticos para neutrófilos na lesão hepática estéril (ZHANG *et al*, 2010), é de grande importância saber se esse tipo de molécula está sendo liberada durante a intoxicação por APAP. Desse modo, quantificamos DNA mitocondrial (DNAmit) no soro de camundongos através técnica de Real-Time PCR, objetivando medir indiretamente a liberação de material mitocondrial, especialmente peptídeos formilados. Observamos um aumento extraordinário de DNAmit no soro de animais tratados com APAP, indicando claramente a liberação conjunta de peptídeos formilados no meio extracelular.

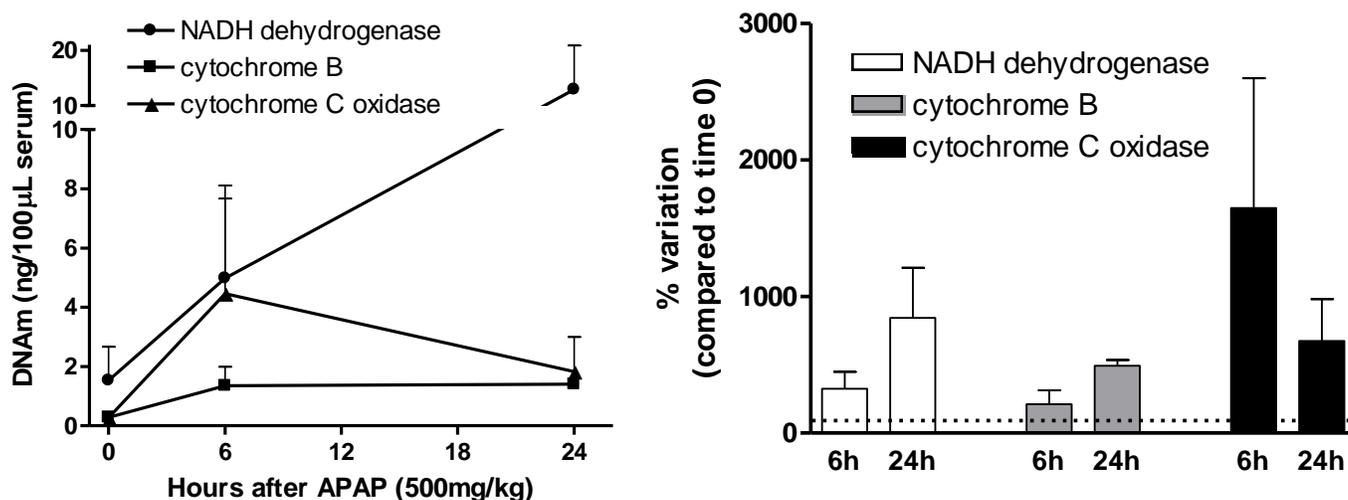


Gráfico 10 – A necrose hepática por APAP leva à liberação de DNA mitocondrial na circulação sanguínea. DNAmit foi purificado do soro de camundongos e quantificado por Real-Time PCR. APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os grupos.

4.13 O BLOQUEIO DO RECEPTOR DE PEPTÍDEOS FORMILADOS FPR1 CAUSA UMA PEQUENA REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE ALT E INIBE EM 25% O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS

Peptídeos formilados são formados na síntese proteica de bactérias ou mitocôndrias. Considerando que trabalhamos com uma lesão estéril, a única fonte de peptídeos formilados seriam mitocôndrias. Bloqueando o receptor destes peptídeos (FPR1) com a droga BOC-1, obtivemos uma leve redução da lesão hepática por APAP e o influxo de neutrófilos foi reduzido em 25%. Estes dados sugerem que peptídeos formilados mitocondriais podem estar envolvidos no recrutamento de neutrófilos na lesão hepática estéril.

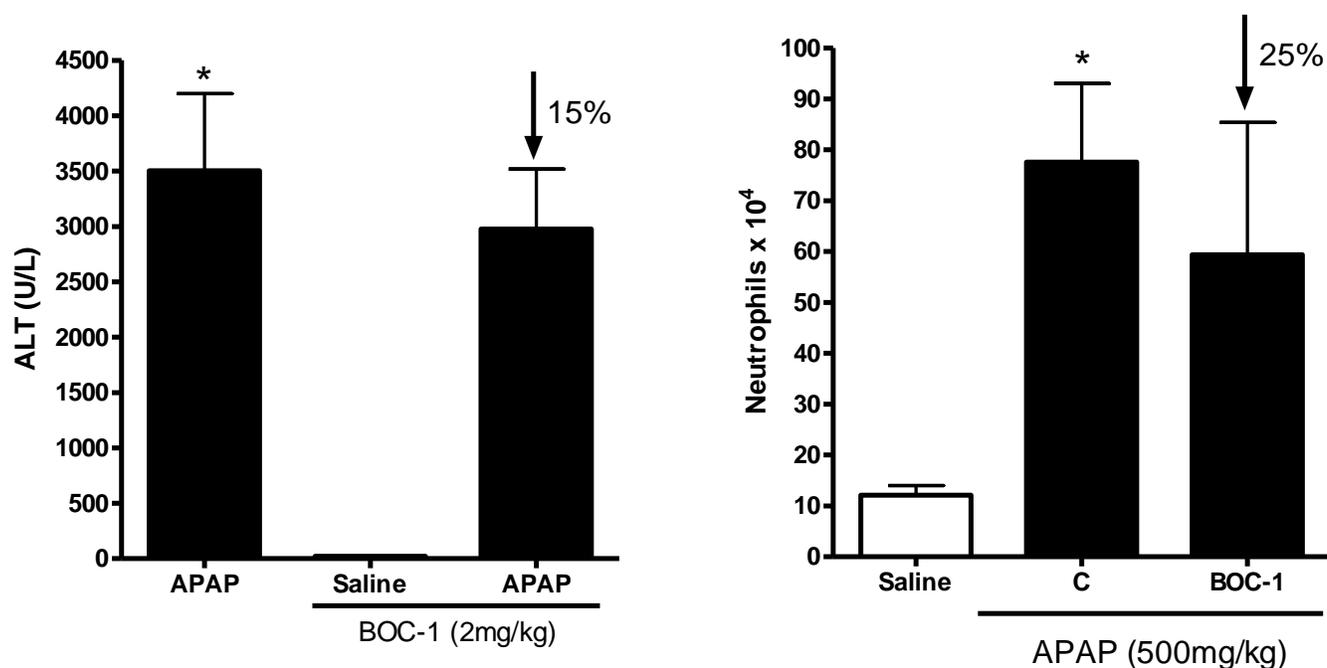


Gráfico 11 – O antagonista de FPR1, composto BOC-1, reduz moderadamente a lesão hepática por APAP, mas reduz em 25% o recrutamento de neutrófilos.

A lesão hepática foi estimada pelo aumento de ALT sérica (esquerda) e o número de neutrófilos pelo ensaio de MPO tecidual (direita). APAP (500mg/kg) foi administrado por gavagem, dissolvido em salina aquecida. BOC-1 (2mg/kg) foi administrado 1 hora antes de APAP, via i.v.. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP.

