

Jayne Laís Dias Quintão

**Bloqueio da sinalização purinérgica como
alternativa terapêutica para a falência hepática
aguda**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2013

Jayane Laís Dias Quintão

**Bloqueio da sinalização purinérgica como alternativa
terapêutica para a falência hepática aguda**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito para a
obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Professor Dr. Gustavo Batista de Menezes

Departamento de Morfologia – ICB – UFMG

Co-orientador: Dr. André Gustavo de Oliveira

Departamento de Morfologia – ICB – UFMG

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

Belo Horizonte

2013

Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunobiofotônica, do Departamento de Morfologia e no Laboratório de Imunofarmacologia, do Departamento de Imunologia e Bioquímica, ambos localizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Também foi utilizado o Laboratório de Biofotônica, no Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

O que conhecemos é finito,
o desconhecido é infinito;
intelectualmente estamos parados numa ilha
no meio de um oceano ilimitado da inexplicabilidade.
Nosso objetivo a cada geração é conquistar
um pouco mais terra.

Thomas Huxley

Dedico esse trabalho á minha família, em especial minha mãe e ao Gabriel, meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por permitir que esse grande sonho se tornasse realidade.

A minha família, em especial minha mãe, pelo amor incondicional, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando nos momentos difíceis.

Ao Gabriel, mais que um namorado, verdadeiro companheiro, amigo, confidente, amor que me motiva sempre buscar o melhor.

As minhas amadas sobrinhas, Gabrielle, Mariana e Giovanna, pelos momentos de alegria.

Ao meu orientador Gustavo Menezes, que sempre me incentivou através de seu imenso amor à ciência, grande exemplo de conhecimento e dedicação.

Ao meu co-orientador André, por sempre estar disponível em ajudar, contribuindo para o enriquecimento desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Imunobiofotônica, pela companhia durante esses meses.

Aos velhos amigos do LABRE, por proporcionarem bons momentos de convivência.

A uma grande amiga, Nathália Satchiko, por estar presente nos momentos difíceis, e por sempre me ajudar com seus conselhos valiosos.

Aos colegas e amigos do grande Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e Regeneração, N3 140, pessoas queridas que sempre serão lembradas no meu coração.

A todos os amigos, que, de alguma forma, me ajudaram nesta conquista. Foi difícil chegar até aqui, mas a caminhada tornou-se mais amena quando os tive ao meu lado. O meu muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O FÍGADO	18
1.2. FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA (FHA)	19
1.3. MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP	20
1.4. CLASSES DE RECEPTORES	23
1.5. RECEPTORES PURINÉRGICOS	23
1.6. CÁLCIO- MOLÉCULA SINALIZADORA	26
1.7. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO FÍGADO	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1. ANIMAIS	30
3.2. INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA E COLETA DE AMOSTRAS: MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA	30
3.3. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	31
3.4. APIRASE	32

3.5. VISUALIZAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA PELA TÉCNICA DA MICROSCOPIA CONFOCAL INTRAVITAL.....	32
3.6. QUANTIFICAÇÃO DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) PARA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA LESÃO HEPÁTICA	33
3.7. ESTIMATIVA DO INFILTRADO NEUTROFÍLICO PELO ENSAIO DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	33
3.8. OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR	34
3.9. CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	34
3.10. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	35
3.11. DOSAGEM DE CITOCINAS	36
3.12. CULTURA CELULAR.....	36
3.13. INDUÇÃO DE LESÃO POR PARACETAMOL EM CULTURA CELULAR	36
3.14. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT	37
3.15. PACIENTES	37
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS	39
4.1. TRATAMENTO COM APAP PROMOVE NECROSE CELULAR GENERALIZADA.....	39
4.2. TRATAMENTO COM APAP INDUZ INTENSO INFILTRADO NEUTROFÍLICO NO TECIDO HEPÁTICO.....	41
4.3. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP.....	42
4.4. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ ÁREAS DE NECROSE.....	44
4.5. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ A DOSAGEM DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	46
4.6. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS PARA O TECIDO HEPÁTICO.....	48
4.7. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS PROMOVEM DIMINUIÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA.....	51

