

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. O FÍGADO.....	17
1.2. A FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA.....	18
1.3. A HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR APAP COMO MODELO DE FHA	20
1.4. SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA	24
1.5. CITOXICIDADE INDUZIDA POR APAP EM CÉLULAS HEPG2.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. METODOLOGIA	32
3.1. CULTURA CELULAR.....	32
3.2. ENSAIO DE MTT PARA VIABILIDADE CELULAR	32
3.3. INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS HEPG2 E COLETA DE AMOSTRAS.....	33
3.4. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	33
3.5. COLORAÇÃO COM PI E CITOMETRIA DE FLUXO	34
3.6. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	37
3.7. DOSAGEM DE ATP	37
3.8. TRATAMENTOS COM PURINAS	37
3.9. BAPTA-AM.....	38
3.10. BLOQUEADORES PURINÉRGICOS	38
3.11. APIRASE	39
3.12. ANIMAIS.....	39
3.13. INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA E COLETA DE AMOSTRAS	40
3.14. QUANTIFICAÇÃO DE ALANINA AMINO TRANSFERASE	40
3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4. RESULTADOS.....	42

4.1. INCUBAÇÃO COM APAP POR 24 HORAS PROMOVE PERDA DE ~50% DA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2	42
4.2. NAC E DEXA REVERTEM PARCIALMENTE A MORTE CELULAR INDUZIDA POR APAP EM CÉLULAS HEPG2	44
4.3. A INCUBAÇÃO COM APAP PROMOVE ALTERAÇÃO NO PERFIL DE INFLUXO DE CÁLCIO	46
4.4. A INCUBAÇÃO COM APAP PROMOVE LIBERAÇÃO DE ATP	50
4.5. A INCUBAÇÃO COM ATP PROMOVE PERDA NA VIABILIDADE CELULAR	52
4.6. A INCUBAÇÃO COM ADP PROMOVE PERDA NA VIABILIDADE CELULAR	54
4.7. A INCUBAÇÃO COM ADENOSINA NÃO ALTERA A VIABILIDADE CELULAR.....	56
4.8. A INCUBAÇÃO COM APAP E ADENOSINA PROMOVE ALTERAÇÕES NA FASE DE CLICO CELULAR DE CÉLULAS HEPG2.....	58
4.9. A INCUBAÇÃO COM BAPTA-AM REDUZ A MORTALIDADE INDUZIDA POR APAP.....	62
4.10. A INCUBAÇÃO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS PROMOVE REDUÇÃO NA PERDA DE VIABILIDADE INDUZIDA POR APAP	64
4.10.1. BLOQUEIO NÃO-SELETIVO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2.....	64
4.10.2. BLOQUEIO NÃO-SELETIVO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2 (PPADS).....	66
4.10.3. BLOQUEIO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2X (TNP-ATP).....	68
4.10.4. BLOQUEIO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2X7.....	70
4.11. A INCUBAÇÃO COM UMA ATPASE (APIRASE) REDUZ A MORTALIDADE INDUZIDA POR APAP	72
4.12. O METABOLISMO DE ATP EXTRACELULAR IN VIVO REVERTE PARCIALMENTE A LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP	74
5. DISCUSSÃO.....	76
6. CONCLUSÕES	80
7. REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos de metabolismo do APAP.....	21
Figura 2 Perfil de ciclo celular.....	36
Figura 3 Influxo de Ca^{2+} diferencial entre células HepG2 tratadas ou não com APAP.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Receptores purinérgicos.....	27
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva dose-resposta de APAP.....	43
Gráfico 2 Curva tempo-resposta de APAP 5 mM.....	43
Gráfico 3 Pré-tratamento com NAC e DEXA reverte morte celular induzida por APAP.....	45
Gráfico 4 Tempo diferencial para o início do influxo de Ca^{2+}	47
Gráfico 5 Perfil diferencial de influxo de Ca^{2+} MEDIANTE TRATAMENTO COM APAP.....	48
Gráfico 6 APAP induz maior amplitude de fluorescência.....	49
Gráfico 7 Valores máximos de fluorescência diferenciais.....	49
Gráfico 8 Liberação de ATP induzida pela incubação com APAP.....	51
Gráfico 9 Curva dose-resposta de incubação com ATP.....	53
Gráfico 10 ATP não aumenta a perda de viabilidade induzida por APAP.....	53
Gráfico 11 Curva dose-resposta de ADP.....	55
Gráfico 12 ADP não aumenta a morte celular induzida APAP.....	55
Gráfico 13 Curva dose-resposta de adenosina.....	57
Gráfico 14 Adenosina reverteu parcialmente a perda de viabilidade induzida por APAP.....	57
Gráfico 15 Alterações na fase de ciclo induzidas por incubação com APAP e tratamento com adenosina.....	60
Gráfico 16 Alterações na fase de ciclo induzidas por incubação com APAP e tratamento com adenosina.....	60
Gráfico 17 Adenosina reverte parcialmente alterações na fase de ciclo induzidas por APAP.....	61
Gráfico 18 Curva dose-resposta de BAPTA-AM.....	63
Gráfico 19 BAPTA-AM reverteu parcialmente a perda de viabilidade induzida por APAP.....	63
Gráfico 20 Curva dose-resposta de Suramina.....	65
Gráfico 21 Suramina reduz a morte celular induzida por APAP.....	65
Gráfico 22 Curva dose-resposta de PPADS.....	67
Gráfico 23 PPADS reduz a morte celular induzida por APAP.....	67
Gráfico 24 Curva dose-resposta de TNP-ATP.....	69
Gráfico 25 TNP-ATP reduz a morte celular induzida por APAP.....	69
Gráfico 26 Curva dose-resposta de OxiATP.....	71
Gráfico 27 OxiATP não reduz a morte celular induzida por APAP.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- APAP – acetaminofeno, paracetamol, N-acetyl-*p*-aminophenol
- ADP – adenosina difosfato
- ALT – alanina transaminase (transaminase glutâmica pirúvica sérica)³
- AMP – adenosian monofosfato
- AIF – Fator Indutor de Apoptose
- ATP – adenosina trifosfato
- BAPTA-AM – 1,2-*bis*(*o*-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid
Tetra(acetoxymethyl)
- Bax – proteína X associada a Bcl-2 (*“Bcl-2-associated X protein”*)
- Bcl-2 – linfoma de células B 2 (*“B cell lymphoma 2”*)
- Ca²⁺ – íon cálcio
- cADPr – ADP-ribose cíclica (*“cyclic ADP ribose”*)
- CaM – moléculas de adesão celular (*“cell adhesion meolecules”*)
- CpG – sítios genômicos onde a freqüência de seqüências CG é maior que em outras regiões
- DAMP's – padrões moleculares associados a perigo (*“damage-associated molecular patterns”*)
- DEXA - Dexametasona
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- ELISA – ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (*“enzyme linked immunosorbent assay”*)
- ER – retículo endoplasmático
- FHA – Falência Hepática Aguda
- Fluo-3 4 AM – -3 acetoxymethyl ester
- HMGB1 – proteínas do grupo de alta mobilidade (*“high-mobility group protein 1”*)
- HSP – proteínas de choque térmico (*“heat shock proteins”*)
- IL – interleucina
- InsP3 – inositol 1-4-5 trisphosphate
- LDH – lactato desidrogenase

MTT – sal tetrazolium, 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium
bromide thiazol blue

NAC – N-acetilcisteína

NAPQI – N-acetil-*p*-benzo-quinona imina

P1 – receptores purinérgicos de nucleosídeos

P2 – receptores purinérgicos de nucleotídeos

P2X – receptores do tipo P2 ionotrópicos

P2Y – receptores do tipo P2 metabotrópicos

PBS - salina tamponada com fosfato

Pi – fosfato inorgânico

PI – Iodeto de Propídio

PPADS - Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid)
tetrasodium salt hydrate

RNS – espécies reativas de nitrogênio

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPM – rotações por minuto

SERCA – SR/ER Ca²⁺-ATPase

SFB – soro fetal bovino

SR – retículo sarcoplasmático

TLR – Toll-like receptor

TGF – fator de crescimento transformante

UDP – uridina difosfato

RESUMO

O fígado é essencial para a manutenção da homeostase corporal. Dentre seus diversos papéis críticos, uma função especialmente importante é o metabolismo hepático de produtos químicos, toxinas e drogas. Considerando as importantes funções desempenhadas pelo fígado, é de se esperar que as falências hepáticas acarretem grandes prejuízos aos indivíduos sendo, dessa forma, importante ampliar os conhecimentos neste campo. A overdose por paracetamol (APAP) causa injúria no fígado e é a principal causa de falência hepática aguda (FHA) nos Estados Unidos e no Reino Unido. Já é conhecido que durante a morte celular induzida por APAP há um desbalanço na dinâmica iônica celular (especialmente mitocondrial), que inclui a desregulação no conteúdo intracelular de cálcio. Tal alteração pode, em última análise, promover a morte da célula por necrose, com conseqüente liberação de conteúdo celular, como por exemplo DNA, HSP (proteínas de choque térmico “*Heat Shock Protein*”), produtos mitocondriais e ATP. De maneira interessante, o ATP é capaz de induzir pulsos de cálcio em hepatócitos em cultura, porém, ainda não é determinado como a sinalização purinérgica e a sinalização de cálcio relacionam-se neste contexto, bem como seu papel isolado no processo de morte celular estéril induzida por paracetamol. Assim, nosso trabalho investigou se a liberação extracelular de ATP durante a necrose induzida por APAP poderia ser um fator reverberador de morte celular, bem como estudamos os mecanismos pelos quais purinas poderiam modular o ciclo de vida de hepatócitos. Demonstramos que a incubação de uma linhagem hepatocítica (HepG2) com paracetamol promove morte celular, com aumento da concentração de ATP no meio de cultura, e conseqüente hiperresponsividade a essa purina. De maneira interessante, a destruição do ATP por uma ATPase reverteu significativamente a morte celular induzida por APAP, inclusive em um modelo *in vivo* de FHA. Ainda, a incubação com ATP e ADP, mas não com adenosina, foi capaz de induzir diretamente morte celular. Finalmente, demonstramos que a incubação com adenosina, similar ao observado com ATPase, reverteu a morte celular induzida por APAP. Nossos dados nos permitem concluir que a liberação de ATP (e seu metabolismo a

ADP) é detrimental durante a morte celular aguda, e que o metabolismo final do ATP até a adenosina pode ser um mecanismo protetor contra a reverberação da morte celular aguda.

ABSTRACT

The liver is an essential organ to maintaining the body homeostasis. Among its many critical roles, resides the important function of hepatic metabolism of chemicals, toxins and drugs. Considering the important functions performed by the liver, it is expected that the hepatic diseases entail large losses to illness people. It is therefore important to amplify the knowledge on this field. Paracetamol (APAP) overdose causes liver injury and is the major cause of acute liver failure (ALF) in the United States and UK. It is well known that during the acute cell death, such as induced by APAP, an imbalance in the ionic cell dynamics is observed (especially in mitochondria), which includes the dysregulation in the intracellular calcium content. Such alteration can, ultimately, promote cell death by necrosis, releasing intracellular contents, including DNA, HSP, mitochondrial products and ATP. Interesting, ATP induces calcium pulses in cultured hepatocytes, although it is not determined how the purinergic signaling and the calcium signaling are co-related in the context of necrosis, as well as its individual role in the sterile cell death mechanism induced by paracetamol. In this context, we have investigated if the extracellular ATP release during APAP-induced necrosis consists in a reverberating cell death feature, as well to elucidate the mechanisms by which purines modulate hepatocyte mitosis cycle. We have shown that the incubation of a hepatocytic lineage (HepG2) with paracetamol promotes cellular death, increasing ATP concentration in the culture medium, and consequently the hyper-responsiveness to this purine. Interesting, the ATP destruction (by an ATPase) reverted significantly the cell death induced by APAP, also by using a *in vivo* model of ALF. Thus, the incubation with adenosine reverted the cell death induced by APAP. Our data suggest that the ATP release (and its metabolite ADP) is detrimental during the acute cell death and the final metabolism of ATP until adenosine may be a protective mechanism against the acute cell death amplification, putting forward the future exploration of this signaling pathway in the therapeutics.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O FÍGADO

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, pesando cerca de 1500 gramas 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, e 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 constituído por inúmeras estruturas poliédricas, os lóbulos, os quais contêm a célula metabólica funcional, o hepatócito. 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 a veia centrolobular e vasos subseqüentes, chegando até a veia hepática e deixando o órgão (Thomson & Knolle, 2010).

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 e 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 de degradação bacteriana originados do trato gastrointestinal (Thomson & Knolle, 2010). Dentre seus diversos papéis críticos, uma função especialmente

importante é o metabolismo hepático de produtos químicos, toxinas e drogas (Nakamura *et al.*, 1986).

Tendo em vista essa gama de funções, é esperado que doenças hepáticas sejam de grande importância médica, promovendo diversas disfunções que podem culminar em morte. 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 um ano após o procedimento (Wigg *et al.*, 2005, estatísticas europeias).

1.2.A FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

A falência hepática aguda é a manifestação de uma injúria hepática repentina grave e advém de causas variadas. A doença foi nomeada como “falência hepática fulminante” em 1970, sendo definida como uma enfermidade potencialmente reversível que é o resultado de lesão hepática grave, com o aparecimento de encefalopatia após 8 semanas de surgimento dos sintomas e ausência de doença hepática pré-existente (Trey & Davidson, 1970). Atualmente, na clínica e na pesquisa, ela é considerada 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 (Bhaduri & Mieli-Vergani, 1996). Os sinais clínicos dessa doença são bem amplos, e incluem perda de peso e 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 é rara, acometendo de 1 a 6 pessoas por milhão anualmente (Bower *et al.*, 2007). Apesar de pouco comum, essa grave doença ocorre mais comumente em adultos jovens e está associada com alta mortalidade e elevado custo. Em muitos países é o indicador mais freqüente para transplante hepático de emergência (Bernal *et al.*, 2010). Os vírus da hepatite A, B, e E são

os principais causadores de falência hepática em países em desenvolvimento, enquanto a falência induzida por drogas/fármacos prevalece nos EUA e Europa, com destaque para a hepatotoxicidade induzida por paracetamol (APAP), que predomina nos EUA e cresce em incidência em vários países (Bernal *et al*, 2010).

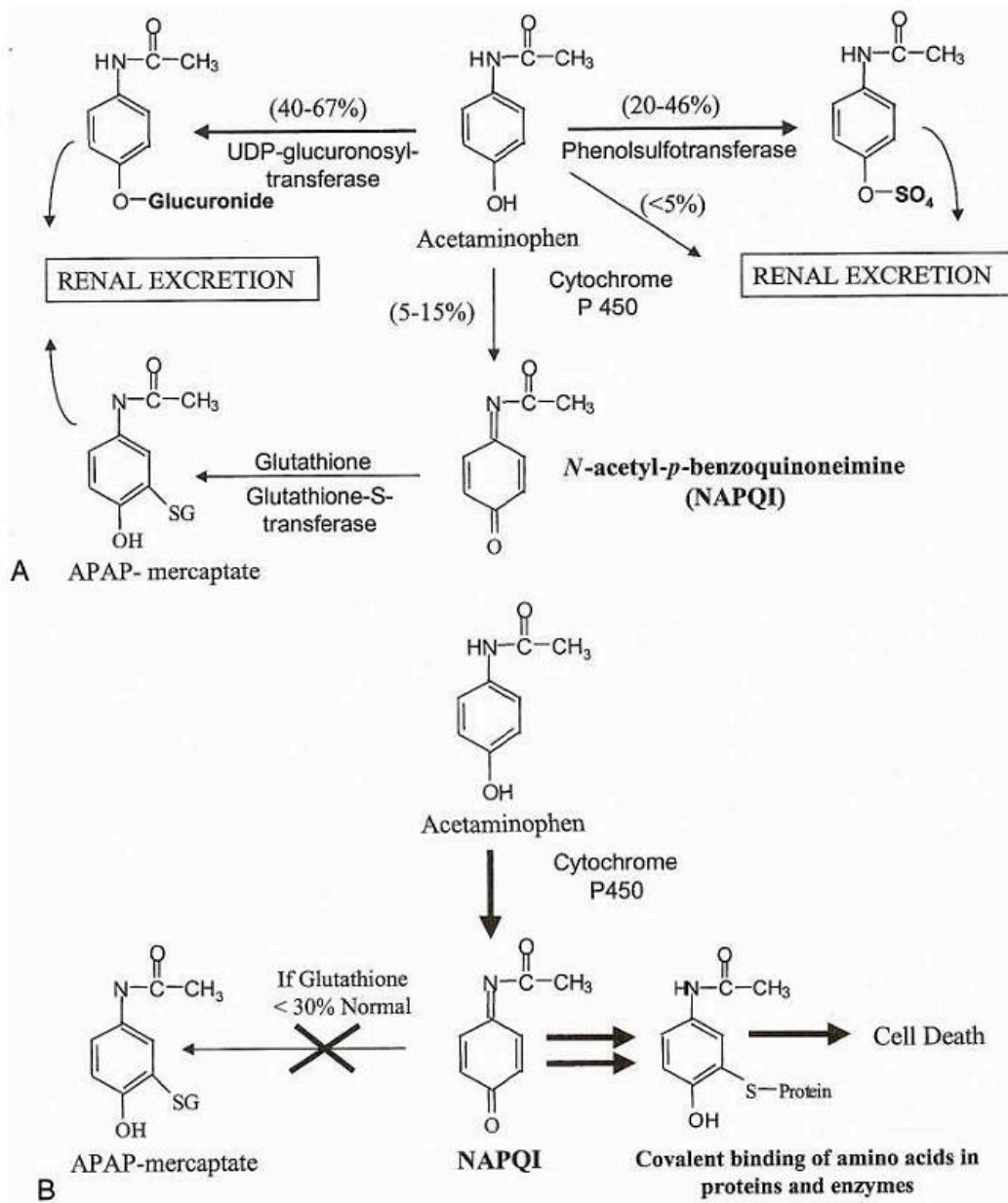
As opções terapêuticas para FHA são bastante escassas. Se a doença ainda não estiver em um estágio avançado, intervenções a fim de limitar o dano tecidual podem ser realizadas junto à unidade de tratamento intensivo, como o uso de glicocorticóides em hepatites autoimunes (Ichai *et al*, 2007), ou antivirais como lamivudina e aciclovir (Kumar *et al*, 2007), se este for o caso. 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 sobredose de APAP, no qual a NAC é a melhor terapia disponível (Saito *et al*, 2010). O tratamento de pacientes com FHA induzida por APAP com NAC mostra-se eficaz mesmo após 10 horas da overdose (Prescott *et al*, 1977; Rumack *et al*, 1981), sendo postulado por Prescott (1996) que o antídoto tem eficácia até 24 horas após ingestão de APAP, mesmo em casos de grande overdose. Entretanto, para os indivíduos com FHA avançada, o único tratamento efetivo é o transplante hepático sendo necessária a rápida identificação dos pacientes que não conseguirão uma regeneração satisfatória baseada em medicamentos para que as chances de um transplante bem-sucedido aumentem (Bernal *et al*, 2010). Infelizmente, a mortalidade causada por FHA continua elevada, apesar do progresso considerável nos campos de tratamento intensivo e transplante hepático (Newsome *et al*, 2000).

Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de modelos de FHA. Tais estudos permitem uma maior compreensão acerca dos estados patofisiológicos subjacentes e o desenvolvimento e refinamento de tratamentos para FHA por meio de testes e otimização de novas opções terapêuticas (Newsome *et al*, 2000). Os modelos de FHA mais utilizados compreendem técnicas cirúrgicas e uso de drogas hepatotóxicas, como paracetamol (APAP), azoximetano, concavalina A, galactosamina, halotano, tioacetamida, amatoxina-endotoxina, etc (Tuñón *et al*, 2009).

1.3.A HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA POR APAP COMO MODELO DE FHA

O APAP é uma droga analgésica e antipirética amplamente usada e é um componente comum de formulações prescritas contendo opióides. Apesar de segura em níveis terapêuticos, a overdose por APAP causa injúria no fígado e é a principal causa de falência hepática nos Estados Unidos e no Reino Unido (Larson *et al*, 2005; Ostapowicz *et al* 2002). Em doses terapêuticas, mais de 90% da droga é glucorinidado ou sulfatado no fígado e, subsequentemente, excretado (Jaeschke & Bajt, 2005). O remanescente é metabolizado por uma terceira via metabólica, na qual APAP é bioativado pelo citocromo P450 (CYP450) no intermediário eletrofílico N-acetil-*p*-benzoquinoneimina (NAPQI) (James *at al.* 2003), que pode ser neutralizado através de conjugação com glutathiona (GSH). Entretanto, após uma overdose por APAP, a formação de NAPQI excede a capacidade de detoxificação da GSH, resultando em ligação covalente às proteínas celulares, como esquematizado na Figura1.

Figura 1 Mecanismos de metabolismo do APAP



Extraído de Hung & Nelson, 2004

Apesar da ligação protéica total causada por uma overdose de APAP ou seu isômero 30-hidroxiacetanilido ser similar e muitas proteínas aduzidas terem sido identificadas, a toxicidade ocorre somente com APAP, que mostra maior ligação a proteínas mitocondriais. A subsequente disfunção mitocondrial leva à inibição da respiração mitocondrial, depleção de ATP e formação de radicais reativos de oxigênio e peroxinitrito (ROS e RNS) dentro da mitocôndria. O estresse oxidativo é envolvido na ativação da via de quinase c-Jun N-terminal (JNK) e, eventualmente, junto à depleção de glutathiona (GSH) mitocondrial, desencadeia a abertura do poro de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial (MPT), resultando em colapso do potencial de membrana mitocondrial, o que foi, inclusive, observado *in vitro* utilizando culturas primárias de hepatócitos murinos após exposição a APAP por 4-6 horas (Kon *et al*, 2004a).

A ocorrência de MPT tem relação direta com a morte dos hepatócitos, que tem por conseqüências a inabilidade para sintetizar ATP e, finalmente, morte celular por necrose (Kim *et al*, 2003). Há ainda a formação de poros na membrana mitocondrial externa (canal mitocondrial induzido por apoptose), que liberam fatores pró-apoptóticos, como citocromo C, endonuclease G, Smac/Diablo e Fator Indutor de Apoptose (AIF) para o citosol (Dejean *et al*, 2006; Kinnally & Antonsson, 2007). A abertura desses poros é regulada por proteínas da família Bcl-2, como a pró-apoptótica Bax, residente no citosol. A ativação promove sua translocação para mitocôndrias, onde a proteína é inserida na membrana externa e sofre oligomerização, formando os canais (Dejean *et al*, 2006; Kinnally & Antonsson, 2007). A liberação de AIF e endonuclease G ocorre entre 3 e 6 horas de exposição ao APAP, antes da morte celular, e está relacionada à condensação de cromatina e fragmentação do DNA, respectivamente. Tal liberação, junto à grave diminuição do metabolismo aeróbico energético e massiva depleção de ATP, leva à morte celular necrótica (Jaeschke & Bajt, 2005). O papel da apoptose na injúria hepática por APAP é controverso. Estudos anteriores relataram que, em camundongos, após uma dose tóxica de APAP, 40% dos hepatócitos mortos eram apoptóticos e 60% necróticos (Ray *et al*. 1996). Entretanto, Gujral e colaboradores, em 2002, alegaram em seu estudo que, apesar da liberação de

citocromo C das mitocôndrias, ainda não foi observada ativação significativa de caspases, de modo que a apoptose contribuiria com menos de 5% da injúria total em camundongos. O que determina a morte por apoptose ou necrose são os níveis de ATP intracelulares, de modo que baixos níveis de ATP são associados à necrose, enquanto níveis fisiológicos da purina associam-se à apoptose (Hinson *et al*, 2010). De fato, em culturas de hepatócitos murinos expostos ao APAP, as células morrem primeiramente por necrose, mas a adição de substâncias que repõem o ATP intracelular, como frutose (um substrato glicolítico), e de drogas que estabilizam a membrana, como glicina, levam à morte por apoptose (Kon *et al*, 2004).

Durante a necrose, acontece o extravasamento de vários produtos e organelas celulares. Esse conteúdo estéril é percebido pelo organismo como Padrões Moleculares Associados a Lesão (DAMPs “*damage-associated molecular patterns*”). DAMPs são moléculas de natureza bastante variada, como a proteína nuclear HMGB1 (*high-motility group box 1*), HSPs (*heat-shock proteins*), proteínas ligadoras de cálcio S100, fragmentos de DNA CpG não-metilado, ácido úrico citoplasmático, ATP, peptídeos mitocondriais formilados e até componentes da matriz extracelular, como hialuronato e sulfato de heparan (Rock *et al*, 2010). 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 vazam para o meio extracelular, onde podem estimular uma série de receptores nas células vizinhas, sejam elas do parênquima ou leucócitos residentes (Chen & Nuñez, 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. As 5 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). Durante a citotoxicidade induzida por APAP, ocorre *up-regulation* de muitas citocinas e quimiocinas, dentre as

quais é descrito que interleucina-1 α (IL-1 α) (Blazka *et al*, 1995; Chen *et al*, 2007) e IL-1 β (Imaeda *et al*, 2009) sejam mediadores críticos. É demonstrado que DAMPs podem sinalizar para TLRs, que por sua vez ativam inflamassomas (Lamkanfi & Dixit, 2009). Foi identificado por Imaeda e colaboradores, 2009, o envolvimento do inflamassoma NLRP3, o qual fornece sinal para a clivagem e ativação de pro- IL-1 β e IL-18, transcritos mediante sinalização via TLR9.

1.4. SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO E SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA

Dentre as vias conhecidas de morte celular, é descrito que um desequilíbrio na homeostase de Ca²⁺ intracelular possa ser importante na hepatotoxicidade mediada por paracetamol. A concentração do cálcio intracelular [Ca²⁺]_i basal em hepatócitos é de 100-200 nM e sua regulação é importante para a manutenção de diversas funções celulares (Woods *et al*, 1986), de modo que interferências na habilidade de controlar essas funções associadas ao Ca²⁺ podem afetar a viabilidade celular negativamente. A toxicidade induzida por paracetamol envolve a inibição de enzimas que ajudam na manutenção do grande gradiente de concentração de cálcio através da membrana plasmática (Carafoli, 1987), as Ca²⁺-Mg²⁺ ATPases, promovendo acúmulo de Ca²⁺ (Corcoran *et al.*, 1988). Isso pode ser resultado da interação do NAPQI com grupos tiol nessas enzimas, com a subsequente inabilidade para neutralizar [Ca²⁺]_i, resultando em um aumento incontrolável na sua concentração (Moore *et al*, 1985). É proposto que essa elevação leve a efeitos deletérios, como a ativação de enzimas dependentes de Ca²⁺ (fosfolipases, proteases e endonucleases) e/ou alterações no citoesqueleto cálcio-dependentes (Nicotera & Orrenius, 1998). Como evidências, toxicidade induzida por paracetamol *in vivo* é relacionada a decréscimo na atividade de ATP-ase dependente de Ca²⁺ na membrana plasmática e com a diminuição no acúmulo de Ca²⁺ dependente de ATP. Além disso, exposição a elevadas concentrações de paracetamol resulta em uma elevação na atividade de fosforilase A. Essa enzima pode ser ativada por aumento de [Ca²⁺]_i via fosforilase B kinase, que por sua vez converte fosforilase B a fosforilase A

(Harman *et al.*, 1991). A enzima fosforilase A é a forma ativa da glicogênio-fosforilase, e catalisa a etapa limitante da quebra de glicogênio, liberando uma ligação glicosídica, reunindo dois resíduos de glucose no glicogênio, sofre o ataque por fosfato inorgânico (Pi), removendo o resíduo terminal não-redutor de glucose como glucose 1-fosfato. Como a fosforilase A é responsiva ao cálcio citosólico livre, sua ativação é um indicativo válido de alterações na homeostase de Ca^{2+} devidas à necrose induzida por APAP (Salas & Corcoran, 2003).

O controle da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no citoplasma e organelas tem por base o papel de proteínas que, via de regra, são intrínsecas à membrana plasmática e membrana de organelas (exceto, por exemplo, a proteína calsequestrina, localizada no lúmen reticular) e transportam Ca^{2+} através das mesmas (Carafoli, 2002). Essas proteínas não possuem papel direto no processamento do sinal de Ca^{2+} , mas podem ser alvos da regulação do íon (como no caso dos canais de Ca^{2+}). Essas proteínas pertencem a várias classes: Canais de Ca^{2+} na membrana plasmática são abertos por voltagem, ligantes ou pelo esvaziamento dos estoques internos de Ca^{2+} . Nos retículos endo/sarcoplasmático (ER e SR, respectivamente), eles são, por sua vez, ativados pelos segundos mensageiros inositol 1-4-5 trisphosphate (InsP3) e cyclic ADP ribose (cADPr). cADPr atua nos canais também denominados como receptores ryanodine e são sensíveis ao agonista cafeína. Fatores protéicos acessórios, dentre eles moléculas de adesão celular (“*cell adhesion molecules*” CaM), podem ser requeridos para o efeito liberador de Ca^{2+} promovido por cADPr. Bombas do tipo ATPase são encontradas na membrana plasmática (onde são denominadas PMCA, “*plasma membrane Ca²⁺ ATPase*”), no ER e SR (SERCA “*SR/ER Ca²⁺ ATPase*”) e no complexo de Golgi. Eles exportam Ca^{2+} para o lúmen do ER e SR ou para os espaços extracelulares. Outros transportadores são os trocadores de Na^+ e Ca^{2+} (NCX). Células animais contêm dois tipos de NCX, um na membrana plasmática e outro na membrana interna de mitocôndrias. A existência de transportadores de Ca^{2+} tão diversos é justificada por suas diferentes propriedades, que satisfazem todas as demandas celulares em termos de homeostase de Ca^{2+} . As ATPases, por exemplo, possuem elevada afinidade por Ca^{2+} , mas baixa capacidade de

transporte, enquanto os NCXs da membrana plasmática possuem propriedades opostas (Carafoli, 2002).

O aumento transitório no ATP extracelular é ubiquamente usado para comunicação célula-célula nos sistemas nervoso, vascular e imune (Schenk *et al*, 2008, Atarashi *et al*, 2008). Em tecidos saudáveis, a liberação de ATP pelas células é finamente regulada e sua concentração é mantida baixa por ATP/ADPases extracelulares (Kaczmarek *et al*, 1996, Picher *et al*, 2003). Em tecidos lesados, ATP é um adjuvante endógeno natural liberado por células lesadas que inicia o processo inflamatório e amplifica e sustenta a imunidade celular através de sinalização purinérgica mediada por receptores do tipo purinérgicos, denominados P2 (Bours *et al*, 2006; Kanneganti *et al*, 2006a, Kanneganti *et al*, 2006b; Mariathasan *et al*, 2006). Até hoje foram identificados sete receptores ionotrópicos (P2X) e doze metabotrópicos (P2Y). O nucleosídeo Adenosina, metabólito de ATP, possui receptores purinérgicos do tipo P1, divididos em 4 subtipos (Boeynaems *et al*, 2005; Communi *et al*, 2001; Duhant *et al*, 2002; Marteau *et al*, 2005; Marteau *et al*, 2003). Dentre os receptores P2, a classe P2X permite a passagem não-seletiva de cátions através da membrana plasmática, resultando em efluxo de K^+ e influxo de Ca^{2+} . Foi demonstrado que ATP extracelular é um sinal crucial para disparar a síntese e liberação de IL-1 β madura após primização por macrófagos devido a sinais inflamatórios, como LPS. A ligação de ATP a receptores P2X₇ provoca a oligomerização e abertura de canais e depleção intracelular de potássio, necessária para a ativação de inflamassoma. Além disso, a ativação de caspase-1 e liberação de IL-1 β ativa por macrófagos requer panexina-1 (Panx-1) funcional, uma proteína que se associa a receptores P2X₇ durante estimulação por ATP e induz a formação de um grande poro não-seletivo. Foi visto, ainda, por Riteau e colaboradores em 2010, em um modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, que ATP extracelular atua como um novo DAMP envolvido no estabelecimento de inflamação pulmonar, levando ao processo fibrótico. Para maior detalhamento dos receptores, consultar a Tabela 1.

Tabela 1 – Receptores purinérgicos

Família		Agonistas Naturais	Classe	Antagonistas			
	Subfamílias			Seletivos	Não-seletivos		
P1	A1	Adenosina	Receptores ligados à proteína G	PSB 36	Theophylline, Cafeína (P1A ₁ e P1A _{2a})		
	A2 _a			Istradefylline			
	A2 _b			CVT-6883			
	A3			MRS-1191			
P2	X	1	ATP, 2MeSATP	Canais iônicos dependentes de ligante	NF-157	TNP-ATP, NF-023, <i>Iso</i> -PPADS,	Suramina, PPADS
		2	ATP, 2MeSATP		RO-3		
		3	ATP, 2MeSATP		RO-3, NF-110		
		4	ATP, 2MeSATP		Ivermectin		
		5	ATP, 2MeSATP, BzATP				
		6	ATP		Não há antagonistas conhecidos		
		7	ATP, 2MeSATP, BzATP		OxiATP, Brilliant Blue G		
	Y		1	ADP > ATP	Receptores ligados à proteína G	MRS2279	Reactive Blue 2
			2	UTP = ATP			
			4	UTP >> ATP			
			5	Ácido Linfofosfatídico			
			6	UDP >> UTP		MRS-2578	
			8	Receptor órfão			
			9	Ácido Linfofosfatídico			
10	Receptor órfão						
11	ATP	NF-157, NF-340					
12	ADP > ATP	Cangrelor					
13	ADP > ATP	MRS-2211					
14	UDP-glucose > UDP-galactose > UDP-N-acetilglucosamina	UDP dissodium salt					

Adaptado de Bucheimer & Linden, 2003; Beldi *et al*, 2010, Kügelgen, 2008.

Os hepatócitos são dotados de canais para ATP do tipo P2X₇, canais catiônicos que se abrem mediante baixas concentrações de ATP no meio extra-celular. Breves exposições a ATP levam à abertura de canais iônicos permeáveis a pequenos íons, como Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, enquanto a exposição prolongada ou a elevadas concentrações resulta em formação de poro, permeável a cátions orgânicos de elevado peso molecular, levando à apoptose. Além disso, a ocupação dos receptores P2X₇ leva a “blebbing” (formação de bolhas na membrana plasmática, causada por dissociação localizada entre citoesqueleto e membrana plasmática), sem função clara, e liberação de microvesículas associadas à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e fator de crescimento transformante β (“*transforming growth factor β*” TGF β) (Burnstock, 2008).

Em contrapartida, tendo em vista o potencial inflamatório e citotóxico do ATP, existem mecanismos de controle, como ectonucleotidases, enzimas presentes na membrana plasmática que degradam nucleotídeos presentes no meio extracelular. A degradação de nucleotídeos, especialmente do ATP, e a geração de seus produtos, principalmente o nucleosídeo adenosina, têm diversos efeitos nas funções celulares. A seqüência de degradação de ATP extracelular (ATP > ADP > AMP > adenosina) envolve ectonucleotidases distintas: nucleosídeo trifosfatase, nucleosídeo difosfatase, e 5'-nucleotidase (Che *et al*, 1997). Além de modular a sinalização mediada por receptores P2, as ectonucleotidases produzem as moléculas-chave para o salvamento de purinas, reciclagem das bases nitrogenadas utilizadas na recomposição de nucleotídeos, e conseqüente reabastecimento dos estoques intracelulares de ATP em diversos tipos celulares (Plesner, 1995).

Modelos de necrose hepática demonstraram que há liberação de ATP para o meio extracelular, que atua em mecanismos de recrutamento celular. A degradação de ATP liberado após a injúria por apirase (uma ATP-difosfohidrolase purificada de batata; Handa & Guidotti, 1996) resultou em redução significativa no número total de neutrófilos recrutados para o fígado em resposta à lesão tecidual (McDonald *et al.*, 2010). A família das apirases foi denominada E-ATPases, sendo distribuída em diversos organismos. O grupo inclui CD39, uma molécula de 70-100 kDa expressa em linfócitos ativados e

previamente descrita como um marcador de superfície de células B transformadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (Wang & Guidotti, 1996). No microambiente do fígado, além de CD39, estão presentes as famílias das ecto-fosfodiesterases tipo Nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase (NPP), fosfatases alcalinas (ALP), e CD73, uma ecto-5'-nucleotidase (Jansen & Bollen, 2005). CD73 termina a cascata de defosforilação de nucleotídeos em adenosina (Zimmermann, 1992).

Os benefícios observados pela elevação de adenosina extra-celular devem-se não somente à anulação dos efeitos de receptores P2, mas também à ativação de receptores do tipo P1, que possuem efeitos diversos comparados àqueles mediados por receptores do tipo P2 (Beldi *et al.*, 2010). O nucleosídeo atua no mecanismo de inibição alostérica dos canais de cálcio, auxiliando no processo de regulação dos níveis intracelulares deste íon. É também relatado como benéfico em processos de cicatrização, sendo comprovada sua eficácia em tratamentos tópicos (Hashmi *et al.*, 2006).