4.14 BOC-1 E DF2156 REDUZEM A PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NO FÍGADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À SOBREDOSE DE APAP

Os fármacos antagonistas de FPR1 e CXCR2 (BOC-1 e DF2156, respectivamente), são capazes de reduzir a síntese de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias no fígado de camundongos que receberam APAP. O pré-tratamento com BOC-1 inibiu significativamente a produção de CXCL1, CXCL2 e TNF α na 24^a hora após administração de APAP, similarmente à Dexametasona (DEX) o anti-inflamatório usado como controle positivo. O bloqueio de CXCR2 reduziu a produção também das quimiocinas CXCL1 e CXCL2, mas não surtiu efeito na produção das citocinas avaliadas.

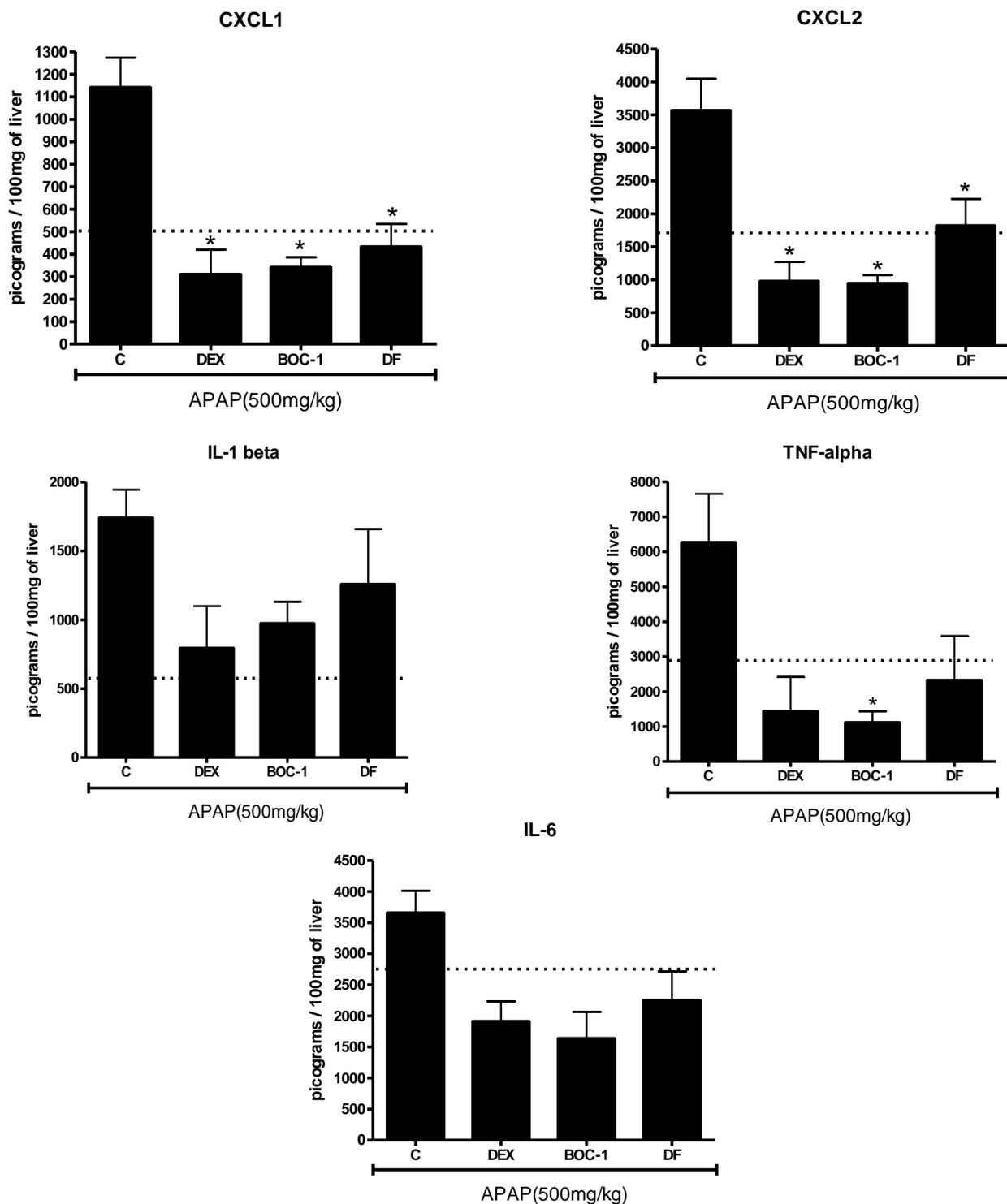


Gráfico 12 – O antagonismo de FPR1 e de CXCR2 inibe a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias no fígado necrótico.

Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após APAP, quando fragmentos de fígado foram coletados para extração de citocinas. Os pré-tratamentos foram aplicados 1 hora antes de APAP: Dexametasona (DEX; 2mg/kg), BOC-1 (2mg/kg), DF2156 (30mg/kg). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle.

4.15 O TRATAMENTO COMBINADO COM OS ANTAGONISTAS DE CXCR2 E FPR1 REDUZ SIGNIFICATIVAMENTE A LESÃO HEPÁTICA E O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O FÍGADO

A participação de diferentes mediadores, envolvidos em etapas sequenciais do recrutamento de neutrófilos na lesão hepática estéril foi sugerida (MCDONALD *et al*, 2010). Neste contexto, e considerando os dados desta dissertação, quimiocinas ligantes de CXCR2 e peptídeos formilados de origem mitocondrial parecem mediar o recrutamento de neutrófilos para a lesão hepática estéril. Desse modo, realizamos um bloqueio combinado do receptor CXCR2 e do receptor FPR1 (com DF2156A e BOC-1, respectivamente) em camundongos submetidos à sobredose de APAP. Observamos que estes animais apresentaram lesão hepática e recrutamento de neutrófilos significativamente menores do que comparados aos seus controles não tratados.