4.8. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DIMINUEM RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS	54
4.9. TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR DE ADENOSINA AUMENTA LESÃO HEPÁTICA	56
4.10. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DIMINUEM ÁREAS DE NECROSE APÓS TRATAMENTO COM APAP	57
4.11. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA ATUA DE FORMA DELETÉRIA NA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA, PORÉM NÃO PARTICIPA DA INFLAMAÇÃO PULMONAR	60
4.12. A TOXICIDADE POR APAP PODE SER REPRODUZIDA EM MODELO <i>IN VITRO</i> NA LINHAGEM CELULAR HEPG2 DE MODO BASTANTE SIMILAR AO OBSERVADO <i>IN VIVO</i>	62
4.13. O TRATAMENTO COM APAP ALTERA O PERFIL DE EXPRESSÃO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM CÉLULAS HEPG2	64
4.14. AUMENTO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS FORAM IDENTIFICADOS EM PACIENTE DIAGNOSTICADOS COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA NÃO VIRAL	66
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS	74
8. ANEXO.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tratamento com APAP promove áreas de necrose.....	40
FIGURA 2 - Tratamento com APAP induz recrutamento de neutrófilos para o fígado.	41
FIGURA 3 - Tratamento com apirase reduz áreas de necrose.....	45
FIGURA 4 - Tratamento com apirase reduz recrutamento de neutrófilos para tecido hepático.	50
FIGURA 5 - Tratamento com antagonistas de receptores purinérgicos diminuem áreas de necrose.....	58
FIGURA 6 - O bloqueio da sinalização purinérgica não promove alteração na lesão pulmonar.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação dos receptores purinérgicos	25
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Apirase diminui a lesão hepática induzida por sobredose de APAP.	43
Gráfico 2 - Tratamento com apirase reduz níveis séricos de citocinas.	47
Gráfico 3 - Tratamento com apirase reduz infiltrado neutrofílico no tecido hepático.	49
Gráfico 4 - Antagonistas de receptores purinérgicos reduzem lesão hepática.	52
Gráfico 5 - Tratamento com antagonista de receptor do tipo P2Y não diminuí lesão hepática.	53
Gráfico 6 - Antagonistas de receptores purinérgicos reduzem recrutamento de neutrófilos. .	55
Gráfico 7 - Tratamento com antagonista de receptor purinérgico do tipo P1 aumenta lesão hepática induzida por APAP.	56
Gráfico 8 - Tratamento com antagonistas de receptores purinérgicos diminuem o <i>Score</i> histológico.	59
Gráfico 9 - Bloqueio da sinalização purinérgica e metabolismo do ATP extracelular não diminuem lesão pulmonar.	61
Gráfico 10 - Curva dose-resposta de APAP.	63
Gráfico 11 - Curva tempo-resposta de APAP 5 mM.	63
Gráfico 12 - O tratamento com APAP altera a expressão de receptores purinérgicos.	65
Gráfico 13 - Pacientes com hepatite apresentaram aumento na expressão dos receptores purinérgicos.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP- Adenosina difosfato
- AIF- Fator Indutor de Apoptose
- ALT- Alanina transaminase (transaminase glutâmica pirúvica sérica)
- AMP- Adenosina monofosfato
- APAP- Acetaminofeno, paracetamol, N-acetyl-*p*-aminophenol
- ATP- Adenosina trifosfato
- Bcl-2- Linfoma de células B2 (“Bcl-2-associated X protein”)
- BAL- Lavado broncoalveolar
- Ca²⁺ - Ion cálcio
- cADPr- ADP-ribosecíclica (“cyclic ADP ribose”)
- CaM- Moléculas de adesão celular (“cell adhesion molecules”)
- CEBIO- Centro de Bioterismo da UFMG
- CETEA- Comitê de ética em experimentação Animal da UFMG
- DAMP’s- Padrões moleculares associados a perigo (“damage-associated molecular patterns”)
- DEXA- Dexametasona
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- ELISA- Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (“enzyme linked immunosorbent assay”)
- ER- Retículo endoplasmático
- FHA- Falência Hepática Aguda
- HMGB1- proteínas do grupo de alta mobilidade (“high-mobility group protein 1”)
- GFP- *Green Fluorescent Protein*; Proteína verde fluorescente
- GSH- Glutationa reduzida
- HMGB1- *High-Mobility Group Box 1*
- HSP- *Heat Shock Protein*; Proteína de choque térmico
- IL1 β - Interleucina 1 beta
- InsP3- Inositol 1-4-5 trisphosphate
- IV- Intravenoso
- LDH- Lactato desidrogenase
- MPO- Mieloperoxidase
- MPT- Permeabilidade transitória na membrana