1.5. CITOXICIDADE INDUZIDA POR APAP EM CÉLULAS HEPG2

A maioria do nosso atual conhecimento sobre hepatotoxicidade mediada por APAP tem sido aprendida através de estudos em roedores *in vivo* e culturas primárias. Entretanto, existem diferenças notáveis no tempo de curso da injúria entre roedores e humanos que podem ser provenientes principalmente, de especificidades das taxas metabólicas e tamanho corporal, que não podem ser completamente desprezadas. Estudos preliminares de hepatotoxicidade mediada por drogas para uso humano confiam fortemente na extrapolação de modelos animais *in vivo* e modelos de cultura de células humanas *in vitro*.

Os modelos humanos *in vitro* preferidos são aqueles usando células humanas derivadas do fígado, como hepatócitos primários e linhagens celulares de hepatocarcinomas, incluindo a linhagem celular HepG2 (Nakamura *et al.*, 2010). HepG2 é uma linhagem celular imortalizada não-tumorigênica proveniente de um carcinoma hepatocelular humano que acometeu um

adolescente caucasiano de 15 anos. Essa linhagem retém muitas funções celulares muitas vezes perdidas por hepatócitos primários, como a expressão de receptores de superfície celular hepatócito-específicos e síntese e secreção de proteínas plasmáticas. Essas células também retêm oxidases de função mista P450-dependentes e atividades de conjugação de ácido glucurônico e sulfato envolvidas nas fases I e II do metabolismo de xenobióticos (Roe *et al.*, 1992). Além disso, células HepG2 têm um conjunto completo de enzimas de Fase II, com exceção de UDP-glucuronosiltransferases (Westerink & Schoonen 2007), e têm sido usadas em testes de toxicidade com sucesso (Summeren *et al.*, 2010). Ensaio de toxicidade induzida por APAP em HepG2 apresentam vantagens para o estudo de mecanismos em células humanas (Salas & Corcoran, 1997).

Dessa forma, a liberação de ATP durante a morte celular estéril induzida por paracetamol pode promover a entrada de cálcio nas células já sensibilizadas pelo fármaco, promovendo o desbalanço intracelular deste íon e, conseqüentemente, reverberando a morte das células. Neste sentido, o presente trabalho investigou se a liberação extracelular de ATP durante a necrose induzida por APAP poderia ser um fator reverberador de morte celular, bem como estudar os mecanismos pelos quais purinas poderiam modular o ciclo de vida de hepatócitos.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos da sinalização purinérgica e de cálcio envolvidos da hepatotoxicidade induzida por paracetamol.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o influxo de cálcio em células HepG2 incubadas com APAP;
2. Estudar o papel das purinas ATP, ADP e adenosina na morte induzida por paracetamol;
3. Estudar a cinética de liberação de ATP em sobrenadante de células HepG2 incubadas com paracetamol;
4. Verificar o papel do paracetamol na modulação do trânsito de cálcio e as conseqüências deste evento na mortalidade de células incubadas com paracetamol;
5. Estudar o potencial de bloqueadores de receptores purinérgicos na inibição da morte induzida por paracetamol.

3. METODOLOGIA

3.1. CULTURA CELULAR

Células da linhagem HepG2 foram obtidas da Dr. Maria de Fátima Leite (Laboratório de Sinalização de Cálcio, ICB, UFMG) e foram mantidas a 37 °C e em uma atmosfera de 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram repicadas a uma razão de aproximadamente 1:4 a cada 3 dias. O plaqueamento foi realizado com células a uma densidade de 1 x 10⁵ células por poço em placas de 96 poços para os experimentos de viabilidade celular e 3 x 10⁵ células por poço em placas de 6 poços para os experimentos de sinalização de cálcio.

3.2. ENSAIO DE MTT PARA VIABILIDADE CELULAR

O sal tetrazolium, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazol blue (MTT) foi obtido da Sigma. Para averiguar a produção de cristais de formazan por células da linhagem HepG2 com ou sem tratamentos, e, conseqüentemente, a viabilidade celular, células dessa linhagem foram plaqueadas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os plaqueamentos foram realizados a uma densidade de 10⁵ células por poço em placas de 96 poços, em um volume final de 150 µL/ poço por 24 horas. Os sobrenadantes foram então recolhidos e substituídos por meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino, com ou sem os tratamentos propostos, acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% como solvente. Após 20 horas de tratamentos, os sobrenadantes foram retirados para o ensaio de MTT, no qual o sal foi dissolvido em PBS a uma concentração de 5 mg/ mL. A solução foi então acrescida de 15 mL de meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino. Da solução final, foram adicionados 140 µL/ poço. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Após o período de incubação, os

sobrenadantes foram retirados por meio da eversão das placas de modo a não danificar os cristais de formazan e células na superfície plástica dos poços. 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. Os grupos incubados apenas com o meio sem soro fetal bovino com 1% de DMSO por 24 horas foram considerados como 100% viáveis, sendo a viabilidade de cada amostra tratada apresentada como um percentual desta.

3.3. INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS HEPG2 E COLETA DE AMOSTRAS

O modelo contemplado no projeto foi o de lesão hepática induzida por overdose de paracetamol. Baseado nos trabalhos de Dai e Cederbaum, 1995, Zhang *et al.*, 2004 e Harman, 1991, a dose padrão de APAP escolhida foi de 5 mM, e o tempo de análise da viabilidade celular a 24^a hora após a administração do fármaco. Os grupos experimentais receberam 150 µL de uma solução de APAP (Henrifarma, China) a 5 mM acrescido ou não de tratamentos suplementares. A solução de APAP teve como veículo meio sem soro fetal bovino com 1% de DMSO. A solução foi, posteriormente, aquecida e homogeneizada no vortex para melhor solubilização do reagente, e esterilizada por passagem em filtro para seringa estéreis, com membrana PES e poros de 0,22 µm (Jet Biofil, Canadá) e aquecido. O grupo controle recebeu apenas o veículo aquecido. Na 20^a hora, o sobrenadante foi recolhido para análises posteriores, sendo substituído por 140 µL/ poço da solução de MTT.

3.4. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os tratamentos farmacológicos incluíram o uso de NAC 2,5 mM (obtido na farmácia de manipulação Araújo, Brasil), antídoto padrão usado no tratamento de intoxicação por APAP, e Dexametasona (DEXA) (Aché, Brasil) 10 µM, solubilizados em meio com DMSO a 1%, administrados 1 hora antes de

APAP. Os tempos finais de tratamento foram coincidentes com o tempo final de exposição ao APAP.

3.5. COLORAÇÃO COM PI E CITOMETRIA DE FLUXO

PI (iodeto de propídio) é um composto fluorogênico que se liga estequiometricamente a ácidos nucleicos, de modo que a emissão de fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA (e RNA, que deve ser removido para a quantificação de DNA) da célula. Quando células apoptóticas são coradas com PI e analisadas por citometria de fluxo, elas apresentam um pico hipodiplóide amplo (Sub-G1), que pode ser facilmente discriminado do estreito pico de células com conteúdo de DNA normal (diplóides) nos canais de fluorescência vermelhos. Esse método apresenta como vantagens uma estimativa de apoptose rápida, confiável e reprodutível e análise simultânea dos parâmetros de ciclo celular de células sobreviventes (Riccardi & Nicoletti, 2006).

De modo breve, foi realizado o protocolo abaixo (Riccardi & Nicoletti, 2006):

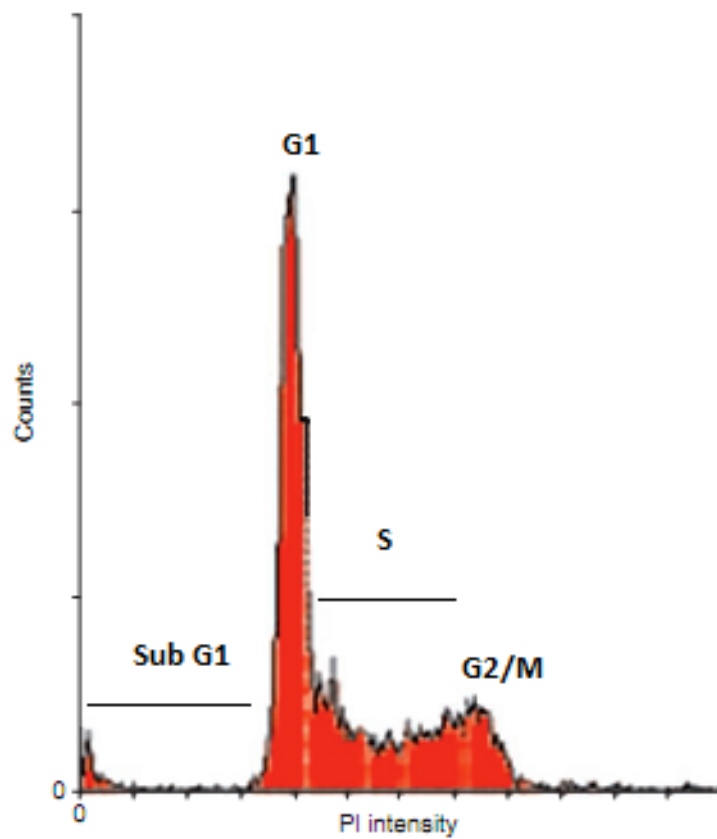
- 1 Células HepG2 foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de 3×10^5 células por poço em RPMI suplementado com 10% de SFB em um volume final de 2 mL por poço;
- 2 Após 24 horas, o meio foi substituído por RPMI sem SFB, em um volume final de 2 mL por poço;
- 3 Após 24 horas, o meio foi substituído por RPMI com ou sem os tratamentos propostos, em um volume final de 2 mL por poço;
- 4 Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com 1 mL de PBS para a retirada de meio remanescente. O PBS foi descartado após a lavagem;
- 5 Foram adicionados 500 μ L de Tripsina e as placas foram incubadas em estufa a 37° C com 5% CO₂ por 4 minutos;
- 6 A tripsina foi neutralizada com 2 mL de RPMI com 10% de SFB;

- 7 Foram recuperados 2 mL da solução contendo células. A solução foi depositada em microtubos; centrifugados a 1400 RPM por 5 minutos;
- 8 O sobrenadante foi desprezado;
- 9 Foram acrescentados 300 μ L de HFS (solução hipotônica e fluorocrômica) 0,5% com a luz apagada;
- 10 Os microtubos foram agitados em vortex;
- 11 A solução no interior dos microtubos foi homogeneizada delicadamente por pipetagem e transferida para tubos de citometria;
- 12 Os tubos foram envoltos em papel alumínio e mantidos resfriados em geladeira pelo período mínimo de 4 horas;
- 13 O pellet foi ressuspensado em 500 μ L de PBS;
- 14 As células foram fixadas pela adição de 4,5 mL de etanol 70% à suspensão de células, mantendo os tubos em gelo (a solução pode ser mantida a -20 °C por várias semanas);
- 15 Os tubos foram centrifugados a 400 G por 5 minutos e o sobrenadante foi removido;
- 16 As células foram lavadas com 5 mL de PBS e centrifugadas a 400 G por 5 minutos;
- 17 Células com extensiva degradação no DNA podem ser diretamente ressuspensas em uma solução corante de DNA sem nenhum tratamento adicional. O DNA não estando extensivamente degradado, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de PBS, com adição de 0,5 mL de buffer de extração de DNA. As células foram incubadas a temperatura ambiente e centrifugadas a 400 G por 5 minutos;
- 18 O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 1 mL de solução corante de DNA;
- 19 (vii) As células ressuspensas foram incubadas por no mínimo 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro;
- 20 As células foram analisadas por citometria de fluxo, com excitação de 488 nm. Foi medida a fluorescência vermelha (660 nm) e a dispersão lateral;

21 Coletamos ao menos 20000 eventos. Foram eliminados debris residuais

22 Foi criado um histograma com a plotagem da contagem de células no eixo y e conteúdo de DNA (intensidade de fluorescência) no eixo X, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Perfil de ciclo celular



Modificado de Ryba *et al*, 2011

3.6. MICROSCOPIA CONFOCAL

Os níveis de cálcio celular foram monitorados em células individuais utilizando microscopia confocal time-lapse. Células HepG2 foram cultivadas em lamínulas de 22 x 22 mm, em placas de 6 poços, por 24 horas, a 3×10^5 células/ poço, em RPMI com SFB 10% a um volume final de 2 mL/ poço, seguindo-se 24 horas de tratamento. Durante as análises sob microscópio as células cultivadas foram mantidas em uma solução de HEPES 1x. As células foram incubadas com fluo-3 4 M (fluo-3 acetoxymethyl ester; Molecular Probes); a fluorescência de fluo-3 foi medida por um sistema Confocal Imaging Bio-Rad MRC-102. Alterações na intensidade de fluorescência foram calculadas dividindo-se a intensidade de fluorescência medida após a administração de ATP 10 μ M pela média da fluorescência basal.

3.7. DOSAGEM DE ATP

Para o ensaio de dosagem de ATP, foi utilizado o kit Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay FLAA (Sigma, USA). Foram seguidas as orientações do fabricante.

3.8. TRATAMENTOS COM PURINAS

Para os ensaios de sinalização purinérgica, foram estabelecidas curvas dose-resposta da viabilidade de células HepG2 incubadas com as purinas ATP (Sigma, USA), ADP (Serva, Alemanha) e Adenosina (Sigma, USA), com ou sem APAP 5 mM. Após 24 horas de incubação em placas de 96 poços, o meio foi substituído pelos tratamentos com as purinas ATP nas concentrações 1, 10, 50, 100 e 1000 μ M; ADP, a 0,1, 1 e 10 μ M, e Adenosina (Sigma, USA) a 0,1, 1 e 10 μ M, com ou sem APAP 5 mM. As soluções foram preparadas em meio com 1% de DMSO, sendo adicionados 150 μ L por poço. A incubação foi

mantida por 20 horas, seguida de retirada dos sobrenadantes para realização do ensaio de MTT.

3.9. BAPTA-AM

O quelante de Ca^{2+} BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) (Sigma, USA) possui 4 grupos ésteres junto aos sítios de ligação ao Ca^{2+} , o que lhe confere permeabilidade à membrana. Ao entrar na célula, os ésteres são hidrolisados por esterases citoplasmáticas, formando o composto ativo BAPTA-AM, que atua como um buffer de Ca^{2+} intracelular, controlando a concentração do íon. Células HepG2 foram incubadas com BAPTA-AM nas doses 1, 10 e 100 nM, solubilizado em RPMI 1% DMSO, com ou sem APAP 5 mM, por 24 horas, para posterior análise de viabilidade por MTT ou sinalização de cálcio.

3.10. BLOQUEADORES PURINÉRGICOS

Para os ensaios de bloqueio farmacológico de receptores purinérgicos, células HepG2 tratadas foram incubadas com os antagonistas de receptores purinérgicos:

1. Suramina (8,8'-[Carbonylbis[imino-3,1-phenylene] carbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene) carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt) (Sigma, USA): É um antagonista de receptores purinérgicos P2 não-seletivo (entretanto, não é capaz de bloquear os receptores P2X₄, P2X₆, P2Y₄ e P2Y₁₄). Foi utilizado nas doses 10, 100 e 1000 μM .
2. PPADS (Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid tetrasodium salt) (Sigma, USA): É um antagonista purinérgico não-seletivo. Promove o bloqueio de receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2Y₁, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₃ (o último, em altas concentrações) Foi utilizado nas doses 50, 300 e 600 μM .

3. TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphate tetra (triethylammonium) salt) (Sigma, USA). É um antagonista de alta afinidade e seletividade para receptores P2X. Inibe correntes induzidas por ATP em células que expressam receptores P2X₁, P2X₃ e P2X_{2/3}. Apresenta seletividade 1000x. Foi utilizado nas doses.
4. ATP Oxidado (Adenosine 5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde) (Sigma, USA): Antagonista de receptores P2X₇, Promove efeito similar ao tratamento com apirase. Foi utilizado nas doses 0,1, 10 e 100 µM.

Todos os bloqueadores utilizados foram solubilizados em meio com 1% de DMSO na presença ou ausência de APAP 5 mM, testados na presença ou ausência de APAP 5 mM. Ao final do período de incubação, os sobrenadantes foram retirados para a realização do ensaio de MTT.

3.11. APIRASE

Para o ensaio relativo à clivagem de ATP extracelular, foi utilizada Apirase (Adenosine 5'-difosfatase, Adenosine 5'-trifosfatase) do tubérculo *S. tuberosum* (Sigma, USA). Apirase é uma ATPase exógena ativada por Cálcio ou Magnésio que catalisa a hidrólise de ATP extracelular a AMP e fosfato inorgânico. No ensaio, células HepG2 foram incubadas com Apirase na dose de 10 unidades/ mL, solubilizada em meio com 1% de DMSO, na presença ou ausência de APAP 5 mM.

3.12. 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). Logo após sua chegada os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina, Brasil) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e

luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h). Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 051/11).

3.13. INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA E COLETA DE AMOSTRAS

Baseado nos trabalhos de Williams *et al*, 2010, Hu *et al*, 2010, Liu *et al*, 2004 e Imaeda *et al*, 2009, a dose padrão de APAP escolhida foi 500 mg/ kg, e o tempo de morte dos animais a 24^a hora após a administração do fármaco. O APAP foi administrado por via oral (gavagem) dissolvido em salina estéril aquecida, enquanto os animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Na 24^a hora, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (Agener União, Brasil) (80 mg/ kg) e xilazina (Agener União, Brasil) (15 mg/ kg) e submetidos a uma laparotomia seguida de 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.

3.14. QUANTIFICAÇÃO DE ALANINA AMINO TRANSFERASE

A alanina amino transferase, ou 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 utilizaremos o Kit Transaminase ALT cinético (Bioclin, Brasil), e, como amostras, os soros obtidos por centrifugação do sangue dos camundongos a serem 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 nucleótido de nicotinamida e

adenina reduzido (NADH), reduzindo-se a lactato e o NADH oxida-se a NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado). A velocidade de diminuição da concentração de NADH é proporcional a 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. Este é o método recomendado pela International Federation of Clinical Chemistry.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre dois grupos foi pelo teste T de Student. No caso de três ou mais grupos, o teste foi 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 foram aplicados. Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (epm). O nível de significância foi definido como $p \leq 0.05$. Os gráficos e análises estatísticas foram feitos com o auxílio do *software* GraphPad Prism 4.