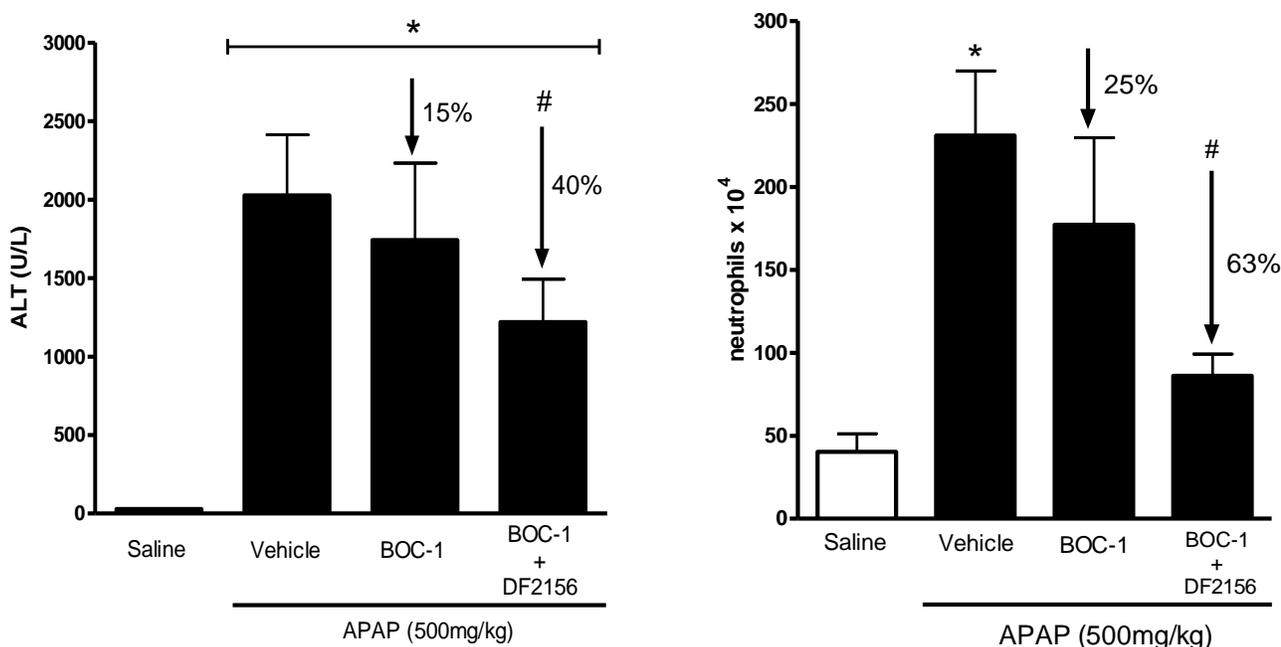


Gráfico 13 – O bloqueio combinado de CXCR2 e FPR1 protege contra a lesão hepática e o influxo de neutrófilos induzidos por APAP.

Foram utilizados os ensaios de ALT sérica (esquerda) e MPO (direita). DF2156 (30mg/kg) e BOC-1 (2mg/kg) foram administrados 1 hora antes de APAP, via oral e i.v., respectivamente. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina e os grupos APAP. # indica diferença entre grupo veículo e grupo BOC+ DF2156.

4.16 A TOXICIDADE POR APAP PODE SER REPRODUZIDA *IN VITRO* NA LINHAGEM CELULAR HEPG2 DE MODO BASTANTE SIMILAR AO OBSERVADO *IN VIVO*

O cultivo da linhagem celular hepática HepG2 pode ser utilizado, dentre outras finalidades, para avaliar a citotoxicidade de substâncias e medicamentos em geral. Não obstante, APAP em altas concentrações é tóxico para estas células, e reproduz fielmente o perfil já observado em nossos experimentos *in vivo*. APAP inviabiliza células HepG2 de forma dose- e tempo-dependente, onde a dose de 5mM reduziu em aproximadamente 50% a viabilidade celular, e promoveu a redução de modo mais intenso na 24^a hora após incubação com APAP.

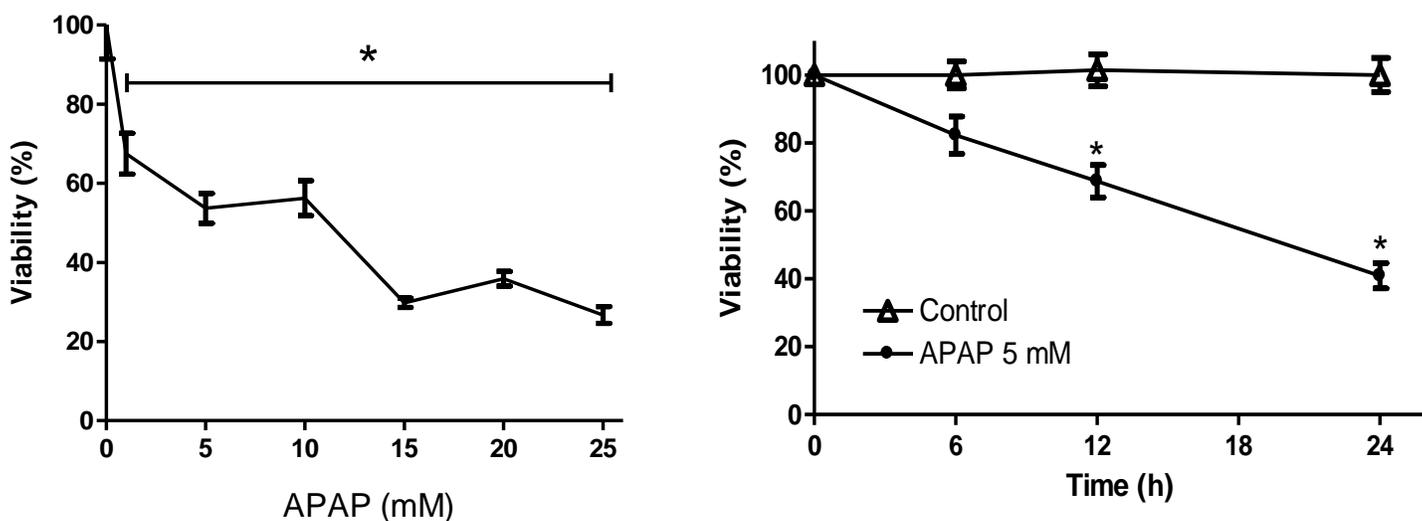


Gráfico 14 – Altas concentrações de APAP inviabilizam células HepG2.

As células HepG2 foram cultivadas e plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 céls/poço). APAP foi aplicado no tempo zero, na concentração final de 5mM ou a indicada na curva dose-resposta. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT, iniciado na 20^a após APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (ou zero hora) e os grupos APAP.

4.17 NEUTRÓFILOS REDUZEM A VIABILIDADE DE HEPG2 EM CO-CULTURA, A QUAL PODE SER REVERTIDA PELO TRATAMENTO COM BLOQUEADORES DE CXCR2 E FPR1

Com o objetivo de determinar se neutrófilos são capazes de causar dano às células do fígado, realizamos experimentos de co-cultura da linhagem hepática HepG2 com neutrófilos humanos purificados. Pudemos observar que neutrófilos reduzem a viabilidade de células HepG2 quando cultivados nas proporções de 10:1 e 1:1 células HepG2 em relação à neutrófilos. Em ambas as proporções, houve uma redução significativa da viabilidade celular. De maneira interessante, os fármacos bloqueadores de FPR1 e CXCR2 (BOC-1 e DF2156) inibiram a toxicidade mediada por neutrófilos significativamente, chegando até mesmo a superar a viabilidade do grupo controle (proporção 10:1). Além disso, observamos que o tratamento combinado com BOC-1 e DF2156 possui atividade protetora intrínseca sobre células HepG2, o que nos indica um mecanismo não-imunológico de proteção por esses fármacos.