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

NAC- N-acetilcisteína

NAG- N-acetilglicosaminidase

NAPQI-N- acetil-p-benzo-quinonaimina

NK- Célula Natural Killer

NKT- Célula Natural Killer T

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

PCR- Reação em Cadeia de Polimerase

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

Pi- fosfato inorgânico

RYRS- Receptor de Rianodina

RNS- Espécies reativas de nitrogênio

ROS- Espécies reativas de oxigênio

RPM- Rotações por minuto

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

SFB- Soro fetal bovino

SR- Retículo sarcoplasmático

TLR- Toll like receptor

TGF- Fator de crescimento transformante

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UDP- Uridina difosfato

RESUMO

O fígado é um órgão que desempenha funções indispensáveis à vida, como o controle metabólico, síntese de proteínas plasmáticas e detoxificação de compostos químicos, toxinas e drogas. Com isso, ele está sujeito à ocorrência de vários tipos de lesão, como as induzidas por agentes químicos. O paracetamol (APAP), um analgésico e antipirético de uso comum, é capaz de causar lesão hepática se administrado em altas doses, levando até mesmo à falência hepática aguda (FHA), um transtorno fatal que provoca milhares de mortes anualmente e é responsável por 50% de todos os transplantes hepáticos no mundo. Já foi descrito que durante a morte celular por sobredose de paracetamol há um desequilíbrio na homeostase mitocondrial que culmina na morte do hepatócito por necrose e consequente liberação do seu conteúdo intracelular, como por exemplo, peptídeos formilados, DNA mitocondrial, HSP (proteína de choque térmico) e ATP (adenosina trifosfato). O ATP é secretado a partir de hepatócitos sob condições fisiológicas e desempenha um papel importante na modulação das funções do fígado, através da ativação de receptores purinérgicos. De maneira interessante, as grandes concentrações de ATP extracelular, como observado durante a necrose, desencadeiam ativação de respostas inflamatórias que contribuem para a progressão da lesão hepática, porém ainda não está demonstrado quais os receptores purinérgicos estão envolvidos, bem como a função diferencial destes receptores na falência hepática aguda induzida por sobredose de APAP. Já é conhecido que a homeostase prejudicada do cálcio é uma marca característica da hepatotoxicidade induzida por paracetamol (APAP), uma vez que o ATP induz a mobilização dos estoques intracelulares deste íon. Dessa forma, nosso trabalho avaliou se a liberação exacerbada de ATP durante a necrose induzida por paracetamol poderia promover aumento da lesão hepática. De acordo com os nossos resultados *in vivo*, o tratamento com sobredose de APAP resultou em extensas áreas de necrose no fígado, infiltração maciça de neutrófilos e grandes áreas não perfundidas, bem como o desencadeamento da inflamação sistêmica. No fígado, estes efeitos foram significativamente revertidos após o metabolismo de ATP por uma ATPase ou pelo bloqueio de receptores purinérgicos, mas nenhum dos tratamentos impediu a inflamação pulmonar, o que sugere pensar que a sinalização purinérgica contribui de forma parácrina no fígado. Corroborando os nossos resultados, experimentos realizados *in vitro* demonstraram que o tratamento com APAP induz perda da viabilidade celular e de forma quantitativa o PCR em tempo real mostrou que a incubação de células HepG2 com APAP aumentou o nível de expressão de

vários receptores purinérgicos, o que pode explicar a hiperresponsividade ao ATP extracelular. Este fenótipo foi confirmado através de experimentos realizados em seres humanos usando biopsias de fígado de pacientes diagnosticados com insuficiência hepática fulminante. Nossos dados nos direcionam a pensar que sob condições patológicas, o ATP pode atuar não só como um ativador do sistema imune, mas também atua de maneira parácrina e autócrina como um DAMP citotóxico, principalmente por desregular a homeostase intracelular de cálcio.

Palavras-chave: Lesão hepática, inflamação estéril, paracetamol, sinalização purinérgica, morte celular, sistema imune e inflamação.