4. RESULTADOS

4.1. INCUBAÇÃO COM APAP POR 24 HORAS PROMOVE PERDA DE ~50% DA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

Para padronização inicial, verificamos que o plaqueamento de células HepG2 a uma densidade de 10^5 células por poço (utilizando placa de 96 poços) é adequado. Posteriormente, o APAP foi adicionado em doses crescentes (1 a 100 mM) e as células incubadas por 24 horas para determinarmos a LD50. Verificamos que a perda de viabilidade celular (medida pelo ensaio de MTT) foi dose-dependente, sendo máxima (100%) em doses superiores a 50 mM (dados não demonstrados). Entretanto, a dose de 5 mM promoveu perda de viabilidade celular de cerca de 50% ($46,33 \pm 7,164\%$) em comparação com células não-tratadas, como demonstrado no Gráfico 1, sendo essa dose escolhida para os estudos posteriores. Foi realizada, então, a curva-tempo resposta para determinação do melhor tempo para coleta de dados, com análise da viabilidade de células tratadas ou não (controle) com APAP 5 mM nos tempos de 9, 6, 12 e 24 horas. Foi demonstrado que a viabilidade das células controle (não tratadas com APAP) não decaiu de forma significativa ao longo do tempo, como mostrado no Gráfico 2. Entretanto, as células tratadas com APAP apresentaram queda gradativa na viabilidade ($40,88 \pm 3,691\%$) no período de 24 horas. Dessa forma, foi determinado que, para os experimentos posteriores, seriam adotados a dose de APAP a 5mM e o tempo de 24 horas de tratamento com o fármaco.

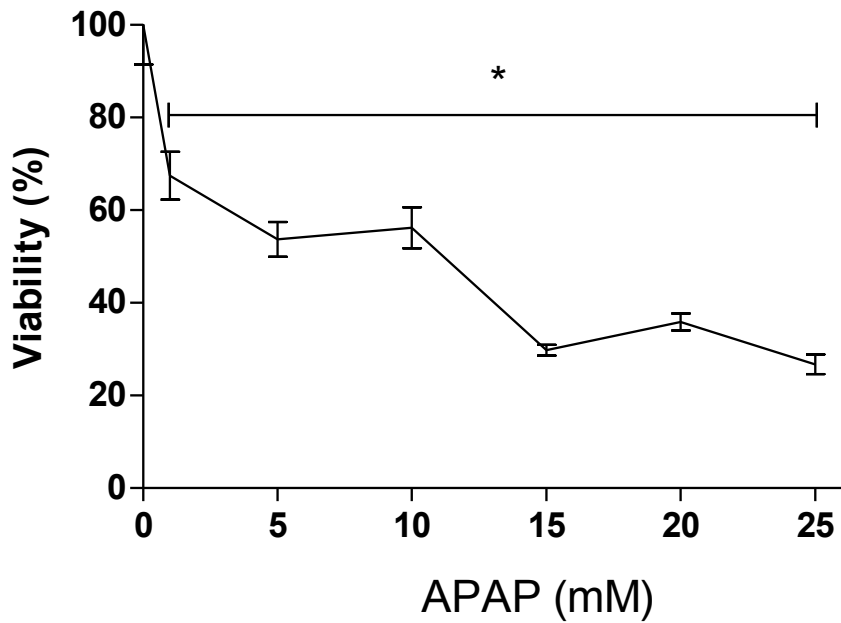


Gráfico 1 Curva dose-resposta de APAP. Células HepG2 foram incubadas a uma densidade de 10^5 células/ poço por 24. Foram utilizadas as doses de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 mM. Foi determinado, então, que a dose utilizada nos experimentos posteriores seria de 5 mM, tendo em vista que a mesma é compatível com a LD 50.

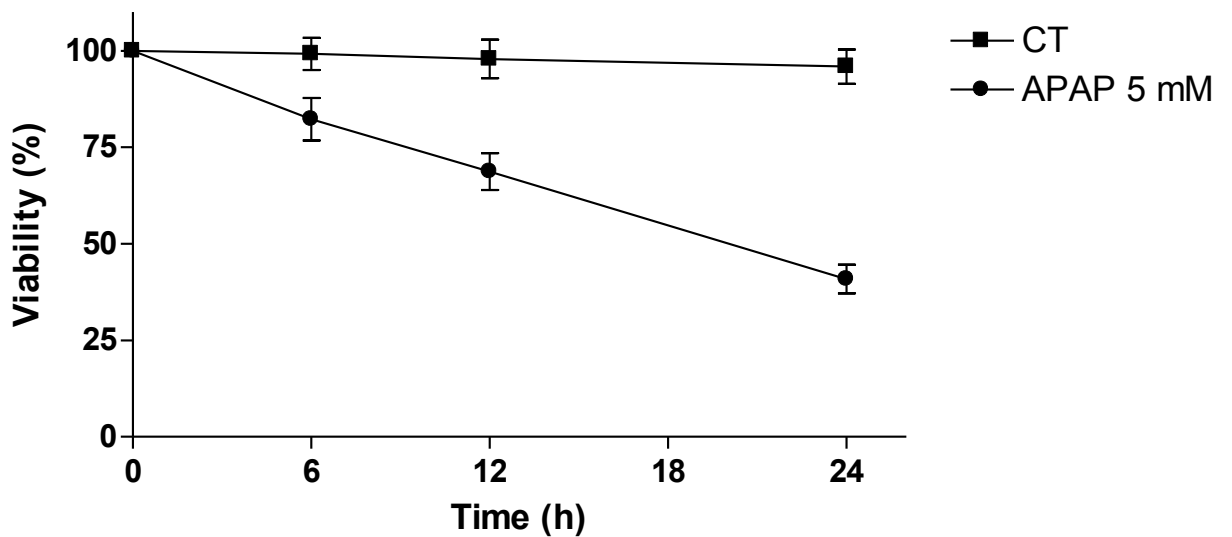


Gráfico 2 Curva tempo-resposta de APAP 5 mM. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço pelos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas. Foi determinado, então, o tempo de 24 horas de incubação para os experimentos posteriores, uma vez que o mesmo corresponde à LD 50.

4.2. NAC E DEXA REVERTEM PARCIALMENTE A MORTE CELULAR INDUZIDA POR APAP EM CÉLULAS HEPG2

Após a verificação das alterações promovidas pelo APAP com relação à viabilidade e proliferação celular, seguiu-se a investigação sobre a possibilidade de reverter as mesmas utilizando o tratamento-padrão para falência hepática aguda, NAC. Células HepG2 foram submetidas a pré-tratamento com NAC 2,5 mM, sendo o fármaco administrado 1 hora antes do tratamento com o APAP e mantido durante todo o período de incubação com o mesmo. De modo comparativo, foi empregado o anti-inflamatório-padrão dexametasona (DEXA) a 1 μ M, também utilizado como pré-tratamento iniciado 1 hora antes da administração de APAP. Os tratamentos empregados se mostraram efetivos em atenuar a perda de viabilidade induzida por APAP, havendo redução dos danos observados com APAP 5 mM ($38,37 \pm 3,787\%$, em comparação com o controle) em $27,12 \pm 2,681\%$, para NAC, e $10,68 \pm 2,682\%$ para DEXA ($p < 0,05$), como visualizado no Gráfico 3.

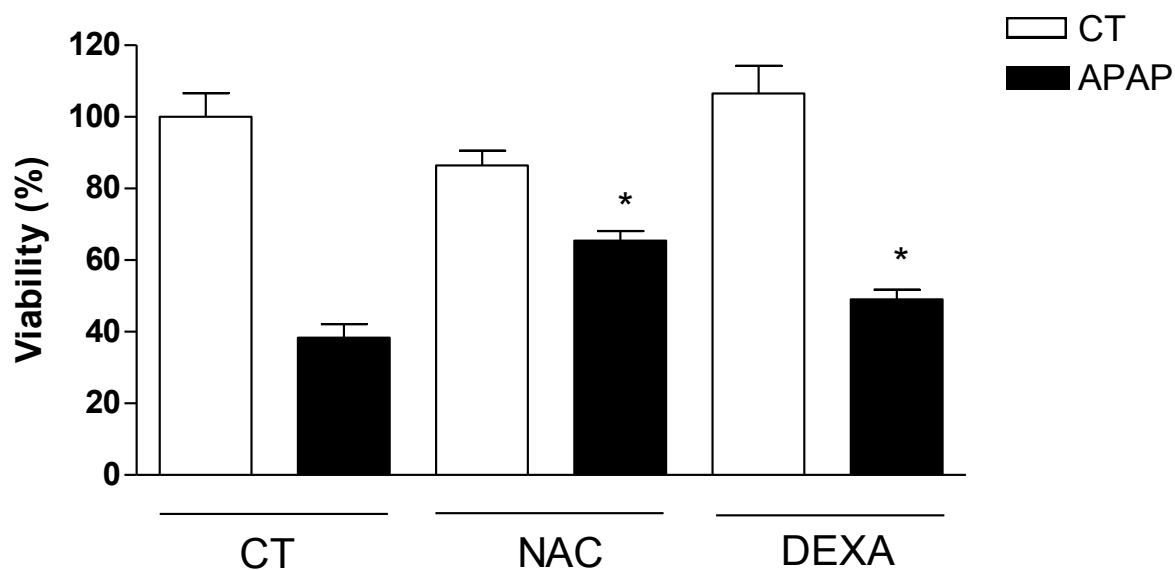


Gráfico 3 Pré-tratamento com NAC e DEXA reverte morte celular induzida por APAP.

Células HepG2 foram incubadas a uma densidade de 10^5 células/ poço com meio de cultura (CT), NAC 2,5 mM (NAC) ou DEXA 1 μ M (DEXA) como droga controle, em conjunto com APAP 5 mM (barras pretas) ou não (barras brancas). Os tratamentos empregados se mostraram efetivos em atenuar a perda de viabilidade induzida por APAP, havendo redução significativa da perda de viabilidade celular observada no tratamento com APAP 5 mM. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$, com relação ao controle tratado com APAP).

4.3.A INCUBAÇÃO COM APAP PROMOVE ALTERAÇÃO NO PERFIL DE INFLUXO DE CÁLCIO

Tendo em vista que a toxicidade provocada por overdose de APAP promove desbalanço de Ca^{2+} , investigamos se células HepG2 tratadas com o fármaco teriam alterações no perfil de influxo de Ca^{2+} de células controle. Para tanto, células da referida linhagem foram incubadas em placas de 6 poços sob lamínulas de 22 x 22 mm a uma densidade de 3×10^5 células por poço, submetidas ou não ao tratamento com APAP 5 mM por 24 horas. As análises do influxo de Ca^{2+} por microscopia confocal revelaram que células tratadas com APAP são mais hiper-responsíveis ao ATP, apresentando maior influxo de Ca^{2+} , mensurado pela maior intensidade de fluorescência alcançada, como observado na Figura 3. O tratamento com APAP induz alteração no perfil de influxo de Ca^{2+} , de modo que células tratadas apresentam perfil mais oscilatório, com picos mais elevados, demonstrando dificuldade no manejo dos estoques intracelulares (Gráfico 5b) em comparação com células não tratadas (Gráfico 5a). A comparação entre duas células representativas (Gráfico 5c), juntamente com a análise do tempo necessário para o início da resposta (Gráfico 4), demonstra que a resposta ao ATP tem início mais rápido em células expostas ao APAP (CT: $23,28 \pm 0,5952$ e APAP: $20,48 \pm 1,369$). Também observamos diferenças na amplitude de fluorescência alcançada com relação ao estado basal (APAP: $122,4 \pm 6,148$, Controle: $45,73 \pm 1,684$), demonstradas no Gráfico 6. A fluorescência foi calculada em termos do máximo dos valores médios em uma escala de cinza sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (APAP: $151,6 \pm 6,603$; Controle: $76,89 \pm 2,367$), como demonstrado no Gráfico 7.

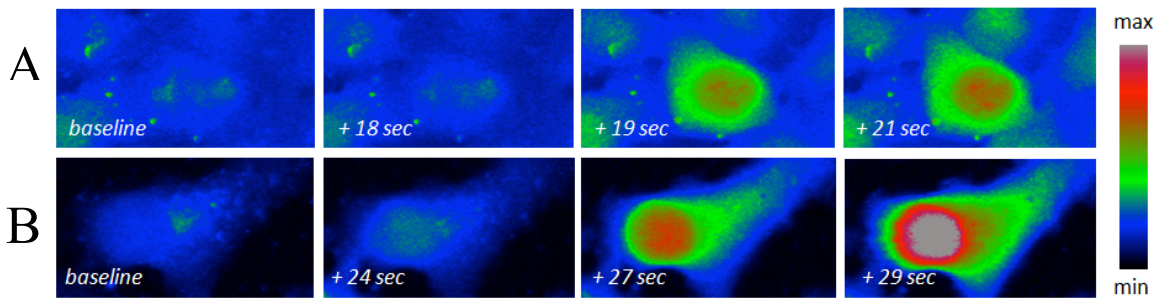


Figura 3 Influxo de Ca^{2+} diferencial entre células HepG2 tratadas ou não com APAP. Fluorescência observada após influxo de cálcio induzido pela administração de ATP 10 μM em células HepG2 a 3×10^5 células/ poço (placa de 6 poços) incubadas por 24 horas sem (A) ou com (B) APAP 5 mM. O influxo de Ca^{2+} nas células tratadas é maior, como observado pela maior intensidade de fluorescência final (B-4 e A-4, respectivamente).

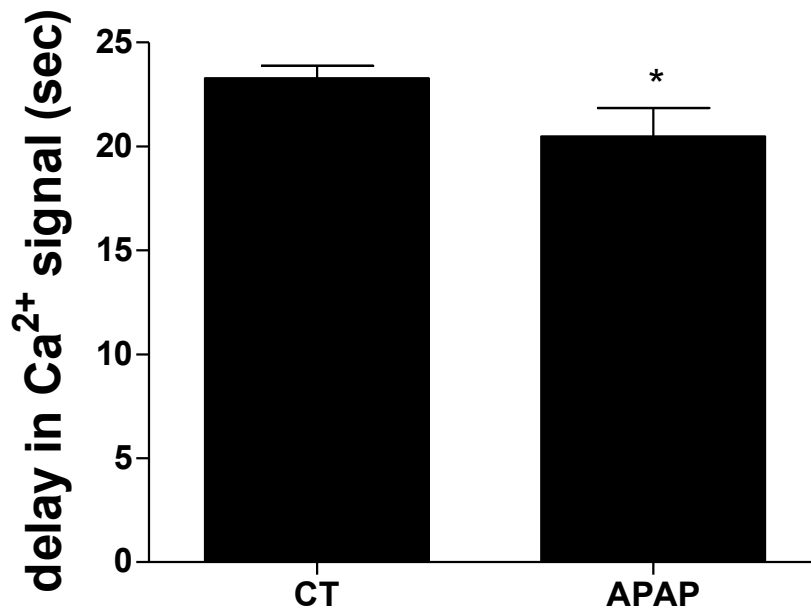


Gráfico 4 Tempo diferencial para o início do influxo de Ca^{2+} . Células HepG2 submetidas a incubação com APAP 5 mM por 24 horas iniciam a sinalização de Ca^{2+} induzida por ATP 10 μM mais rapidamente do que células não tratadas (n CT=90, n APAP=40). Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0005$)

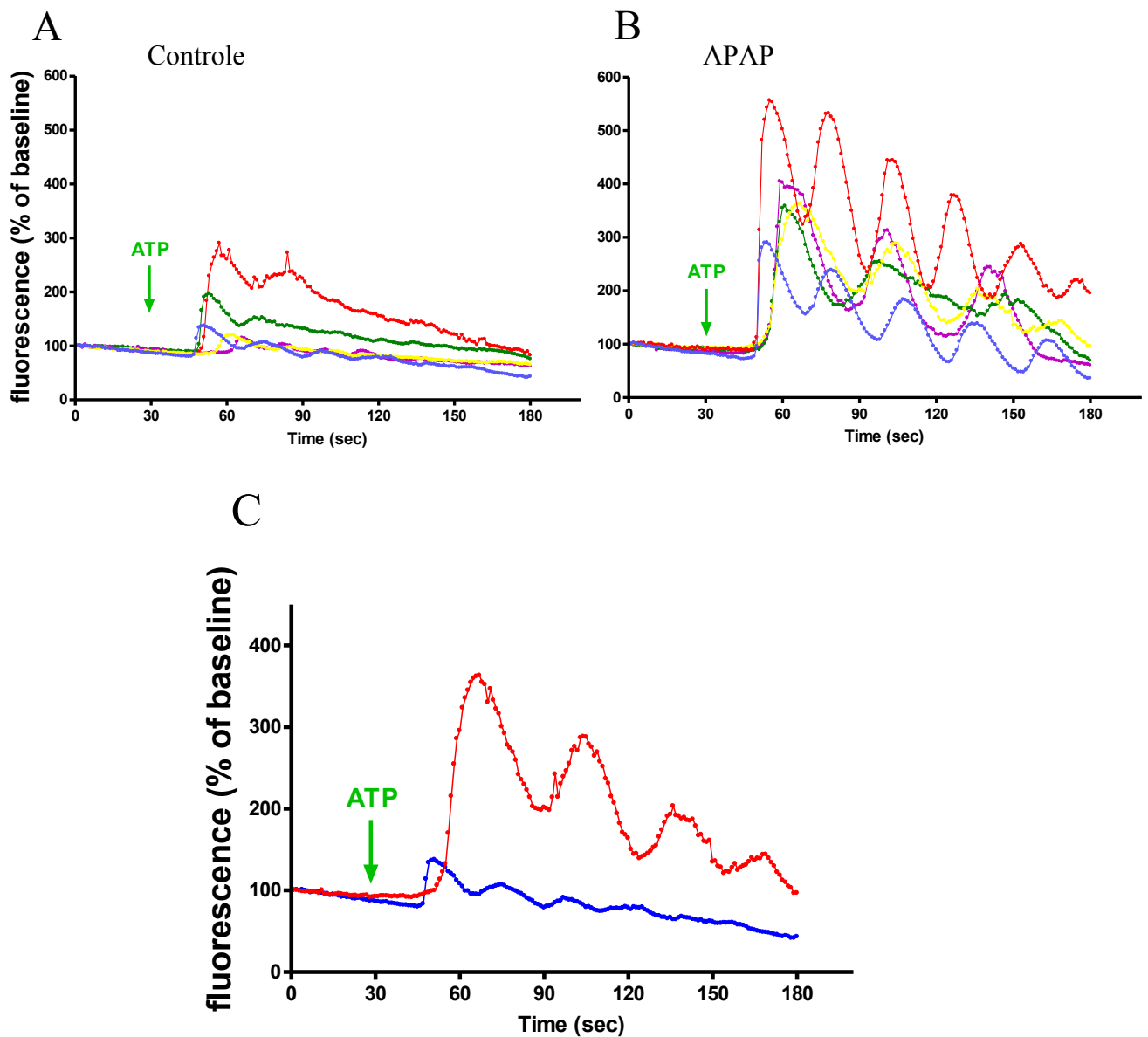


Gráfico 5 Perfil diferencial de influxo de Ca²⁺ mediante tratamento com APAP. Células HepG2 tratadas com 24 horas com APAP mM (B) apresentam alteração no perfil de influxo de Ca²⁺, que se torna mais oscilatório e com maiores picos. Células não tratadas (A) apresentam menores picos com relação ao estado basal. Em C, comparação do perfil de duas células representativas. Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0001$)

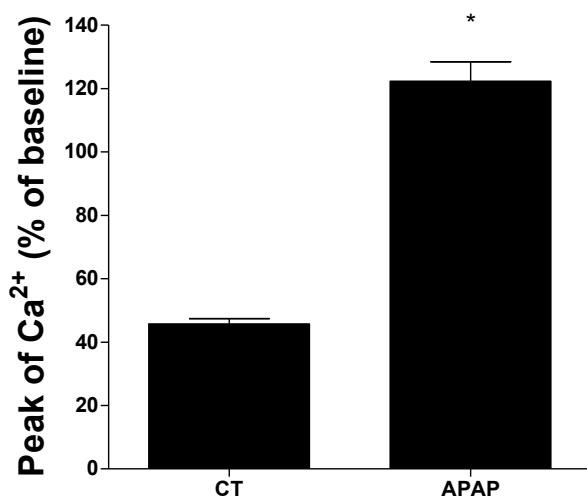


Gráfico 6 APAP induz maior amplitude de fluorescência. A incubação de células HepG2 com APAP 5 mM por 24 horas (n=58) promoveu alteração na amplitude de fluorescência com relação a células não tratadas (n=124). Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * (p<0,0001).