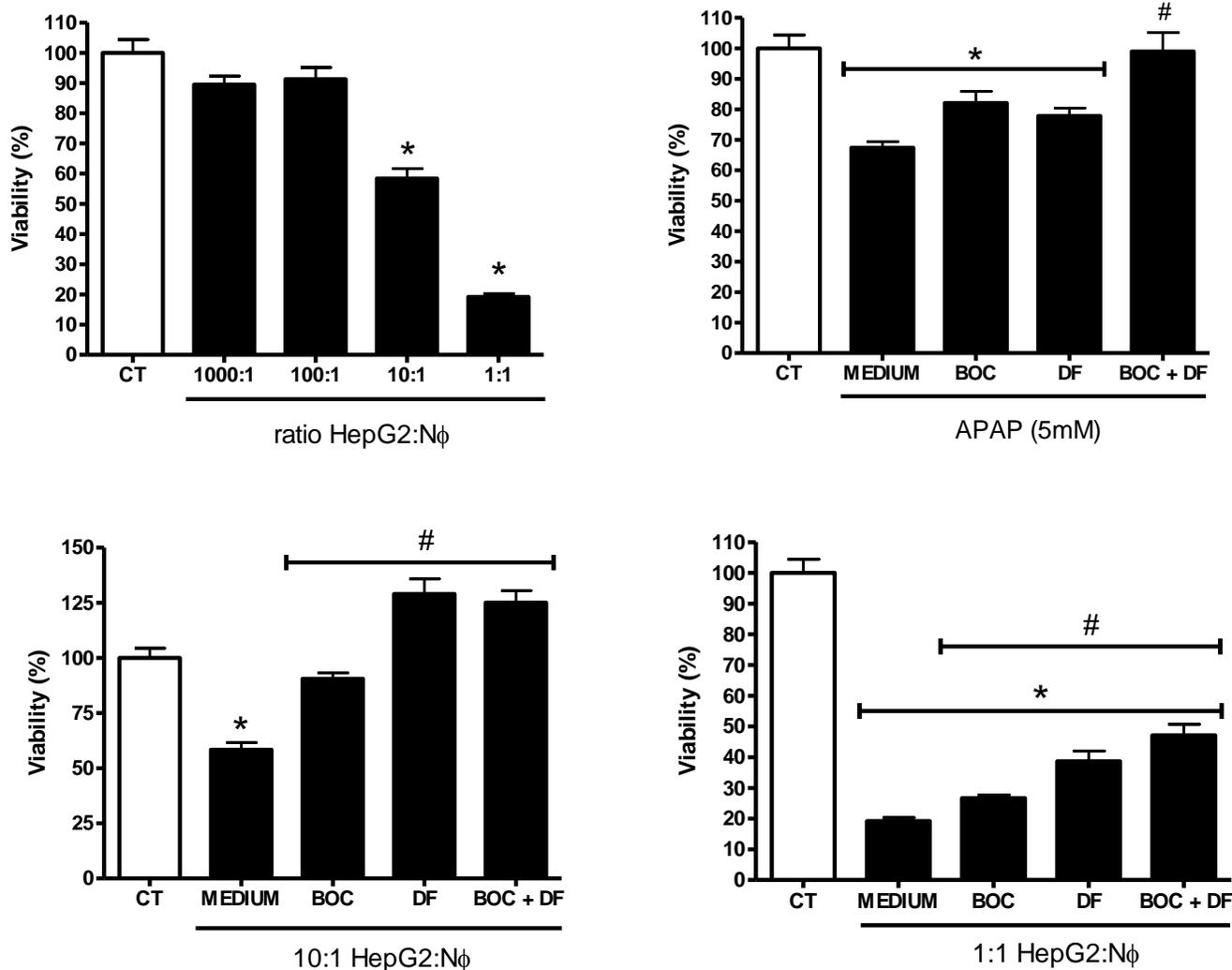


Gráfico 15 – Neutrófilos causam toxicidade direta às células HepG2, a qual é revertida por bloqueadores de FPR1 e CXCR2.

As células HepG2 foram cultivadas e plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 céls/poço), e em seguida incubadas com neutrófilos humanos purificados de sangue periférico, nas proporções indicadas (1000:1 a 1:1 HepG2:neutrófilos). APAP foi aplicado no tempo zero, na concentração final de 5mM, simultaneamente à aplicação dos tratamentos BOC-1 (100 μ M), DF2156 (10 μ M) e à incubação com neutrófilos. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT, iniciado na 20^a após APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (CT) e os grupos experimentais. # indica diferença significativa entre o grupo sem tratamento (MEDIUM) e os grupos tratados (BOC, DF, BOC+DF).

4.18 A ADIÇÃO DE NEUTRÓFILOS POTENCIALIZA A MORTE CELULAR INDUZIDA POR APAP, QUE É TOTALMENTE REVERTIDO COM O TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE CXCR2 E FPR1

Nosso conjunto de dados indicou que neutrófilos aparentemente participam da lesão hepática por APAP tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Para tentar separar com maior clareza o efeito da combinação BOC-1 e DF2156 sobre HepG2 e neutrófilos, realizamos um experimento onde nossos dois agentes tóxicos (APAP e neutrófilos) foram aplicados individualmente ou juntos. Quando HepG2 recebe APAP ou neutrófilos já ocorre uma redução de viabilidade significativa, mas essa redução é ainda maior se ambos agentes tóxicos são aplicados e incubados em conjunto. De modo interessante, o aumento de viabilidade causado por BOC-1 + DF2156 é significativo quando aplicado em HepG2 tratadas com APAP na ausência de neutrófilos, lembrando seu efeito protetor direto já observado no Gráfico 15. Além disso, este aumento de viabilidade é ainda maior se HepG2 recebe ambos APAP e neutrófilos, o que nos mostra que esses dois compostos parecem agir nos dois tipos celulares, revelando um mecanismo de ação duplo.

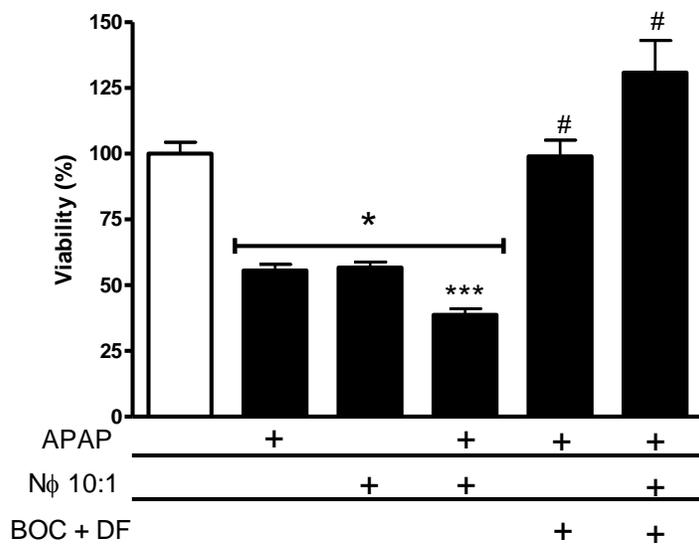


Gráfico 16 – Neutrófilos potencializam a citotoxicidade promovida pelo APAP, que é revertida pelos bloqueadores de FPR1 e CXCR2

As células HepG2 foram cultivadas e plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^5 céls/poço), e em seguida incubadas com neutrófilos humanos purificados de sangue periférico, na proporção 10:1 HepG2:neutrófilos. APAP foi aplicado no tempo zero, na concentração final de 5mM, simultaneamente à aplicação dos tratamentos BOC-1 (100 μ M), DF2156 (10 μ M) e à incubação com neutrófilos. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT, iniciado na 20^a após APAP. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (branco) e os grupos experimentais. # indica diferença significativa entre os grupos APAP e APAP+No e seus respectivos grupos tratados com BOC+DF.

5 DISCUSSÃO

A lesão hepática induzida por sobredose de APAP está relacionada a uma grave e disseminada necrose hepatocelular, evento onde há um grande extravasamento de conteúdo mitocondrial e produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Em resposta a isso, ocorre o recrutamento de neutrófilos para o fígado, que é capaz de aumentar o dano hepático já presente e é um fenômeno dependente dos receptores CXCR2 e FPR1. O bloqueio desses receptores reduz o recrutamento de neutrófilos e sua capacidade de danificar células hepáticas, além de atuar diretamente aumentando viabilidade das células hepáticas em resposta a APAP.