ABSTRACT

The liver is an organ that performs functions essential to life, such as metabolic control, plasma protein synthesis and detoxification of chemicals, drugs and toxins. With that, he is subject to the occurrence of various types of injury, such as those induced by chemical agents. Acetaminophen (APAP), an analgesic and antipyretic in common use can cause liver damage if taken in high doses, even leading to acute liver failure (FHA), a fatal disorder that causes thousands of deaths annually and is responsible for 50% of all liver transplants in the world. It has been reported that during cell death by overdose of paracetamol there is an imbalance in the culminating in mitochondrial homeostasis hepatocyte death by necrosis and consequently release their intracellular contents, such as formylated peptides, mitochondrial DNA, HSP (heat shock protein) and ATP (adenosine triphosphate). ATP is secreted from hepatocytes under physiological conditions and plays an important role in modulating the functions of the liver, through activation of purinergic receptors. Interestingly, higher concentrations of extracellular ATP, as observed in the necrosis, unleash activation of inflammatory responses that contribute to the progression of liver injury, but has not yet been established which purinergic receptors are involved, as well as the differential function of these receptors in acute liver failure induced by overdose of APAP. It is already known that impaired calcium homeostasis is a feature of hepatotoxicity induced by acetaminophen (APAP), since ATP induces the mobilization of intracellular stores this ion. Thus, our study evaluated whether ATP release during necrosis induced by acetaminophen could directly contribute to activation of cellular immune response, promoting increased liver injury. In accordance with our *in vivo* results, treatment with APAP overdose resulted in extensive areas of necrosis in the liver and neutrophil infiltration macissa not perfused large areas and the onset of systemic inflammation. In the liver, these effects were significantly reversed after ATP metabolism by one or ATPase at block purinergic receptors, but none of the treatments prevented the pulmonary inflammation, suggesting think that the purinergic signaling contributes paracrine liver. In corroboration of our findings, experiments performed *in vitro* have shown that treatment with APAP induces loss of cell viability and quantitatively the real-time PCR showed that incubation of HepG2 cells with APAP increased the expression of several purinergic receptors, which may explain the hiperresponsividade to extracellular ATP. This phenotype was confirmed by experiments using human liver biopsies of patients diagnosed with fulminant hepatic failure. Our data is leading us to think that under

pathological conditions, ATP can act not only as an activator of the immune system, but also plays an autocrine and paracrine as a DAMP cytotoxic, mainly desrregular intracellular calcium homeostasis.

Keywords: liver injury, sterile inflammation, acetaminophen, cell death, purinergic signaling, immune system and inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O FÍGADO

O fígado é uma glândula anexa ao tubo digestivo e constitui o órgão mais volumoso do organismo, pesando cerca de 1500 gramas em um ser humano adulto. Esse órgão 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, enquanto que os outros 20% constituem sangue rico em oxigênio, fornecido pela artéria hepática. Essa mistura sanguínea circula pelo fígado lentamente, a baixa pressão de perfusão e tensão de oxigênio, através de uma rede de capilares sinusóides bastante desenvolvida. O fígado é dividido em lóbulos, os quais contêm a célula metabólica funcional, o hepatócito. Estas células se organizam em cordões entremeados pelos 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 (Junqueira & Carneiro, 2008).

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).

Considerando todas essas funções, não é por menos que doenças que acometam o fígado sejam de grande importância médica e levem frequentemente à 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, em países europeus (Wigg *et al*, 2005).

1.2. FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA (FHA)

A falência hepática aguda é a manifestação de injúria súbita e severa que acomete o fígado podendo ser desencadeada por causas variadas. A FHA provoca milhares de mortes anualmente e é responsável por grande parte dos transplantes hepáticos no mundo (Khan *et al*, 2006). Ela foi definida em 1970 como um distúrbio potencialmente reversível, resultado de dano hepático severo, associada ao comprometimento em qualquer grau de encefalopatia hepática (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 a encefalopatia (Bhaduri & Mieli-Vergani, 1996). Os sinais clínicos dessa doença são bem amplos, e inclui 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 pode ter várias causas, mas as principais são uso de drogas/fármacos e infecções virais. Os vírus da hepatite A, B e E são os principais causadores de falência hepática em países em desenvolvimento, enquanto que a falência induzida por drogas/fármacos prevalece nos EUA e Europa. Dentre esses fármacos destaca-se a hepatotoxicidade induzida por paracetamol, 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 paracetamol, 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 em tempo superior à 10 horas da sobredose (Prescott *et al*, 1977; Rumack *et al*, 1981), sendo validado por Prescott (1996) que o antídoto tem eficácia até 24 horas após a sobredose de APAP, mesmo em casos de uma ingestão muito elevada. Contudo para os pacientes com FHA em estágio avançado, a única opção para tratamento efetivo é o transplante hepático, sendo de extrema importância a rápida identificação dos pacientes que não conseguirão de forma

satisfatória uma regeneração baseada em medicamentos para que as chances de um transplante bem sucedido aumentem (Bernal *et al*, 2010). A mortalidade causada pela FHA, infelizmente ainda continua elevada, apesar do progresso considerável nos campos de tratamento intensivo e transplante hepático (Newsome *et al*, 2000).