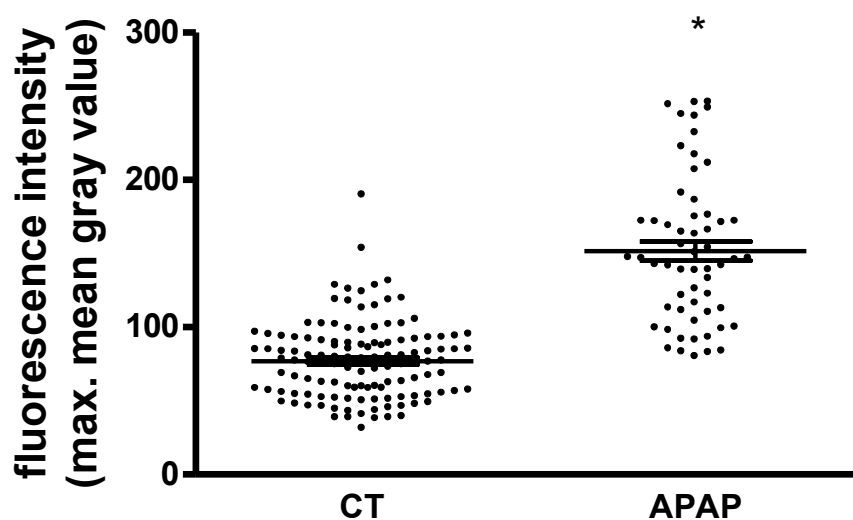


Gráfico 7 Valores máximos de fluorescência diferenciais. A incubação de células HepG2 com APAP 5 mM por 24 horas (n=58) promoveu alteração nos valores máximos de fluorescência com relação a células não tratadas (n=124). Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * (p<0,0001).

4.4.A INCUBAÇÃO COM APAP PROMOVE LIBERAÇÃO DE ATP

Tendo-se em vista a liberação de ATP por células necróticas e a atuação desta purina como um DAMP, verificamos se tal fenômeno seria observado em nosso modelo de morte celular estéril. Para tanto, realizamos a dosagem de ATP pelo método de emissão de luminescência no sobrenadante de células HepG2 incubadas com APAP 5 mM por 24 horas, comparando com células não submetidas ao referido tratamento (controle). Observamos que há uma redução crescente ao longo do tempo das concentrações de ATP de células controle, o que pode ser explicado pelos mecanismos de degradação natural de ATP por ectonucleotidases. Entretanto, a concentração de ATP no meio de células tratadas com APAP não decaiu da mesma maneira, mostrando-se significativamente maior do que a de células não incubadas com o paracetamol no tempo de 24 horas (APAP: $1,326 \pm 0,3674 \mu\text{M}$ e controle: $0,3314 \pm 0,2457 \mu\text{M}$, respectivamente), conforme demonstrado no Gráfico 8 e em maior detalhe em 8b. Esses dados sugerem que, embora haja degradação de ATP extracelular, há uma maior liberação desta purina no meio de células tratadas com APAP. Acreditamos que tal medida seja subestimada, tendo em vista a rápida degradação do ATP em meios de cultura que não possuam inibidores de ATPase.

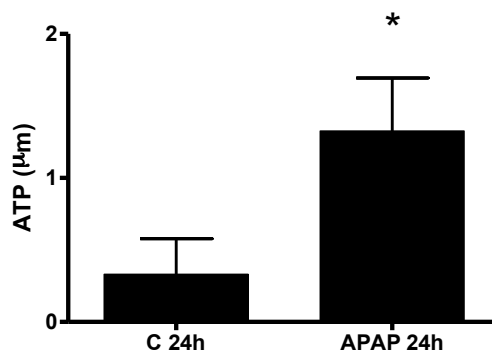
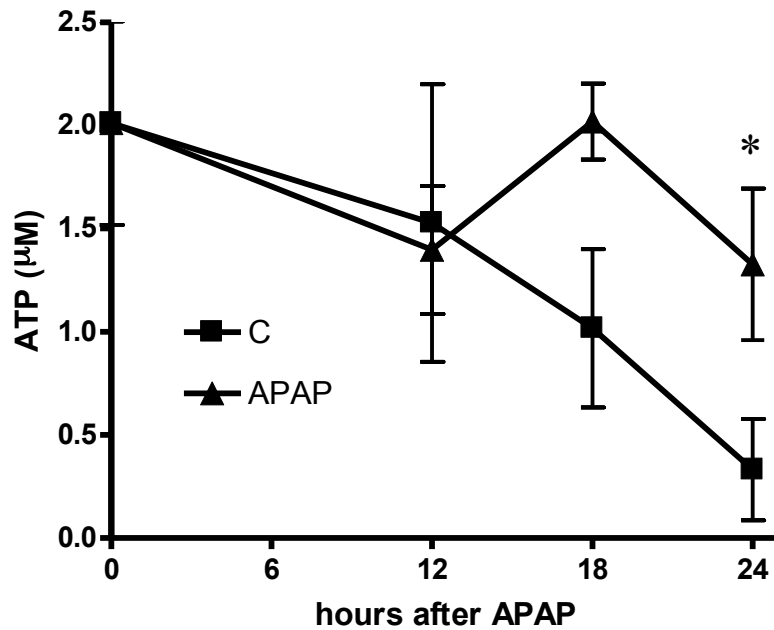


Gráfico 8 Liberação de ATP induzida pela incubação com APAP. Células HepG2 incubadas com APAP 5 mM (n=5 poços) apresentaram maior liberação de ATP em comparação com células controle (n=5 poços) (A). Em B, diferença na liberação observada no tempo de 24 horas de incubação. Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * (p<0,05)

4.5.A INCUBAÇÃO COM ATP PROMOVE PERDA NA VIABILIDADE CELULAR

Com base nos resultados obtidos no ensaio para dosagem de ATP no sobrenadante de células HepG2 incubadas com APAP, que demonstrou a liberação da purina quando do tratamento com o fármaco, quisemos determinar se a incubação com ATP promoveria alteração na viabilidade celular através de análise por MTT. Foi visto que a incubação com ATP, nas doses de 10, 50, 100 e 1000 μM promoveu redução significativa ($p < 0,01$) na viabilidade celular (10 μM : $28,47 \pm 3,183\%$; 50 μM : $22,68 \pm 4,688\%$; 100 μM : $32,09 \pm 3,962\%$; 1000 μM : $35,80 \pm 3,391\%$), como pode ser observado no Gráfico 9. A incubação com a dose de 1 μM , no entanto, não promoveu alteração na viabilidade das células.

Posteriormente, verificamos se a incubação conjunta da purina com APAP promoveria aumento na morte celular. Para tanto, foi escolhida a dose de ATP 10 μM , a menor dose utilizada no ensaio anterior capaz de promover perda de viabilidade. A incubação conjunta, no entanto, não promoveu alterações significativas na morte celular induzida por APAP ($p > 0,05$), conforme demonstrado no Gráfico 10, de modo que as células incubadas apenas com APAP 5 mM apresentaram viabilidade de $58,30 \pm 4,169\%$, enquanto as células incubadas com a combinação APAP 5 mM + ATP 10 μM apresentaram viabilidade de $53,21 \pm 3,070\%$ em comparação com células controle.

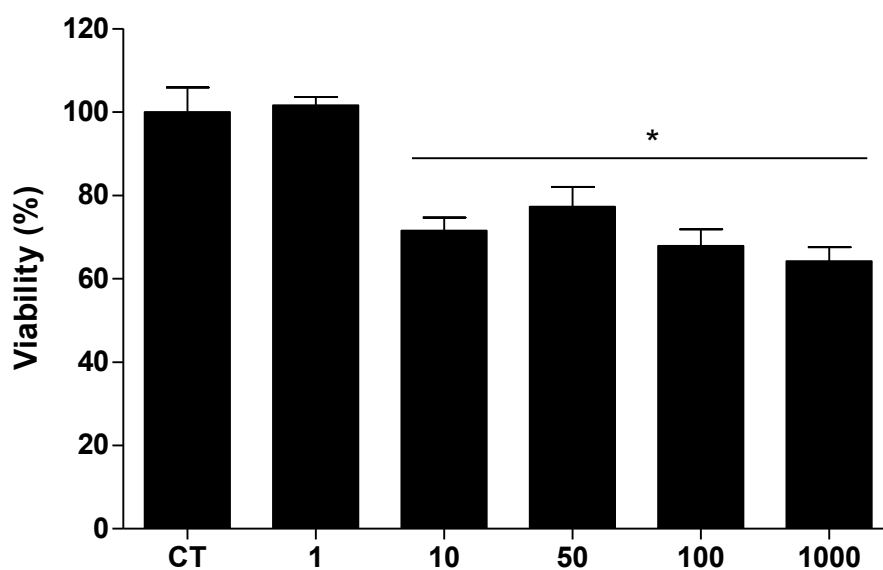


Gráfico 9 Curva dose-resposta de incubação com ATP. Células HepG2 foram incubadas a uma densidade de 10^5 células/ poço por 24 horas com as doses de 1, 10, 50, 100 e 1000 μM . Houve perda de viabilidade a partir da dose de 10 μM . Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$).

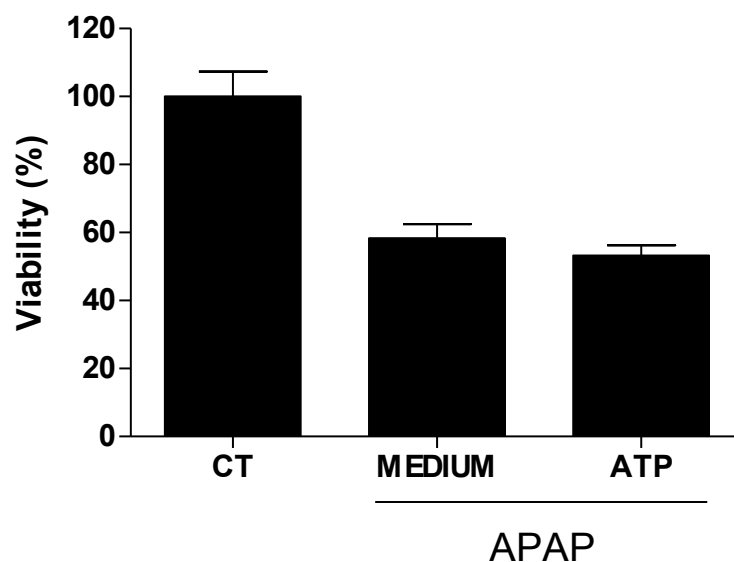


Gráfico 10 ATP não aumenta a perda de viabilidade induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a uma densidade de 10^5 células/ poço por 24 horas com APAP 5 mM (MEDIUM) com ou sem ATP 10 μM (ATP). A incubação com APAP acrescido de ATP não alterou a mortalidade induzida pelo fármaco de forma significativa. Os resultados foram expressos como média \pm EM

4.6.A INCUBAÇÃO COM ADP PROMOVE PERDA NA VIABILIDADE CELULAR

Uma vez que a incubação com ATP promoveu alterações na viabilidade celular, quisemos verificar se a incubação direta com um de seus metabólitos, o ADP, também seria capaz de induzir morte celular. Ambas as doses adotadas foram capazes de promover perda significativa na viabilidade celular ($p < 0,05$), de modo que as células HepG2 incubadas com ADP 1 μM apresentaram viabilidade de $77,54 \pm 2,809\%$ e com ADP 10 μM $76,42 \pm 3,057\%$ quando comparadas com células controle, como demonstrado no Gráfico 11.

Tendo por base os resultados anteriores, verificamos se a incubação conjunta com APAP 5 mM seria capaz de aumentar a lesão induzida pelo fármaco. Testamos a dose de 1 μM , a menor dose adotada no experimento anterior capaz de induzir morte. A incubação conjunta, no entanto, não alterou a perda de viabilidade induzida pelo APAP, como pode ser observado no Gráfico 12. As células incubadas apenas com o fármaco apresentaram viabilidade de $71,46 \pm 3,419\%$ contra $65,69 \pm 6,086\%$ na incubação conjunta de APAP com ADP, em comparação com células controle.

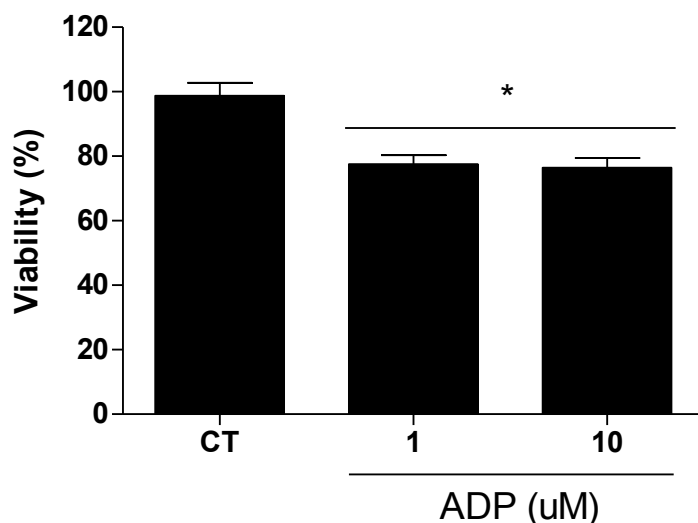


Gráfico 11 Curva dose-resposta de ADP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas com ADP nas doses de 1 e 10 μM . Houve perda de viabilidade para ambas as doses utilizadas. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$).

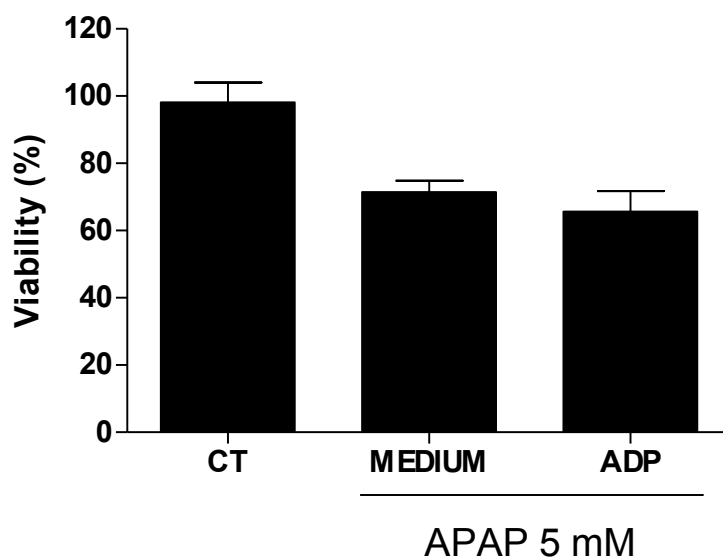


Gráfico 12 ADP não aumenta a morte celular induzida APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas com APAP 5 mM (MEDIUM) com ou sem ADP 1 μM . A incubação conjunta não elevou a perda de viabilidade celular mediada por APAP. Os resultados foram expressos como média \pm EM.

4.7.A INCUBAÇÃO COM ADENOSINA NÃO ALTERA A VIABILIDADE CELULAR

Com base nos resultados obtidos com os experimentos de incubação com as purinas ATP e ADP, investigamos os efeitos de um outro metabólito, a adenosina, sobre a viabilidade de células HepG2. Observamos que a adenosina não promoveu alterações significativas na viabilidade celular em nenhuma das doses adotadas, conforme demonstrado no Gráfico 13: 0,1 μM : $90,47 \pm 7,129\%$; 1 μM : $94,52 \pm 6,556\%$; 10 μM : $99,78 \pm 7,344\%$, em comparação com células controle.

Partindo dos achados do experimento anterior, verificamos se a incubação conjunta de APAP 5 mM com adenosina promoveria alterações na perda de viabilidade induzida pelo fármaco em células HepG2. Obtivemos como resultados a demonstração de que a adenosina 10 μM reverte a mortalidade induzida pelo APAP (APAP: $43,43 \pm 2,925\%$; Adenosina 10 μM + APAP 5 mM: $61,59 \pm 5,525\%$, em comparação com células controle), como pode ser visualizado no Gráfico 14. As demais doses (0,1 e 1 μM), no entanto, não apresentaram efeitos positivos com relação à lesão induzida por APAP.

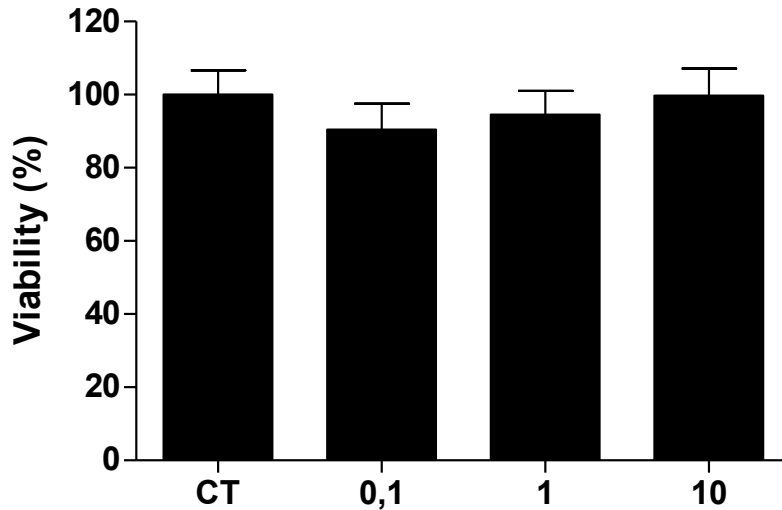


Gráfico 13 Curva dose-resposta de adenosina. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas com adenosina nas doses 0,1, 1 e 10 μM . A incubação com adenosina não alterou de modo significativo a viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média \pm EM.