O modelo de falência hepática aguda por sobredose de APAP já existe desde a década de 1960 (BOYD & BEREZKY, 1966), sendo atualmente um modelo bastante estabelecido, que reflete o perfil observado na clínica (BERNAL *et al*, 2010) e é bastante utilizado para o estudo da necrose tecidual e mecanismos da inflamação estéril (ROCK *et al*, 2010; CHEN & NUÑEZ, 2010). Vários mecanismos de metabolismo e toxicidade por APAP foram descritos utilizando esse modelo, inclusive os meios de morte celular induzidos por esta sobredose química (ANTOINE *et al*, 2010). Interessantemente, um ponto que se encontra sob debate acirrado na literatura há vários anos é a participação do sistema imune na geração e agravamento do dano hepático por sobredose de APAP. O maior protagonista desta disputa é o neutrófilo, que é reconhecido por ser recrutado ao fígado necrótico, mas ainda não possui uma função estabelecida neste sítio inflamatório. O grupo liderado por Neil Kaplowitz relata que células NK, NKT (LIU *et al*, 2004) e neutrófilos (LIU *et al*, 2006; ISHIDA *et al*, 2006) participam da lesão estéril induzida por APAP. Em contrapartida, o grupo do pesquisador Hartmut Jaeschke, que possui bastante tradição no estudo da toxicidade por APAP, publicou uma série de trabalhos descartando o papel de neutrófilos e do complexo multiproteico conhecido como inflamassoma nesta doença (LAWSON *et al*, 2000; JAESCHKE & HASEGAWA, 2006; WILLIAMS *et al*, 2010; WILLIAMS *et al*, 2011).

Para estudarmos a participação de neutrófilos na lesão hepática estéril induzida por APAP padronizamos uma dose capaz de causar uma lesão hepática apreciável (500mg/kg) e avaliamos a cinética desta lesão hepática ao longo do tempo, percebendo que o pico da lesão foi a 24^a hora (GRÁF.1). A necrose hepática por APAP possui algumas características específicas, como a localização centrolobular da necrose. O mecanismo desta localização específica ainda

não foi esclarecido completamente, mas acredita-se que tenha relação com o repertório enzimático dos hepatócitos desta área (LEE, 2003). Como evidenciado na Figura 2, a avaliação dos cortes histológicos confirmou a correta indução de lesão hepática por APAP, com a localização e as alterações morfológicas esperadas (vacuolização, cariólise e necrose oncótica). Como mencionado anteriormente, o uso de N-acetilcisteína (NAC) já é comum em intoxicações hepáticas de diversas naturezas, inclusive por APAP. Ao pré-tratarmos nossos animais com esse antídoto, observamos uma redução intensa dos níveis de ALT (GRÁF.2), um dado compatível com o que já é observado na clínica, e que nos indicou que estávamos trabalhando com um grau de intoxicação e lesão hepática relativamente moderado, ainda permissível a intervenções terapêuticas. Vale ressaltar que o objetivo deste trabalho não é tentar sugerir uma terapêutica para a substituição de NAC, mas sim oferecer uma opção terapêutica para suprir a ineficácia de NAC após o período inicial da intoxicação por APAP.

De modo interessante, ao avaliarmos o influxo de neutrófilos por MPO nas diferentes doses e tempos após APAP, observamos a presença de neutrófilos no fígado, já relatada por outros pesquisadores, mas percebemos que a curva de influxo de neutrófilos tinha um perfil bastante similar à curva de ALT (lesão hepática), tanto em termos de dose de APAP quanto de tempo (GRÁF.3). E, se os animais fossem pré-tratados com o antídoto NAC, capaz de reverter completamente a lesão hepática, tal recrutamento de neutrófilos não ocorria, mostrando que o recrutamento depende da ocorrência de lesão e não de um efeito colateral de APAP. Adotando uma metodologia mais direta, nos certificamos da presença de neutrófilos no parênquima hepático através da técnica de microscopia intravital, onde foi possível visualizar diretamente um grande número de neutrófilos no tecido (FIG.3). Curiosamente, os neutrófilos pareciam se localizar no interior de zonas escuras (sem marcação de células viáveis), onde apresentaram movimentação ativa e constante (dados não mostrados), o que nos indicou que existem moléculas capazes de recrutar e provavelmente ativar neutrófilos neste meio. Em conjunto, os dados foram fortes indicativos de que existe uma correlação entre os processos de necrose hepática e de recrutamento de neutrófilos para o fígado.

Em busca de um modo para excluirmos a atividade de neutrófilos durante a indução de lesão por APAP, realizamos dois experimentos, empregando o potente anti-inflamatório esteroide dexametasona ou a neutropenia induzida por anticorpo monoclonal. Examinando o Gráfico 4 podemos ver que o tratamento com dexametasona reduz parcialmente a lesão por

APAP, mas não há alteração no influxo de neutrófilos. O efeito protetor observado provavelmente deriva de efeitos metabólicos diretos da dexametasona em hepatócitos, além de qualquer outro efeito imunológico deste fármaco não diretamente relacionado a neutrófilos.

Em contraste com a inespecificidade da dexametasona, adotamos uma metodologia já realizada em trabalhos relacionados à nossa área (LIU *et al*, 2006; ISHIDA *et al*, 2006), que foi a depleção de neutrófilos por aplicação de anticorpo monoclonal (anti-GR1, clone RB6-8C5). De acordo com o Gráfico 5, obtivemos uma depleção de aproximadamente 90% de neutrófilos circulantes, e uma redução marcante de 75% dos níveis de ALT, o que nos leva a concluir que neutrófilos estão de fato contribuindo para o dano hepático. Esses dados estão de acordo com os trabalhos publicados anteriormente na literatura, onde inclusive foi feito o uso de anticorpo isotipo em dose equivalente e nenhum efeito significativo foi observado. Apesar de que esta técnica é largamente aceita como modo de eliminar a interferência de neutrófilos em algum fenômeno a ser estudado, alguns trabalhos propuseram mecanismos alternativos que desconsiderariam tal suposição (JAESCHKE, 2006; JAESCHKE & LIU, 2007). Estes autores afirmaram que o uso de anticorpo indutor de neutropenia, como o anti-GR1, levaria a uma opsonização destas células, seguida de sua remoção nos sinusóides hepáticos por fagocitose pelas células de Kupffer. Esta fagocitose causaria uma produção momentânea de mediadores inflamatórios pelas células de Kupffer, mediadores tais que induzem genes protetores como heme oxigenase 1 (HO-1) e metalotioneína 1 e 2 (MT-1, MT-2) em hepatócitos, fazendo com que estas células sejam menos susceptíveis à toxicidade por APAP. Além disso, um trabalho recentemente publicado por Shi e colaboradores (2011) relatou que o anticorpo anti-GR1 (RB6-8C5) é também capaz de depletar monócitos inflamatórios circulantes Ly-6C⁺. Esta população celular pode ser rapidamente recrutada para sítios inflamatórios, expressa NADPH oxidase e produz TNF α . Considerando sua possível importância na inflamação do fígado necrótico e sabendo que populações monocíticas circulantes são recrutadas para o fígado após APAP (HOLT *et al*, 2008), os dados de depleção de neutrófilos devem ser interpretados com um pouco de cautela. Não obstante, utilizamos outros modos para reduzir a atividade de neutrófilos e confirmar sua participação nesta doença, como o bloqueio da ação de quimiocinas.

A inflamação hepática decorrente da sobredose de APAP é bastante descrita na literatura. Levando em conta essa informação e os dados coletados nesta dissertação, é de grande importância que os mecanismos pelo qual esta inflamação decorre sejam definidos, expondo

alvos para uma terapêutica alternativa e mais eficaz. Assim, decidimos quantificar alguns mediadores inflamatórios estabelecidos, como as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF α e as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, cujo papel no recrutamento de neutrófilos é bastante descrito (GRÁF.6) (ZLOTNIK *et al*, 2006). Para nossa surpresa, os aumentos mais claramente observáveis ocorreram nos níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2, seguido do aumento um pouco menos expressivo de IL-1 β e TNF α , citocinas pivotais no desenvolvimento de praticamente qualquer resposta imune, responsáveis por fenômenos como ativação endotelial, influxo leucocitário e expressão de genes que coordenam a resposta inflamatória (ex.: *COX-2*, *iNOS*). De maneira surpreendente, todos os picos dos mediadores inflamatórios dosados coincidiram com a 24^a hora após APAP, nos indicando que realmente estamos trabalhando no ápice da resposta inflamatória em nosso modelo. As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são homólogos murinos da CXCL8 humana, mas dividem as mesmas funções em seus respectivos organismos quando se ligam ao receptor CXCR2 presente em neutrófilos. Estas são: desgranulação, influxo de cálcio, explosão respiratória (produção maciça de espécies reativas de oxigênio via NADPH oxidase) e quimiotaxia (RIOS-SANTOS *et al*, 2007; MANTOVANI *et al*, 2011). Assim, o bloqueio da ação destes mediadores pode ser um modo bastante eficaz de reduzir a chegada de neutrófilos na lesão hepática por APAP, mas também pode reduzir a ativação dos mecanismos danosos por estas células no tecido.

Seguindo esta linha de raciocínio, realizamos um experimento onde os camundongos foram tratados com o antagonista de CXCR2, composto DF2156 (GRÁF.7). Observamos uma redução moderada da lesão hepática, mas uma redução de 50% do influxo de neutrófilos, ressaltando o papel do receptor CXCR2 como responsável pelo recrutamento de neutrófilos neste modelo e um papel funcional de seus ligantes CXCL1 e CXCL2, cuja produção no parênquima hepático nestas condições já foi demonstrada nessa dissertação (GRÁF.6). Buscando definir com ainda mais clareza que o eixo CXCL1/CXCL2 – CXCR2 está envolvido na patogênese da lesão hepática por APAP, adotamos um método alternativo de validação do resultado, que foi o bloqueio do mediador, no caso CXCL1, por uso de anticorpo anti-CXCL1. De maneira notável, houve uma redução significativa da lesão hepática e de 35% do influxo de neutrófilos. Isso deixou claro que CXCL1 e CXCL2, ativando seu receptor CXCR2 participam do recrutamento de neutrófilos neste modelo. Uma observação interessante foi que a administração de anticorpo provavelmente causou um efeito Fc-dependente (evidenciada pelo grupo isotipo controle IgG1)

que inibiu a lesão por APAP, mas ainda sim o grupo anti-KC encontra-se mais reduzido que seu controle IgG1 e significativamente menor que o grupo APAP não-tratado. Vale lembrar que estamos tratando de um tipo de lesão complexa, em que inúmeros mediadores, seus respectivos receptores, e vários tipos celulares estão envolvidos, de modo que a participação de apenas um tipo de mediador (como quimiocinas) é bastante improvável. Ainda assim, baseado em nossas várias abordagens experimentais do sistema de quimiocinas, podemos afirmar que CXCL1, CXCL2 e seu receptor CXCR2 estão envolvidos na lesão hepática e recrutamento de neutrófilos induzido por APAP.

A abordagem do sistema de quimiocinas foi seguida pela avaliação do papel de DAMPs na necrose hepática induzida por APAP. O papel potencial de DAMPs foi evidenciado em uma série de trabalhos, como mencionado anteriormente (MCDONALD *et al*, 2010; CHEN & NUÑEZ, 2010), de modo que avaliamos a participação de ATP e de peptídeos formilados em nosso modelo. A eliminação de ATP extracelular pela enzima apirase reduziu significativamente a lesão mas não alterou o influxo de neutrófilos, o que indica um efeito direto de ATP ou seus produtos de degradação (ADP e AMP) sobre hepatócitos, células que sabidamente expressam receptores purinérgicos em sua superfície (BELDI *et al*, 2008). Houve uma contradição entre nossos resultados e os apresentados por McDonald e colaboradores (2010), onde a eliminação do ATP em modelo de lesão estéril focal reduziu o recrutamento de neutrófilos para o fígado. Em contrapartida, em nosso modelo estamos tratando de uma lesão necrótica extensa e disseminada pelo órgão (FIG.2) onde talvez o papel de outros DAMPs, como os de origem mitocondrial sejam mais proeminentes.

A quantificação de DAMPs mitocondriais é bastante nova e até o momento pouco explorada. Atualmente é possível quantificar DNA mitocondrial em soro (ZHANG *et al*, 2010), mas ainda não existe método para dosar peptídeos mitocondriais livres. Com isso, objetivando determinar indiretamente se peptídeos mitocondriais são liberados para o meio extracelular, utilizamos o método de dosagem de DNA mitocondrial no soro dos nossos camundongos tratados com APAP. De maneira interessante, houve um aumento da concentração de DNA circulante de até 2000 vezes em relação aos valores basais (GRÁF.10). Isto foi evidencia clara que peptídeos e DNA mitocondrial estão sendo liberados do interior de hepatócitos, já que os mesmos são células bastante ricas em mitocôndrias. Este dado nos levou a pesquisar o efeito de peptídeos formilados na lesão hepática, mas abriu uma grande questão que está sendo abordada

separadamente pelo nosso grupo, que seria o efeito de tal quantidade de DNA mitocondrial livre no organismo. Sabe-se que ele é um agonista do receptor TLR9, possuindo então grande potencial pró-inflamatório tanto localmente como sistemicamente. Em 2009, Imaeda e colaboradores reportaram que o receptor TLR9 é importante durante a necrose hepatocelular por APAP, pois é ativado por DNA apoptótico de origem genômica, funcionando como um passo ativador do inflamassoma NLRP3 e da inflamação estéril. Curiosamente, nenhum trabalho até o momento abordou o papel de DNA de origem mitocondrial ou suas possíveis implicações na inflamação sistêmica nas áreas de pesquisa em lesão necrótica e falência hepática aguda, deixando uma lacuna bastante importante a ser preenchida.

Sabendo que peptídeos formilados mitocondriais estão sendo liberados no meio, realizamos o bloqueio de seu receptor putativo, FPR1, com a droga BOC-1 (GRÁF.11). O receptor FPR1 é extensivamente conhecido por sua capacidade quimiotática em neutrófilos, mas sua ativação também estimula a geração de espécies reativas de oxigênio e desgranulação (YE *et al*, 2009). Pudemos notar que este tratamento reduz a lesão hepática e o influxo de neutrófilos para o fígado similarmente ao bloqueador de CXCR2 (DF2156), apesar de que o fez com uma intensidade menor que este bloqueador. Em contraste, ao avaliarmos a produção de quimiocinas e citocinas no fígado de camundongos que receberam APAP (GRÁF.12), o tratamento com BOC-1 foi mais eficaz em inibir a produção destes mediadores do que DF2156, indicando que a ativação de FPR1 leva a eventos de ativação celular adicionais à geração de espécies reativas e desgranulação, como a produção de diversos mediadores inflamatórios. Entretanto, estes fármacos podem agir de forma complementar um ao outro para reduzir a gravidade da lesão e a inflamação hepática, afinal ambos bloqueadores inibem os mesmos fenômenos em neutrófilos (quimiotaxia, geração de espécies reativas de oxigênio e desgranulação), fazendo com que seu uso em conjunto seja promissor.