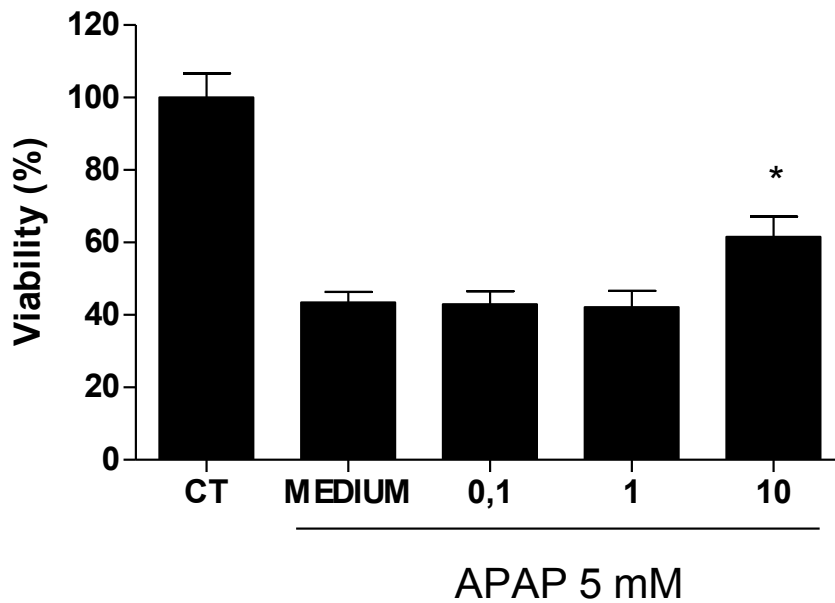


Gráfico 14 Adenosina reverteu parcialmente a perda de viabilidade induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células por poço por 24 horas e tratadas com APAP 5 mM (MEDIUM) com ou sem Adenosina nas doses 0,1, 1 e 10 μM . O tratamento com Adenosina 10 μM promoveu a diminuição da morte celular induzida por APAP. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,01$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.8.A INCUBAÇÃO COM APAP E ADENOSINA PROMOVE ALTERAÇÕES NA FASE DE CLICO CELULAR DE CÉLULAS HEPG2

Após a constatação da menor viabilidade celular mediante incubação com APAP, investigamos se o fármaco induziria alterações na fase de ciclo celular. Foram utilizadas células HepG2 incubadas por 24 horas em placas de 6 poços, a uma densidade de 3×10^5 células/ poço com uma solução de APAP 5 mM (no caso das células controle, a incubação foi realizada apenas com o meio), em um volume final de 2 ml por poço. As células foram descoladas e submetidas a coloração com iodeto de propídio (PI) para posterior análise por citometria de fluxo. Após a contagem de eventos, os dados foram plotados em histogramas, como pode ser observado no Gráfico 15. Observamos alterações na fase de ciclo induzidas pelo APAP, demonstradas no Gráfico 16, com maior permanência na fase estacionaria SubG1 em comparação com células controle, como demonstrado no Gráfico 17a (APAP: $19,81 \pm 1,60$, Controle: $5,45 \pm 0,51\%$). Entretanto, a incubação com APAP promoveu diminuição da fase mitótica G2/M em comparação com as células controle, conforme pode ser observado no Gráfico 17d (APAP: $11,21 \pm 3,7\%$, Controle: $25,77 \pm 1,0\%$). Os resultados indicam que o tratamento com APAP induziu morte celular e parou o ciclo em G1, sugerindo redução da proliferação celular.

Tendo em vista a reversão parcial promovida pela incubação com adenosina verificamos se esse nucleosídeo seria capaz de reverter as alterações na fase de ciclo induzidas pela incubação com APAP. Células HepG2 foram incubadas com soluções de adenosina 10 μ M ou APAP 5 mM e adenosina 10 μ M, sendo comparadas com células controle ou apenas incubadas com o APAP (volume final = 2 mL/ poço). A incubação apenas com adenosina não promoveu alterações na fase de ciclo em comparação com células controle. O tratamento conjunto com adenosina em células tratadas com APAP não proveu alterações na fase SubG1, como demonstrado no Gráfico 17a, quando comparado com células que foram incubadas somente com o paracetamol, o que indica que o tratamento com adenosina não promoveu redução da morte celular induzida pelo fármaco. Entretanto, observamos que o tratamento com adenosina em conjunto com a incubação

com APAP promoveu um aumento significativo em G2/M em comparação com as células incubadas somente com o fármaco, conforme pode ser visualizado no Gráfico 17d (APAP: $9,973 \pm 0,6189$; adenosina: $14,34 \pm 0,4838$). Tal alteração indica um aumento na proliferação celular.

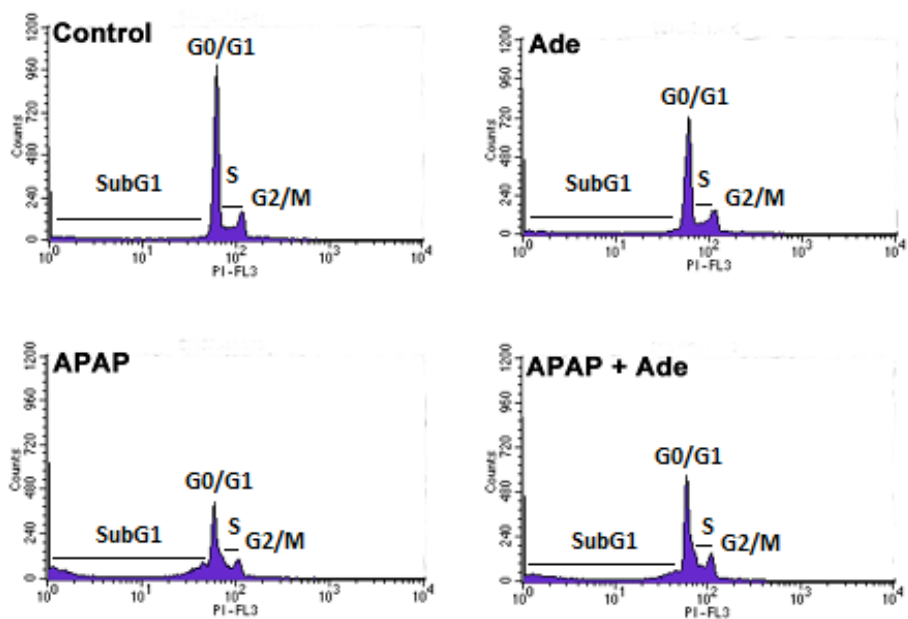


Gráfico 15 Alterações na fase de ciclo induzidas por incubação com APAP e tratamento com adenosina. Células HepG2 foram incubadas com meio (Control, n = 3) ou soluções de adenosina 10 μ M (Ade, n = 3), APAP 5 mM (APAP, n = 3) ou APAP 5 mM com adenosina 10 μ M (APAP + Ade, n = 3). A incubação com APAP promoveu aumento em SubG1 e redução em G2/M. A incubação com adenosina reverteu a diminuição em G2/M induzida pelo APAP.

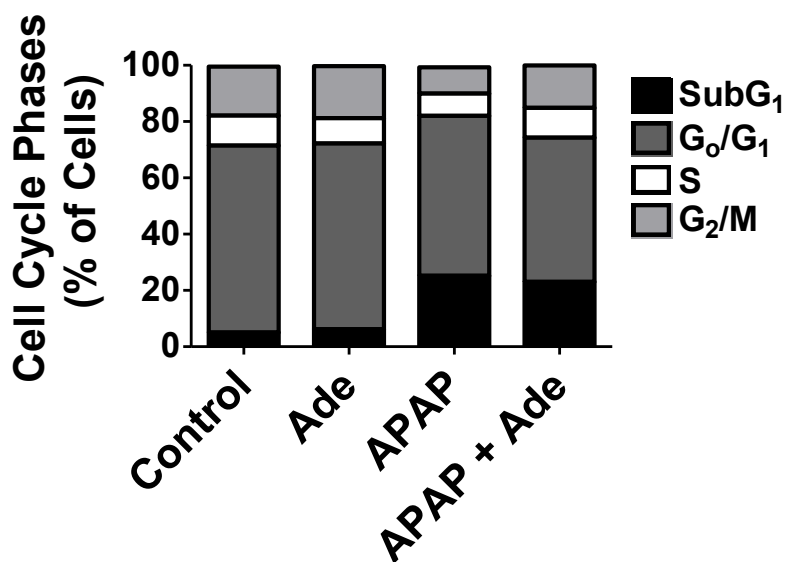


Gráfico 16 Alterações na fase de ciclo induzidas por incubação com APAP e tratamento com adenosina. Células HepG2 foram incubadas com meio (Control, n = 6) ou soluções de adenosina 10 μ M (Ade, n = 3), APAP 5 mM (APAP, n = 5) ou APAP 5 mM em conjunto com adenosina 10 μ M (APAP + Ade, n = 3). A incubação com APAP promoveu aumento na fase SubG1 e redução em G2/M. A incubação com adenosina reverteu a diminuição em G2/M induzida pelo paracetamol. Os resultados foram expressos como média \pm EM.

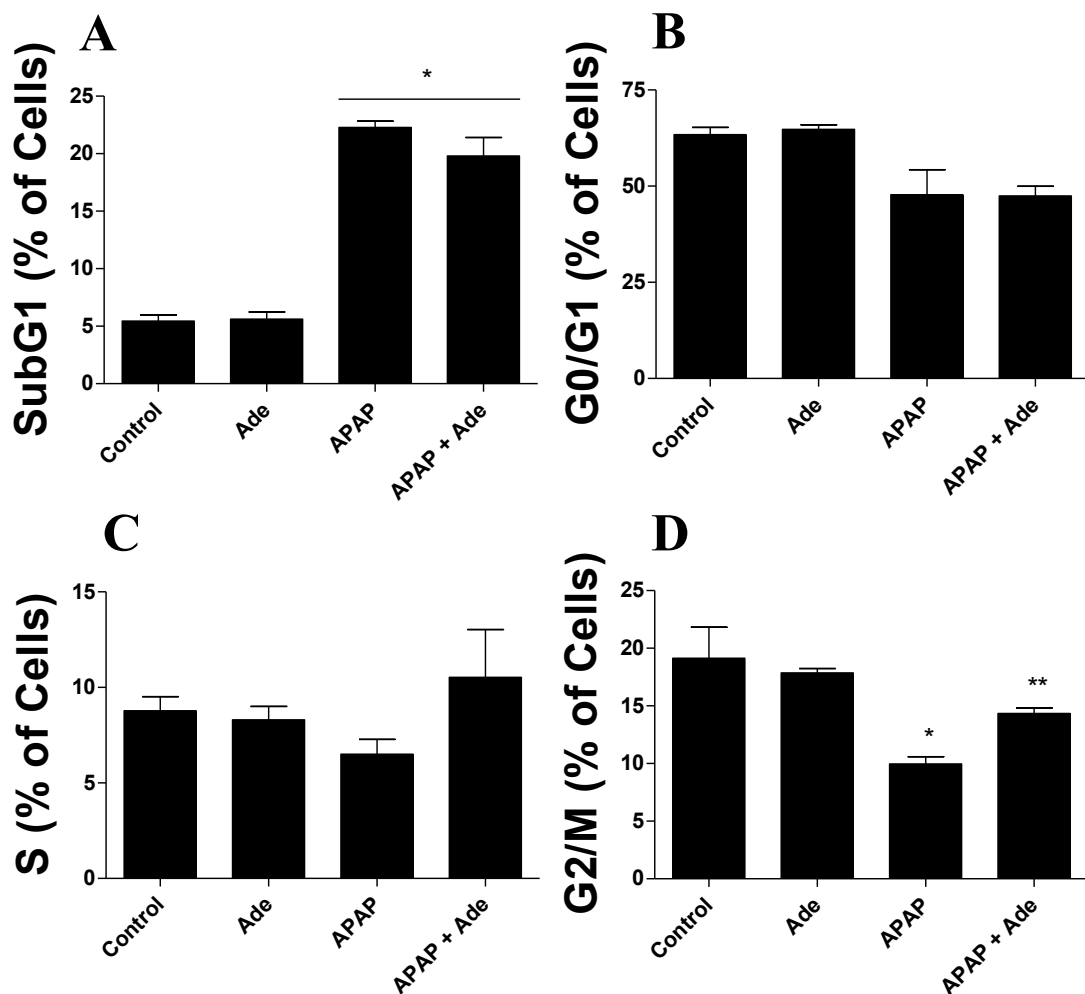


Gráfico 17 Adenosina reverte parcialmente alterações na fase de ciclo induzidas por APAP. Células HepG2 foram incubadas com meio (Control, n = 6) ou soluções de adenosina 10 μ M (Ade, n = 3), APAP 5 mM (APAP, n = 5) ou APAP 5 mM em conjunto com adenosina 10 μ M (APAP + Ade, n = 3). A incubação com APAP promoveu aumento na fase SubG1 (A) e redução em G2/M (D). A incubação com adenosina reverteu a diminuição em G2/M induzida pelo paracetamol (D). Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$, com relação ao seu controle, Control) e ** ($p < 0,05$, com relação ao seu controle, APAP).

4.9.A INCUBAÇÃO COM BAPTA-AM REDUZ A MORTALIDADE INDUZIDA POR APAP

Considerando o envolvimento da sinalização de Ca^{2+} na morte celular induzida por APAP, investigamos se o seqüestro de Ca^{2+} intracelular de células incubadas com o paracetamol poderia reverter a perda de viabilidade celular. Primeiramente, testamos diferentes doses de BAPTA-AM de modo a verificar quais doses seriam menos tóxicas para células HepG2 a nível de perda de viabilidade. Observamos que as doses de 1 e 10 nM seriam as mais adequadas (1 nM: $77,87 \pm 3,421\%$ e 10 nM: $92,60 \pm 2,764\%$, em comparação com células controle), como demonstrado no Gráfico 18.

As mesmas doses foram testadas em incubação conjunta com APAP 5 mM por 24 horas. Como resultado, verificamos que a dose de BAPTA-AM 1 nM reverteu de modo significativo a perda de viabilidade induzida pelo APAP ($14,03 \pm 3,421\%$), como pode ser observado no Gráfico 19. A dose de BAPTA 10 nM não se mostrou efetiva para o mesmo fim.

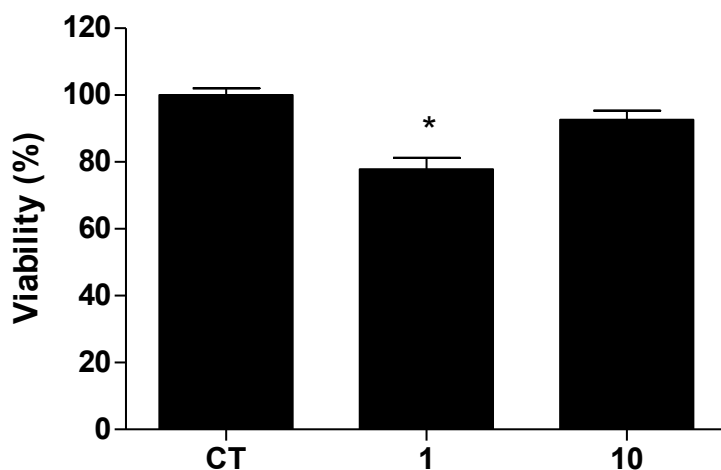


Gráfico 18 Curva dose-resposta de BAPTA-AM. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas e tratadas com BAPTA-AM nas doses 1 e 10 nM. O tratamento com BAPTA-AM 1 nM promoveu perda significativa na viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0001$, com relação ao seu controle, CT).

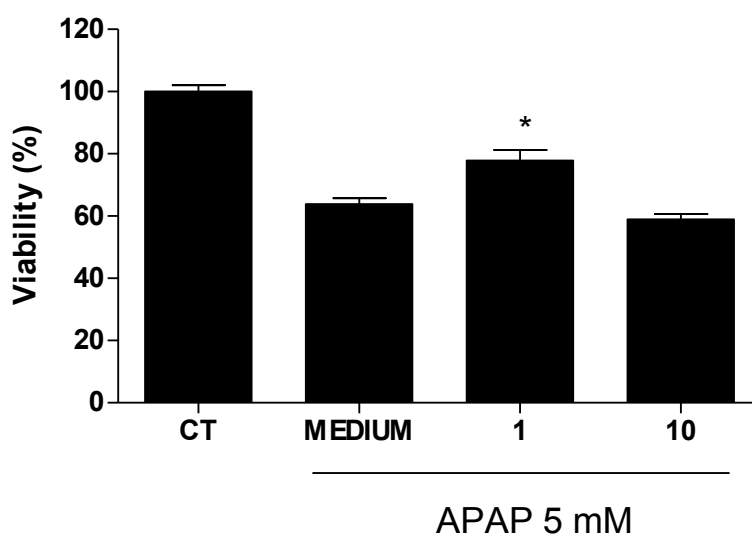


Gráfico 19 BAPTA-AM reverteu parcialmente a perda de viabilidade induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas e tratadas com APAP 5 mM (MEDIUM) com ou sem BAPTA-AM nas doses 1 e 10 nM. O tratamento com BAPTA-AM 1 nM promoveu a diminuição da morte celular induzida por APAP. Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$, com relação ao seu controle, MEDIUM)

4.10. A INCUBAÇÃO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS PROMOVE REDUÇÃO NA PERDA DE VIABILIDADE INDUZIDA POR APAP

Com base nos achados referentes à sinalização purinérgica na morte celular induzida por APAP, quisemos verificar a capacidade de diferentes antagonistas de receptores purinérgicos de reduzir os efeitos danosos do fármaco. Os bloqueadores foram primeiramente testados sozinhos para verificarmos se promoveriam alterações na viabilidade celular quando comparados com células HepG2 controle.