Apesar de sua capacidade imunoestimulatória, a lógica inicial por trás da participação de FPR1 e peptídeos formilados vêm da cascata descrita por McDonald e colaboradores (FIG.1), sendo este o passo necessário para que os neutrófilos adentrassem as zonas necróticas e avasculares, onde o gradiente de quimiocinas não alcança. Seguindo este raciocínio, utilizamos os antagonistas de CXCR2 e FPR1 em conjunto, bloqueando as duas etapas propostas na cascata de recrutamento para a lesão necrótica estéril (GRÁF.13). De maneira marcante, nosso tratamento foi capaz de inibir significativamente a lesão hepática e o influxo de neutrófilos

causado pela sobredose de APAP, oferecendo um forte indício de que estas duas vias estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos *in vivo*, durante a necrose hepática aguda induzida por sobredose de APAP. Provamos também que tal cascata é válida para outros graus de necrose hepática além da focal, e útil para o tratamento de um problema de saúde bastante grave, a falência hepática aguda. Contudo, é difícil dissociar a redução dos fenômenos de recrutamento e de ativação do neutrófilo (para a geração de espécies reativas ou desgranulação, por exemplo), afinal a falta de ativação do neutrófilo pelo bloqueio de FPR1 e CXCR2 poderia reduzir a meia-vida do neutrófilo no tecido ou mesmo deixá-lo susceptível à morte por apoptose.

Experimentos *in vivo* são muito úteis na ciência básica, mas definir mecanismos em um meio tão complexo é difícil. Neste contexto, a cultura celular permite isolar os componentes de interesse em uma composição conhecida, e por isso a utilizamos para estudar o efeito dos nossos fármacos diretamente em células imortalizadas de origem hepática (HepG2) ou neutrófilos humanos purificados. No Gráfico 14 é possível observar uma representação *in vitro* do nosso modelo de falência hepática em camundongos, no qual a inviabilização celular por APAP inclusive chega ao nível mais alto observado na 24^a, portanto sendo aparentemente representativo do que já observamos no modelo *in vivo*.

Nos Gráficos 15 e 16, testamos separadamente e em conjunto os agentes que especulamos serem os responsáveis pela toxicidade hepática observada durante a falência hepática aguda, paracetamol e neutrófilos, assim como o efeito dos bloqueadores BOC-1 e DF2156 quando aplicados apenas em HepG2 ou em co-cultura com neutrófilos. Como mencionado no início do tópico Discussão, há grande debate sobre o que o neutrófilo estaria fazendo nos sítios de inflamação estéril no fígado, e para a nossa surpresa, ao incubarmos HepG2 com neutrófilos observamos uma queda de viabilidade dependente do número de neutrófilos em cultura, mostrando que estas células têm a capacidade de serem tóxicas à células hepáticas (GRÁF.15). Tais experimentos de co-cultura já foram demonstrados em vários trabalhos, onde inclusive se fez uso de agentes estimulantes para induzir o dano mediado por neutrófilos, no caso f-MLP, IL-8 e PMA (MAVIER *et al*, 1988; HARBRECHT *et al*, 1993). Além disso, vários dados indicaram a necessidade de contato direto entre as células para que ocorra toxicidade, hipótese que poderemos confirmar repetindo o experimento com insertos *transwell* para separação das células em co-cultura. De modo interessante, o tratamento com BOC-1, DF2156

ou ambas as drogas simultaneamente, foi capaz de aumentar a viabilidade de células HepG2 expostas à neutrófilos, confirmando *in vitro* nossas observações no modelo animal.

Os compostos BOC-1 e DF2156 sozinhos não tiveram efeito direto na viabilidade de HepG2 controle (dados não mostrados) ou tratada com APAP (GRÁF.15), mas quando os dois fármacos são aplicados juntos eles aumentam a viabilidade de HepG2 tratada com APAP. Corroborando este dado, o receptor FPR1 é expresso não apenas por neutrófilos, mas também por células de Kupffer e hepatócitos (YE *et al*, 2009), enquanto que CXCR2 é expresso por neutrófilos e hepatócitos (SAHIN *et al*, 2010). Isto nos indicou que o efeito benéfico de BOC-1 + DF não se restringe a neutrófilos, agindo também diretamente sobre as células hepáticas HepG2 para promover sua proteção.

Ao incubarmos as células HepG2 com APAP e neutrófilos ao mesmo tempo, pudemos observar que a viabilidade foi ainda mais reduzida (GRÁF.16), apoiando nossas suposições sobre o dano adicional mediado por neutrófilos ao fígado sob sobredose de APAP. Porém, um resultado um tanto quanto espantoso foi o enorme aumento de viabilidade das células HepG2 que receberam APAP e neutrófilos, mas foram tratadas com a combinação BOC-1 + DF. A diferença de viabilidade entre este grupo e seu controle (HepG2 + APAP + Neutrófilos) é de aproximadamente 100%. Este aumento espantoso pode ser um artefato devido à contribuição dos neutrófilos para o metabolismo de MTT, mas de qualquer modo a diferença entre os grupos ressalta o potencial protetor do tratamento com BOC-1 + DF, que parece agir tanto em células hepáticas quanto nos neutrófilos em si, e reflete os resultados positivos observados em camundongos.

Concluindo a discussão dos dados, inúmeras questões foram deixadas em aberto, das quais as respostas ainda são de grande valia: como o papel inflamatório do DNA mitocondrial circulante, o mecanismo efetor específico do neutrófilo que desencadeia o dano mediado por esta célula ao tecido, ou mesmo a participação de outros tipos celulares que não o neutrófilo, como as células de Kupffer e células de Ito na patogênese da necrose por APAP. Por fim, deixamos então uma potencial estratégia terapêutica para doenças que envolvam a necrose hepática, como a falência hepática aguda, e para tantas outras enfermidades que compartilham do componente da inflamação estéril em sua patogênese.

6 CONCLUSÕES

Considerando os dados obtidos e discutidos nesta dissertação, podemos concluir que:

- Neutrófilos participam do processo de necrose hepática induzida por APAP, pois eles são recrutados para o fígado necrótico e, ao depletarmos este tipo leucocitário, reduzimos significativamente a lesão hepática causada por APAP. Além disso, o seu recrutamento para o fígado necrótico é prejudicial, pois neutrófilos diminuem a viabilidade de células HepG2 quando mantidos em co-cultura com as mesmas.
- Há um intenso processo inflamatório ocorrendo no fígado necrótico, havendo a produção das quimiocinas e citocinas inflamatórias CXCL1, CXCL2, IL1 β , IL-6 e TNF α , juntamente com a liberação de DAMPs mitocondriais para o meio extracelular.
- O receptor de quimiocinas CXCR2 e o receptor de peptídeos mitocondriais FPR1 representam grandes alvos terapêuticos para a falência hepática aguda, pois seu bloqueio é capaz de reduzir a gravidade da lesão hepática por sobredose de APAP, inibindo o recrutamento de neutrófilos para o fígado necrótico, a toxicidade *in vitro* mediada por estas células, a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias e por ter efeito protetor direto sobre células hepáticas.

7 BIBLIOGRAFIA

ANTOINE DJ, WILLIAMS DP, KIPAR A, LAVERTY H, PARK BK. Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. *Mol Med*. 2010 Nov-Dec;16(11-12):479-90. Epub 2010 Aug 27

BERNAL W, AUZINGER G, DHAWAN A, WENDON J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):190-201

BHADURI BR, MIELI-VERGANI G. Fulminant hepatic failure: pediatric aspects. *Semin Liver Dis*. 1996 Nov;16(4):349-55.

BOYD EM, BEREZKY GM. Liver necrosis from paracetamol. *Br J Pharmacol Chemother*. 1966 Mar;26(3):606-14.

BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):657-70.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.

BRINKMANN V, ZYCHLINSKY A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Aug;5(8):577-82.

CELSUS AC. Circa 30 A.D. *De Medicina*

CHEN GY, NUÑEZ G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826-37. Epub 2010 Nov 19.

DAI Y, CEDERBAUM AI. Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502 E1 -Transfected HepG2 Cells. *J Pharmacol Exp Therap*. 1995;273(3):1497-1505.

GREEN DR. The end and after: how dying cells impact the living organism. *Immunity*. 2011 Oct 28;35(4):441-4.

HARBRECHT BG, BILLIAR TR, CURRAN RD, STADLER J, SIMMONS RL. Hepatocyte injury by activated neutrophils in vitro is mediated by proteases. *Ann Surg*. 1993 Aug;218(2):120-8.

HINSON JA, ROBERTS DW, JAMES LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):369-405.

HOLT MP, CHENG L, JU C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J Leukoc Biol.* 2008 Dec;84(6):1410-21. Epub 2008 Aug 19.

HU B, COLLETTI LM. CXC receptor-2 knockout genotype increases X-linked inhibitor of apoptosis protein and protects mice from acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 2010 Aug;52(2):691-702.

ICHAÏ P, DUCLOS-VALLÉE JC, GUETTIER C, HAMIDA SB, ANTONINI T, DELVART V, SALIBA F, AZOULAY D, CASTAING D, SAMUEL D. Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis. *Liver Transpl.* 2007 Jul;13(7):996-1003.

IMAEDA AB, WATANABE A, SOHAIL MA, MAHMOOD S, MOHAMADNEJAD M, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA, MEHAL WZ. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest.* 2009 Feb;119(2):305-14. doi: 10.1172/JCI35958. Epub 2009 Jan 26.

ISHIDA Y, KONDO T, KIMURA A, TSUNEYAMA K, TAKAYASU T, MUKAIDA N. Opposite roles of neutrophils and macrophages in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *Eur J Immunol.* 2006 Apr;36(4):1028-38.

JAESCHKE H. How relevant are neutrophils for acetaminophen hepatotoxicity? *Hepatology.* 2006 Jun;43(6):1191-4.

JAESCHKE H, HASEGAWA T.. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int.* 2006 Oct;26(8):912-9.

JAESCHKE H, LIU J. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity: another perspective. *Hepatology.* 2007 Jun;45(6):1588-9; author reply 1589.

JAESCHKE H, WILLIAMS CD, RAMACHANDRAN A, BAJT ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int.* 2012 Jan;32(1):8-20. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02501.x. Epub 2011 Mar 14.

JAMES LP, MAYEUX PR, HINSON JA.. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2003 Dec;31(12):1499-506.

KHAN SA, SHAH N, WILLIAMS R, JALAN R. Acute liver failure: a review. *Clin Liver Dis.* 2006 May;10(2):239-58, vii-viii.

KUMAR M, SATAPATHY S, MONGA R, DAS K, HISSAR S, PANDE C, SHARMA BC, SARIN SK. A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology.* 2007 Jan;45(1):97-101.

LAWSON JA, FARHOOD A, HOPPER RD, BAJT ML, JAESCHKE H. The hepatic inflammatory response after acetaminophen overdose: role of neutrophils. *Toxicol Sci.* 2000 Apr;54(2):509-16.

LEE WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2003 Jul 31;349(5):474-85.

LIU ZX, GOVINDARAJAN S, KAPLOWITZ N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 2004 Dec;127(6):1760-74.

LIU ZX, HAN D, GUNAWAN B, KAPLOWITZ N. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 2006 Jun;43(6):1220-30.

MANTOVANI A, CASSATELLA MA, COSTANTINI C, JAILLON S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 25;11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024.

MAVIER P, PREAUX AM, GUIGUI B, LESCS MC, ZAFRANI ES, DHUMEAUX D. In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology.* 1988 Mar-Apr;8(2):254-8.

MCDONALD B, PITTMAN K, MENEZES GB, HIROTA SA, SLABA I, WATERHOUSE CC, BECK PL, MURUVE DA, KUBES P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010 Oct 15;330(6002):362-6.

MENEZES GB, LEE WY, ZHOU H, WATERHOUSE CC, CARA DC, KUBES P. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7557-68. Epub 2009 Nov 16.

PESTANA CR, PHELIPPIN DP, POLIZELLO AC, DORTA DJ, UYEMURA SA, SANTOS AC, DORO FG, RODRIGUES FP, TFOUNI E, CURTI C. Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. *Nitric Oxide.* 2009 Feb;20(1):24-30. Epub 2008 Oct 10.

RIOS-SANTOS F, ALVES-FILHO JC, SOUTO FO, SPILLER F, FREITAS A, LOTUFO CM, SOARES MB, DOS SANTOS RR, TEIXEIRA MM, CUNHA FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Mar 1;175(5):490-7. Epub 2006 Nov 30.

ROCK KL, LATZ E, ONTIVEROS F, KONO H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010 Mar;28:321-42.

SAHIN H, TRAUTWEIN C, WASMUTH HE. Functional role of chemokines in liver disease models. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec;7(12):682-90. Epub 2010 Oct 26.

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

SHI C, HOHL TM, LEINER I, EQUINDA MJ, FAN X, PAMER EG. Ly6G⁺ neutrophils are dispensable for defense against systemic *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5293-8. Epub 2011 Oct 5.

THOMSON AW, KNOLLE PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. 2010 Nov;10(11):753-66.

TREY C, DAVIDSON CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis*. 1970;3:282-98.

WIGG AJ, GUNSON BK, MUTIMER DJ. Outcomes following liver transplantation for seronegative acute liver failure: experience during a 12-year period with more than 100 patients. *Liver Transpl*. 2005 Jan;11(1):27-34.

WILLIAMS CD, FARHOOD A, JAESCHKE H. Role of caspase-1 and interleukin-1beta in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Sep 15;247(3):169-78. Epub 2010 Jul 15.

WILLIAMS CD, ANTOINE DJ, SHAW PJ, BENSON C, FARHOOD A, WILLIAMS DP, KANNEGANTI TD, PARK BK, JAESCHKE H. Role of the Nalp3 inflammasome in acetaminophen-induced sterile inflammation and liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 May 1;252(3):289-97. Epub 2011 Mar 21.

YE RD, BOULAY F, WANG JM, DAHLGREN C, GERARD C, PARMENTIER M, SERHAN CN, MURPHY PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*. 2009 Jun;61(2):119-61. Epub 2009 Jun 4.

ZHANG QX, MELNIKOV Z, FEIERMAN DE. Characterization of the Acetaminophen-Induced Degradation of Cytochrome P450-3A4 and the Proteolytic Pathway. *Bas Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 94:191–200.

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