4.10.1. BLOQUEIO NÃO-SELETIVO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2

Como resultados, observamos que a incubação com suramina, um antagonista não-seletivo de receptores do tipo P2, nas doses 10 e 100 μM promoveu aumento significativo na viabilidade de células HepG2 ($139,1 \pm 8,200\%$ e $178,9 \pm 10,88\%$, respectivamente, em comparação com células controle), o que foi demonstrado no Gráfico 20. A dose de 1000 μM não promoveu alterações significativas. Das referidas doses, apenas a de 100 μM promoveu alterações na perda de viabilidade induzida por APAP 5 mM. As células incubadas apenas com APAP apresentaram viabilidade de $65,60 \pm 3,783\%$ enquanto as incubadas com a solução contendo o fármaco e suramina 100 μM apresentaram $90,62 \pm 5,986\%$, em comparação com células controle, como pode ser observado no Gráfico 21.

Bloqueio de receptores P2 (suramina)

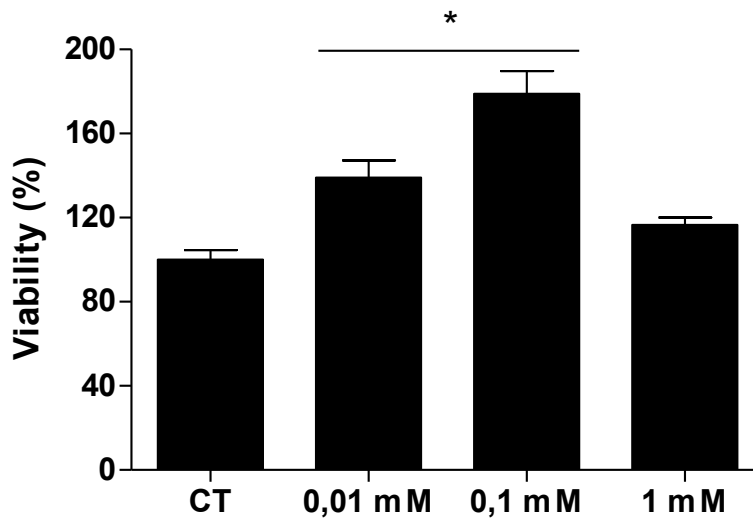


Gráfico 20 Curva dose-resposta de Suramina. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas e tratadas com Suramina nas doses 10, 100 e 1000 μ M. O tratamento com Suramina 10 e 100 μ M promoveu aumento significativo na viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,01$, com relação ao seu controle, CT).

Bloqueio de receptores P2 (suramina)

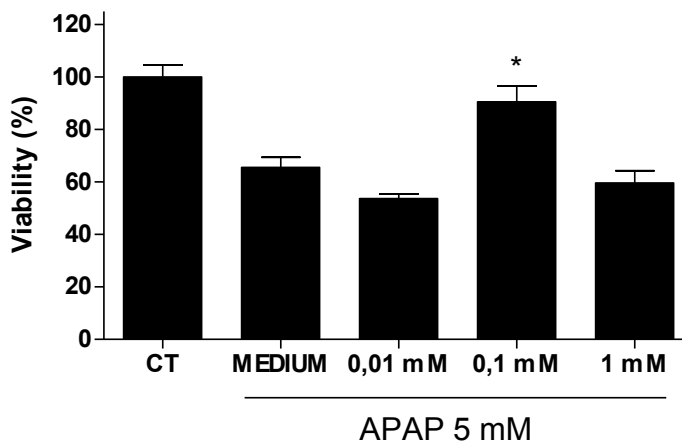


Gráfico 21 Suramina reduz a morte celular induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas com APAP 5 mM com ou sem Suramina nas doses 10, 100 e 1000 μ M. O tratamento com Suramina 100 μ M promoveu melhora significativa na perda de viabilidade celular induzida pelo fármaco. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0001$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.10.2. BLOQUEIO NÃO-SELETIVO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2 (PPADS)

Para confirmarmos a participação dos receptores purinérgicos do tipo P2, utilizamos outro antagonista não-seletivo, o PPADS, que possui espectro distinto da suramina (promove o bloqueio de receptores P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅, P2Y₁, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₃, o último, em altas concentrações). Nenhuma das doses utilizadas de PPADS alteraram a viabilidade de células HepG2 controle, como pode ser visualizado no Gráfico 22. Entretanto, em incubação conjunta com APAP, as doses 10 e 100 µM reverteram parcialmente a perda de viabilidade induzida pelo fármaco (perda de 50,97 ± 2,917% em comparação com células controle) em 9,974 ± 2,642% e 14,61 ± 2,140%, respectivamente, como demonstrado no Gráfico 23.

Bloqueio de receptores P2 (PPADS)

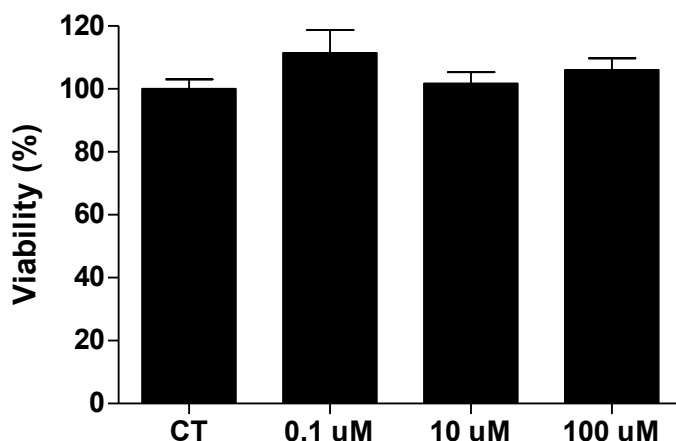


Gráfico 22 Curva dose-resposta de PPADS. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas e tratadas com PPADS nas doses 0,1, 10 e 100 μM . O tratamento com nenhuma das doses de PPADS promoveu aumento significativo na viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média \pm EM.

Bloqueio de receptores P2 (PPADS)

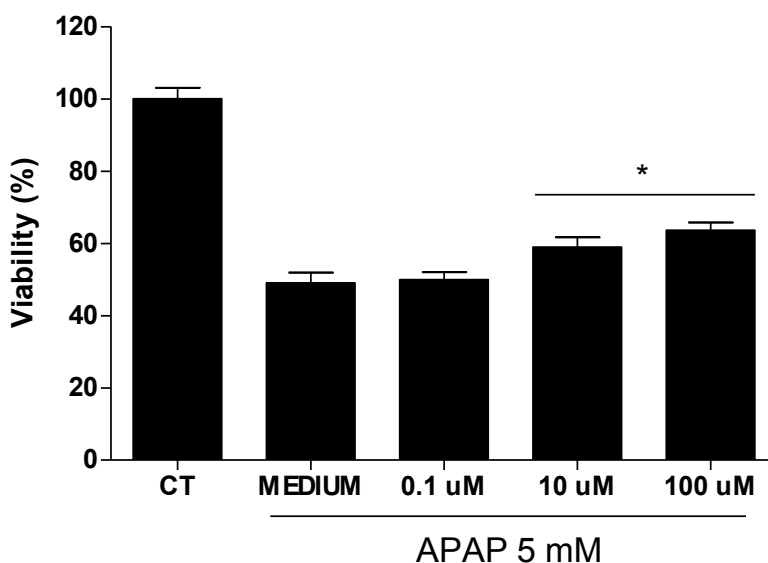


Gráfico 23 PPADS reduz a morte celular induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/ poço por 24 horas com APAP 5 mM com ou sem PPADS nas doses 0,1, 10 e 100 μM . O tratamento com PPADS 10 e 100 μM promoveu melhora significativa na perda de viabilidade celular induzida pelo fármaco. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0001$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.10.3. BLOQUEIO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2X (TNP-ATP)

Uma vez estabelecido o efeito do bloqueio de receptores P2, estudamos um bloqueador específico dos motivos P2X (P2X₁, P2X₃ e P2X_{2/3}), o TNP-ATP. A incubação com TNP-ATP 100 µM promoveu elevação de 72,12 ± 11,88% na viabilidade de células controle, como demonstrado no Gráfico 24. Na incubação em conjunto com APAP, as doses 10 e 100 µM mostraram-se capazes de reverter significativamente a perda de viabilidade induzida pelo fármaco, de modo que as células incubadas com essas doses apresentaram viabilidade de 71,31 ± 4,674% e 69,88 ± 2,304%, respectivamente, com elevações de 19,03 e 17,60% na viabilidade de células tratadas com APAP 5 mM (52,28 ± 3,642%), como poder observado no Gráfico 25.

Bloqueio de receptores P2X (TNP-ATP)

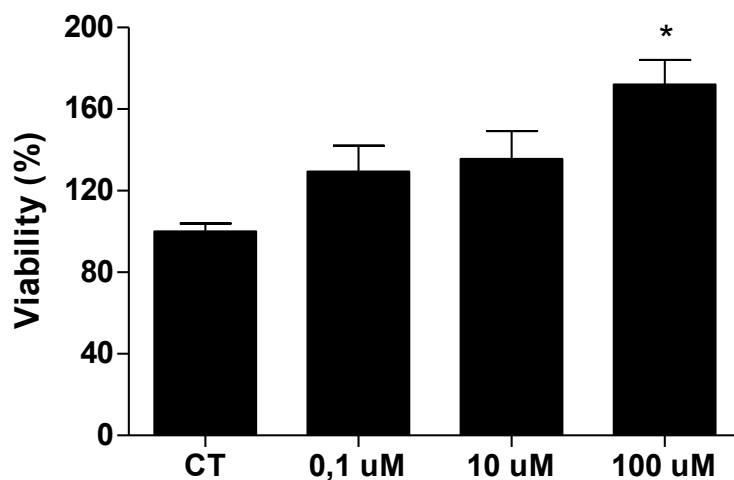


Gráfico 24 Curva dose-resposta de TNP-ATP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas e tratadas com TNP-ATP nas doses 0,1, 10 e 100 μ M. O tratamento com TNP-ATP 100 μ M promoveu aumento significativo na viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,005$, com relação ao seu controle, CT).

Bloqueio de receptores P2X (TNP-ATP)

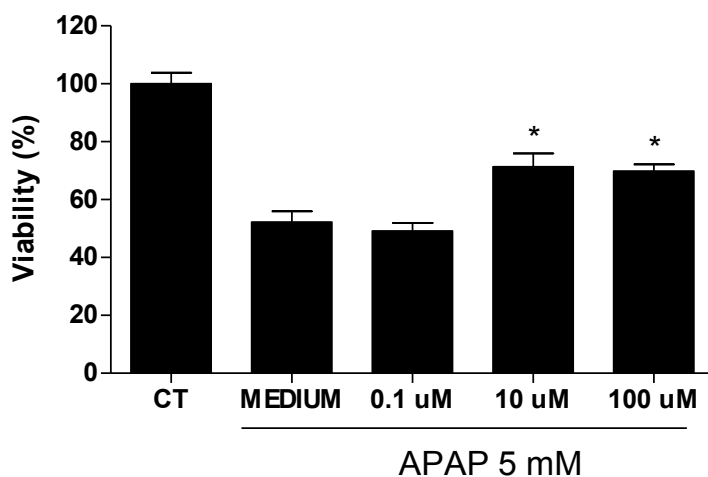


Gráfico 25 TNP-ATP reduz a morte celular induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas com APAP 5 mM com ou sem TNP-ATP nas doses 0,1, 10 e 100 μ M. O tratamento com TNP-ATP 10 e 100 μ M promoveu melhora significativa na perda de viabilidade celular induzida pelo fármaco. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,0001$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.10.4. BLOQUEIO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DO TIPO P2X7

O efeito do ATP sobre receptores P2X₇ é amplamente descrito como um importante ativador da resposta imune. Verificamos, entretanto, que o bloqueio destes receptores com o antagonista específico OxiATP não promoveu alterações significativas na viabilidade de células HepG2, como pode ser visualizado no Gráfico 26. De forma similar, a incubação com as doses adotadas do bloqueador não promoveram melhora no quadro de perda de viabilidade induzida por APAP; pelo contrário, a dose de 300 µM promoveu redução em 17,62% na viabilidade de células incubadas com APAP (APAP: 52,35 ± 2,988%, oxi-ATP 300 µM: 34,73 ± 2,295), conforme demonstrado no Gráfico 27.

Bloqueio de receptores P₂X₇ (oxiATP)

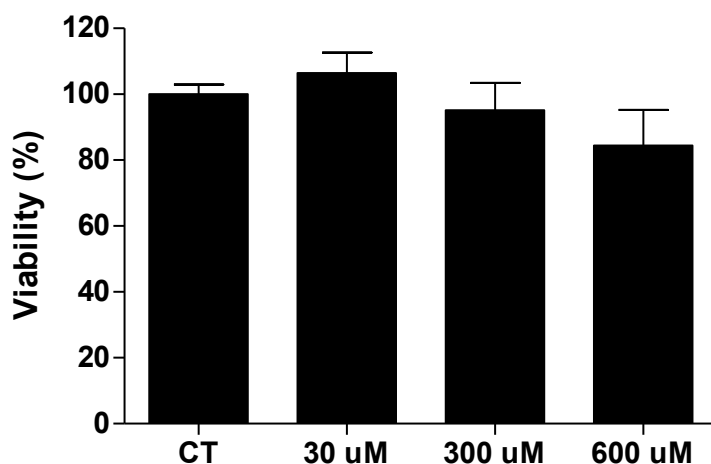


Gráfico 26 Curva dose-resposta de OxiATP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas e tratadas com OxiATP nas doses 30, 300 e 600 μ M. O tratamento com nenhuma das doses de OxiATP promoveu aumento significativo na viabilidade celular. Os resultados foram expressos como média \pm EM.

Bloqueio de receptores P₂X₇ (oxiATP)

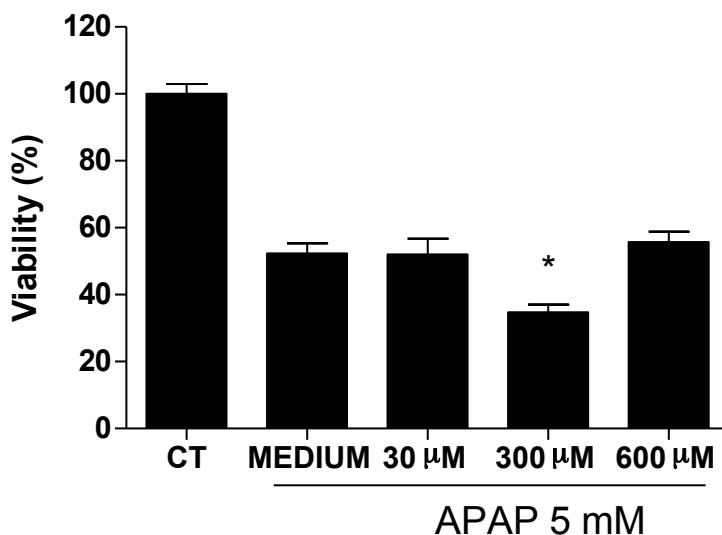


Gráfico 27 OxiATP não reduz a morte celular induzida por APAP. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço por 24 horas com APAP 5 mM com ou sem oxiATP nas doses 30, 300 e 600 μ M. Nenhuma das doses utilizadas de promoveu melhora significativa na perda de viabilidade celular induzida pelo fármaco. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.11. A INCUBAÇÃO COM UMA ATPASE (APIRASE) REDUZ A MORTALIDADE INDUZIDA POR APAP

Considerando os dados que apontam que o ATP extracelular pode ser um fator parácrino de reverberação de morte celular, e que a incubação com paracetamol promove a liberação desse nucleotídeo, investigamos se a destruição do ATP no meio de cultura de células incubadas com APAP reverteria a toxicidade celular. Primeiramente, verificamos que a incubação com apirase não alterou a viabilidade de células controle. Observamos, então, que o tratamento com apirase reverteu parcialmente a perda de viabilidade induzida por APAP 5 mM (viabilidade de $56,93 \pm 2,074\%$, em comparação com células controle) em $20,34 \pm 6,588\%$, conforme demonstrado no Gráfico 28.

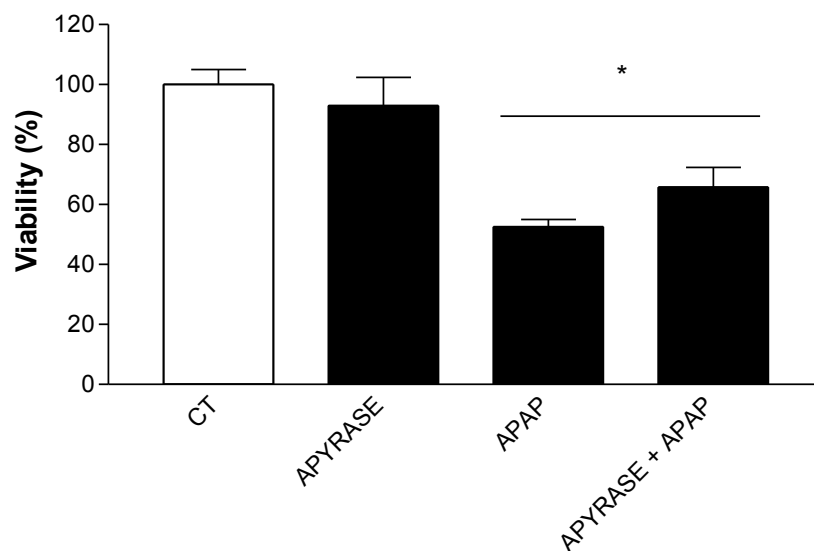


Gráfico 28 Apirase reverte a morte celular induzida por APAP. Células HepG2 a 10^5 células/poço incubadas com APAP 5 mM por 24 horas com ou sem Apirase 10 u/ mL. Foi observado aumento de 27,16% na viabilidade das células incubadas com APAP e tratadas com Apirase. Os resultados foram expressos como média \pm EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,01$, com relação ao seu controle, MEDIUM).

4.12. O METABOLISMO DE ATP EXTRACELULAR IN VIVO REVERTE PARCIALMENTE A LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR APAP

Tendo por base os indicativos que o ATP extracelular é um importante mediador da hepatotoxicidade induzida por APAP, utilizamos um modelo *in vivo* de falência hepática aguda induzida por sobredose de paracetamol. Neste modelo, há um aumento significativo na atividade sérica de enzimas hepáticas, como ALT. Verificamos, então, se a apirase seria capaz de promover alterações significativas na lesão hepática induzida por APAP através da dosagem de ALT. Camundongos C57/Bl6 receberam uma solução de APAP de 500 mg/ Kg ou apenas o veículo (salina) por gavagem e foram mortos após 24 horas para a coleta de amostras e análise de dados. A apirase impediu parcialmente a lesão hepática induzida por paracetamol. Conforme demonstrado no Gráfico 29, animais tratados com apirase tiveram redução significativa nos níveis séricos de ALT em 35% (níveis séricos de ALT em U/L de APAP: $4710 \pm 639,7$; apirase: $3033 \pm 783,6$).

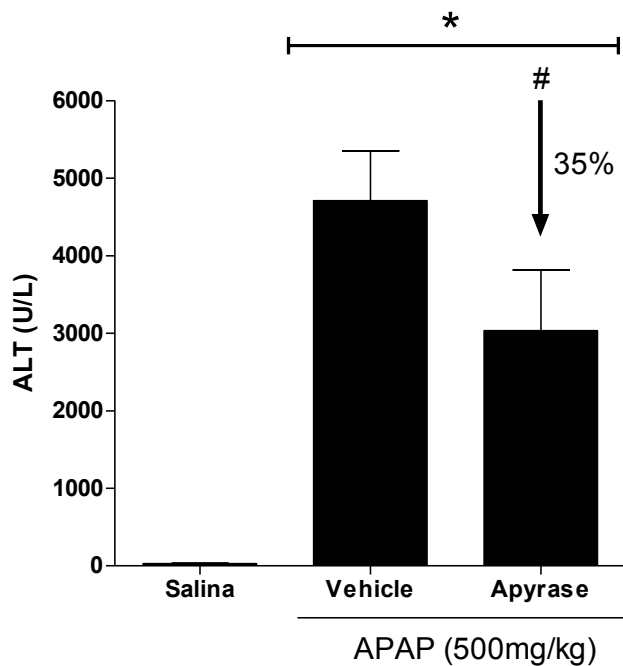


Gráfico 29 Apyrase reverte lesão provocada por APAP in vivo. Camundongos C57/Black6 foram gavados com salina (Salina, n=20) ou APAP 500 mg/Kg (Vehicle, n=8) e tratados (Apyrase, n=3) ou não com Apyrase. Observamos diminuição significativa nos níveis séricos de ALT mediante tratamento com Apyrase. Os resultados foram expressos como média±EM. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,01$, com relação ao seu controle, Vehicle).

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, demonstramos que a incubação com APAP leva diretamente, de forma tempo e dose-dependente, à perda de viabilidade de células HepG2, uma linhagem de hepatocarcinoma humano. Promove ainda a liberação de ATP para o meio extracelular, o que demonstramos ser um fator reverberador de morte celular.

A morte celular induzida por overdose de APAP é resultado, em parte, da produção excessiva do metabólito tóxico NAPQI, com o excedente não-passível de conjugação com glutathione. O fármaco NAC é utilizado na clínica como antídoto-padrão para a FHA induzida por APAP (Peterson & Rumack 1977; Piperno & Berssenbruegge, 1976; Prescott *et al*, 1977), mostrando-se um tratamento eficaz quando obedecidos os critérios necessários, como tempo máximo para emprego do mesmo. Em nossos estudos, a administração de NAC a uma cultura a ser tratada por APAP reduziu parcialmente a perda da viabilidade celular induzida pelo fármaco. Nossos resultados vão de acordo com dados publicados por Neuwelt e colaboradores (2009), nos quais foi demonstrado que o emprego de NAC em células HepG2 tratadas com APAP 5 mM promoveu elevação dos níveis de GSH e da viabilidade celular, ambos reduzidos pela incubação com APAP. Entretanto, foi demonstrado por Yang e colaboradores (2009) que o tratamento prolongado com NAC é deletério, promovendo elevação nos níveis séricos de ALT e AST de camundongos tratados com APAP, além de vacuolização de hepatócitos. Tais alterações culminaram com maior demora para a regeneração de hepatócitos e, conseqüentemente, recuperação hepática. Dessa forma, além de releituras de dosagem e tempo de tratamento para NAC, como sugerido Yang e colaboradores (2009), faz-se necessária a busca por tratamentos complementares ou alternativos que, por sua vez, requer maior pesquisa no âmbito dos mecanismos envolvidos no processo.

A overdose por APAP promove elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} por mecanismos que envolvem disfunção mitocondrial, levando a dificuldades no manejo dos estoques intracelulares, e liberação de ATP para o meio extracelular. Como observado em nosso trabalho, a overdose por APAP

promove alteração no influxo de Ca^{2+} , com um perfil de influxo mais rápido e duradouro que tem por característica maior oscilação e picos, indicando tanto maior aporte do íon, quanto dificuldade em seu manejo internamente. Tais alterações levam ao acúmulo intracelular de Ca^{2+} , o que sinaliza para, dentre outras alterações, a morte celular. A utilização do quelante intracelular BAPTA-AM mostrou-se, nesse ponto, efetiva na redução da perda de viabilidade induzida por APAP. Entretanto, apenas a dose que se mostrou mais tóxica quando utilizada isoladamente foi capaz de reverter a morte mediada por overdose de APAP. Isso pode ser devido ao fato de que, de maneira isolada, a dose utilizada tenha diminuído os estoques de cálcio abaixo dos níveis necessários para a manutenção do metabolismo normal das células, levando à perda de viabilidade. No entanto, em um contexto de incubação com paracetamol, no qual há elevação dos níveis intracelulares de cálcio por alterações tanto nos mecanismos de entrada quanto de manejo interno desse íon, a dose em questão mostrou-se efetiva, reduzindo os níveis internos de Ca^{2+} a valores mais próximos da condição basal. Tendo em vista que elevações no nível intracelular de Ca^{2+} promovem transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), com formação de poros na membrana mitocondrial interna, elevando a citotoxicidade induzida por APAP (Corcoran *et al.* 1987; Nicotera *et al.* 1989; Tirmenstein & Nelson 1989; Tsokos, 1989), acreditamos que a diminuição nos estoques intracelulares de Ca^{2+} possa ter levado à menor indução de MPT e formação de canais na membrana externa mitocondrial e, conseqüentemente, à menor morte celular tanto por necrose quanto por apoptose.

Nucleotídeos extracelulares, como ATP ou UPT (ou ADP após conversão a ATP), promovem alterações na concentração citosólica de Ca^{2+} intracelular (Dixon, 2000; Dixon *et al.*, 2003; Capiod, 1998; Glavy *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, observamos que a overdose por APAP promove a liberação de ATP em células HepG2 incubadas com o fármaco por 24 horas. Vimos também que a incubação com as purinas ATP e ADP induz a maior perda de viabilidade em células HepG2. O bloqueio de receptores purinérgicos utilizando diferentes antagonistas promoveu redução na morte celular induzida por APAP, verificada por ensaio de viabilidade celular com MTT. O emprego dos antagonistas de

receptores do tipo P2 não-seletivos suramina e PPADS, bem como do bloqueador P2X-específico TNP-ATP mostrou-se eficaz para tal fim. Entretanto, verificamos, que o bloqueio do receptor P2X₇ com o antagonista seletivo oxiatp não promoveu alterações na citotoxicidade mediada por sobredose de paracetamol. Tais dados sugerem fortemente o envolvimento de receptores do tipo P2, mais especificamente P2X, no processo de morte celular induzida pelo fármaco, de um modo independente de receptores P2X₇. Pretendemos, em nossos próximos experimentos, verificar se o bloqueio de receptores P2Y com o antagonista P2Y-seletivo Reactive Blue-2 promove alterações na perda de viabilidade celular observada após incubação com APAP.

De maneira interessante, a destruição do ATP extracelular por uma ectonucleotidase sintética (apirase) promoveu redução significativa na perda de viabilidade celular induzida por APAP em células da linhagem HepG2. De modo semelhante, o emprego desta ATPase em um modelo de falência hepática aguda mediada por sobredose de paracetamol promoveu redução dos níveis séricos de ALT, indicando redução na lesão hepática. A apirase atua clivando o ATP extra-celular a ADP e AMP. Subseqüentemente, uma ectonucleotidase (CD73) catalisa a geração de adenosina a partir do AMP. Os benefícios observados pela elevação de adenosina extra-celular devem-se não somente anular os efeitos de receptores P2, mas também ativar receptores do tipo P1, que possuem efeitos diversos comparados àqueles mediados por receptores do tipo P2 (Beldi *et al*, 2010). De forma similar, observamos elevação na viabilidade celular em células HepG2 incubadas com APAP tratadas com adenosina, reiterando sua capacidade de reverter parcialmente a lesão induzida pelo fármaco.

O efeito citotóxico do paracetamol pode ser ainda explicado pelas alterações promovidas nas fases do ciclo celular, aumentando a proporção de células estacionadas em SubG1 (consideradas como em processo de morte celular), e diminuindo a razão de células em G2/M, fase essa de proliferação. Verificamos que o tratamento com adenosina não reduz o número de células em SubG1, mas restaura parcialmente a razão de células encontradas na fase G2/M em um estado basal. Tais achados, acrescidos do conhecimento de que esse nucleosídeo tem papel na migração e proliferação de células endoteliais

(Meininger *et al*, 1988) no processo de cicatrização de feridas, sugerem que mais estudos devem ser realizados *in vivo*, com a administração de adenosina ou de agonistas de receptores do tipo P1 para verificar se tais vias podem atuar na proliferação de hepatócitos, auxiliando no processo de regeneração hepática. Pretendemos verificar, ainda, se o emprego de adenosina promove alterações no perfil de influxo de cálcio em células tratadas com APAP.

Em suma, o presente trabalho demonstrou que o bloqueio das sinalizações de Ca^{2+} e purinérgica por receptores da família P2 é benéfico em atenuar os efeitos deletérios induzidos pela overdose de APAP. A ativação da sinalização purinérgica por receptores P1, por sua vez, tem efeito oposto à desencadeada pelas purinas ATP e ADP, promovendo redução na perda de viabilidade celular induzida pelo fármaco. Tais achados sugerem que estratégias farmacológicas direcionadas ao bloqueio da sinalização purinérgica via receptores para ATP, bem como o restabelecimento dos níveis fisiológicos intracelulares de cálcio, mostram-se promissoras no desenvolvimento de terapias alternativas à FHA.

6. CONCLUSÕES

Nossos dados nos permitem concluir que a toxicidade induzida por sobredose de paracetamol é, em parte, devida a uma desregulação nos níveis extracelulares de cálcio. Ainda, a liberação parácrina de ATP é capaz de deflagrar ondas de cálcio em células HepG2 que, no contexto da citotoxicidade mediada por APAP, pode amplificar a lesão total. Por fim, o manejo dos níveis de cálcio intracelular, bem como dos níveis de purinas extracelulares, pode constituir em uma alternativa farmacêutica promissora para o tratamento de lesões hepáticas.

7. REFERÊNCIAS

1. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, et al. ATP drives lamina propria tH17 cell differentiation. *Nature* 2008;455:808–812.
2. Beldi G, Enjyoji K, Wu Y, Miller L, Banz Y, Sun X, Robson SC. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:2588-603.
3. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet.* 2010 Jul 17;376(9736):190-201.
4. Bhaduri BR, Mieli-Vergani G. Fulminant hepatic failure: pediatric aspects. *Semin Liver Dis.* 1996 Nov;16(4):349-55.
5. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995 Jul;133(1):43-52
6. Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:139–149.
7. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;112: 358–404.
8. Bower WA, Johns M, Margolis HS, Williams IT, Bell BP. Population-based surveillance for acute liver failure. *Am J Gastroenterol.* 2007 Nov;102(11):2459-63. Epub 2007 Jun 29.
9. Bucheimer RE, Linden J. Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol.* 2004 Mar 1;555(Pt 2):311-21.
10. Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J Physiol.* 2008 Jul 15;586(14):3307-12.
11. Capiod T. ATP-activated cation currents in single guinea-pig hepatocytes. *J Physiol* 1998;507(Pt 3): 795–805.
12. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:395-433.

13. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1115-22.
14. Che M, Gatmaitan Z, Arias IM. Ectonucleotidases, purine nucleoside transporter, and function of the bile canalicular plasma membrane of the hepatocyte. *FASEB J*. 1997 Feb;11(2):101-8.
15. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Med*. 2007;13:851–856.
16. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826-37.
17. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G (i). *J Biol Chem* 2001;276:41479–41485
18. Corcoran GB, Bauer JA, Lau TW. Immediate rise in intracellular calcium and glycogen phosphorylase activities upon acetaminophen covalent binding leading to hepatotoxicity in mice. *Toxicology*. 1988 Jul;50(2):157-67.
19. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006b;1762:191–201.
20. Dixon CJ. Evidence that 2-methylthioATP and 2-methylthioADP are both agonists at the rat hepatocyte P2Y (1) receptor. *Br J Pharmacol* 2000;130:664–668.
21. Dixon CJ, Hall JF, Boarder MR. ADP stimulation of inositol phosphates in hepatocytes: role of conversion to ATP and stimulation of P2Y2 receptors. *Br J Pharmacol* 2003;138:272–278
22. Duhant X, Schandene L, Bruyns C, Gonzalez NS, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2002;169:15–21.
23. Glavy JS, Wu SM, Wang PJ, Orr GA, Wolkoff AW. Down-regulation by extracellular ATP of rat hepatocyte organic anion transport is mediated by serine phosphorylation of oatp1. *J Biol Chem* 2000;275:1479–1484.

24. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002;67:322–328.
25. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res.* 1996 Jan. 26;218(3):916-23.
26. Harman AW, Mahar SO, Burcham PC, Madsen BW. Level of cytosolic free calcium during acetaminophen toxicity in mouse hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1992 Apr;41(4):665-70.
27. Hashmi AZ, Hakim W, Kruglov EA, Watanabe A, Watkins W, Dranoff JA, Mehal WZ. Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Jan;292(1):G395- 401.
28. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010; (196): 369–405.
29. 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.
30. Hung O, Nelson LS. Acetaminophen. In Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS, editors. *Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide* 6th ed. New York, NY: McGraw Hill; 2004. p. 1088- 1094.
31. Ichai P, Duclos-Vallée JC, Guettier C, Hamida SB, Antonini T, Delvert 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.
32. Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci.* 2006 Jan;89(1):31-41.
33. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2003 Dec;31(12):1499-506. Review.
34. Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of

- CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996;271: 33116–33122.
35. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, et al. Critical role for cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 2006;281: 36560–36568.
36. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006;440:233–236.
37. Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS. Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res* 2002;90:E25–E33.
38. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:857–868
39. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004;40:1170–1179.
40. von Kügelgen I. Pharmacology of mammalian P2X and P2Y receptors. *Biotrend Reviews*. 2008 Set; No 3.
41. 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.
42. Lamkanfi M, Dixit VM. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol*. 2011 Jul 15;187(2):597-602.
43. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiødt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM; Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*. 2005 Dec;42(6):1364-72.

44. 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.
45. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228–232.
46. Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood* 2005;106:3860–3866.
47. Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol Pharmacol* 2003;64:104–112.
48. 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.
49. Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ: Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol* 1988, 255:H554-62.
50. Moore M, Thor H, Moore G, Nelson S, Moldeus P, Orrenius S. The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinoneimine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 1985. 260:13035-40
51. Nakamura K, Mizutani R, Sanbe A, Enosawa S, Kasahara M, Nakagawa A, Ejiri Y, Murayama N, Miyamoto Y, Torii T, Kusakawa S, Yamauchi J, Fukuda M, Yamazaki H, Tanoue A. Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system. *J Biosci Bioeng.* 2011 Jan;111(1):78-84.
52. Neuwelt AJ, Wu YJ, Knap N, Losin M, Neuwelt EA, Pagel MA, Warmann S, Fuchs J, Czauderna P, Wozniak M. Using acetaminophen's toxicity

- mechanism to enhance cisplatin efficacy in hepatocarcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Neoplasia*. 2009 Oct;11(10):1003-11.
53. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal Models of Fulminant Hepatic Failure: A Critical Evaluation. *Liver Transpl*. 2000 Jan;6(1):21-31.
54. Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*. 1998 Feb-Mar;23(2-3):173-80.
55. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM; U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*. 2002 Dec 17;137(12):947-54.
56. Peterson RG, Rumack BH. Treating acute acetaminophen poisoning with acetylcysteine. *JAMA*. 1977 May 30;237(22):2406-7.
57. Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5' nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase: two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 2003;278:13468–13479.
58. Piperno E, Berssenbruegge DA. Reversal of experimental paracetamol toxicosis with N-acetylcysteine. *Lancet*. 1976 Oct 2;2(7988):738-9.
59. Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol*. 1995; 158:141–214.
60. Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet*. 1977 Aug 27;2(8035):432-4
61. Prescott L. Paracetamol (acetaminophen): a critical bibliographic review. London: Taylor and Francis, 1996
62. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. Protection of acetaminophen-induced hepato-cellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1470–1483.

63. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61.
64. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):774-83.
65. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol.* 2010.Mar;28:321-42.
66. Roe AL, Snawder JE, Benson RW, Roberts DW, Casciano DA. HepG2 Cells an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Jan 15;190(1):15-9.
67. Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA. Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch Intern Med.* 1981 Feb 23;141(3 Spec No):380-5
68. Ryba T, Battaglia D, Pope BD, Hiratani I, Gilbert DM. Genome-scale analysis of replication timing: from bench to bioinformatics. *Nat Protoc.* 2011 Jun;6(6):870-95. doi: 10.1038/nprot.2011.328. Epub 2011 Jun 2.
69. 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.
70. Salas VM, Corcoran GB. Calcium-dependent DNA damage and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-independent glycogen phosphorylase activation in an in vitro model of acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology.* 1997 Jun;25(6):1432-8.
71. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, Verderio C, Buer J, Scanziani E, Grassi F. Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* 2008;1:ra6.
72. van Summeren A, Renes J, Bouwman FG, Noben JP, van Delft JH, Kleinjans JC, Mariman EC. Proteomics investigations of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Sci.* 2011 Mar;120(1):109-22.

73. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol*. 2010 Nov;10(11):753-66.
74. Tirmenstein MA, Nelson SD. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Biol Chem*. 1989 Jun 15;264(17):9814-9.
75. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis*. 1970;3:282-98.
76. Tsokos-Kuhn JO. Evidence in vivo for elevation of intracellular free Ca²⁺ in the liver after diquat, acetaminophen, and CCl₄. *Biochem Pharmacol*. 1989 Sep 15;38(18):3061-5
77. Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol*. 2009 Jul 7;15(25):3086-98.
78. Wang TF, Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 1996 Apr 26;271(17):9898-901.
79. Westerink WM, Schoonen WG. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*. 2007 Dec;21(8):1581-91.
80. 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.
81. 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.
82. Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*. 1986 Feb 13-19;319(6054):600-2.

83. Yang R, Miki K, He X, Killeen ME, Fink MP. Prolonged treatment with N-acetylcystine delays liver recovery from acetaminophen hepatotoxicity. *Crit Care*. 2009;13(2):R55.
84. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*. 1992; 285(Pt 2):345–365.