Levando em conta a inexistência de tratamentos mais eficazes, a baixa disponibilidade de fígados para transplante e o custo exorbitante do cuidado médico dos pacientes, novas opções terapêuticas são extremamente valiosas. Portanto, a compreensão da participação da sinalização purinérgica como, o ATP e seus receptores, possibilitará um maior entendimento não só da manutenção da lesão hepática como, exacerbação do processo inflamatório induzido por drogas ou medicamentos, como o paracetamol, mas também proverá informações possivelmente úteis em várias outras enfermidades que compartilham o componente inflamatório da lesão estéril, como a isquemia/reperfusão (infarto do miocárdio), gota, silicose, doença de Alzheimer, aterosclerose, dentre outras (Rock *et al*, 2010).

1.3. MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP

É de extrema importância o desenvolvimento de modelos de estudo para a FHA. Tais estudos que possibilitem uma melhor compreensão acerca dos estados fisiopatológicos dessa doença, bem como permitam o desenvolvimento e refinamento de opções terapêuticas para o tratamento da FHA. Atualmente os modelos mais aceitos para a indução da FHA são as técnicas cirúrgicas e uso de drogas hepatotóxicas, como azoximetano, concavalina A, galactosamina, halotano, thioacetamida, amatoxina-endotoxina e paracetamol (APAP), dentre outras (Tuñón *et al*, 2009).

O APAP é uma droga analgésica e antipirética amplamente distribuída na clínica e comumente prescritas em formulações que contêm opióides. Apesar de considerada segura em níveis terapêuticos, a sua overdose 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). Quando administrada em doses terapêuticas, mais de 90% do APAP é glucorinidado ou sulfatado no fígado e, subsequentemente excretado (Jaeschke & Bajt, 2005). O restante remanescente é metabolizado por uma terceira via metabólica na qual o APAP é bioativado pelo citocromo P450 (CYP450) no intermediário eletrolítico N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) (James *et al*, 2003), que pode ser neutralizado através de conjugação com

glutationa (GSH). Entretanto, após uma sobredose de APAP, a formação de NAPQI excede a capacidade de detoxificação de GSH, resultando em ligação covalente às proteínas celulares.

A citotoxicidade causada pela sobredose de paracetamol ocorre preferencialmente em ligações proteicas de origem mitocondrial, mesmo com a identificação de isômero 30-Hidroxiacetanilido em outras proteínas. 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 á depleção da glutatona (GSH) mitocondrial, desencadeia a abertura do poro de permeabilidade transitória na membrana, MPT, resultando em colapso do potencial de membrana mitocondrial (Kon *et al*, 2004).

A ocorrência de MPT possuiu relação direta com a morte de hepatócitos, que tem como consequência a incapacidade de sintetizar a molécula de ATP e, finalmente a morte celular induzida por necrose. (Kin *et al*, 2003).

Há descrição de formação de poros na membrana mitocondrial externa (canal mitocondrial induzido por apoptose), que promovem liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo C, endonucleases G e Fator Indutor de Apoptose (AIF) para o citosol. A abertura desses poros é modulada por proteínas da família Bcl-2 (Linfoma de células B2), como a proteína pró-apoptótica Bax, encontrada no citosol. A ativação promove sua translocação para mitocôndria, onde a proteína é inserida na membrana externa e sofre oligomerização, formando os canais. (Dejean *et al*, 2006, Kinnally & Antonsson, 2007). A liberação dos AIF e endonucleases G ocorre entre 3 e 6 horas de exposição ao APAP, antes da morte celular, e está relacionada à severa diminuição do metabolismo aeróbico energético e extensa depleção de ATP, desencadeiam a morte celular necrótica (Jaeschke & Bajt, 2005). O papel da apoptose na injúria hepática por APAP é contraditório. Estudos apontam que, em camundongos, após uma dose tóxica de APAP, 40% dos hepatócitos morrem por apoptose e 60% por necrose (Ray *et al*, 1996). Contudo estudos posteriores demonstraram 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 fígados de camundongos (Gujral *et al*, 2002). Um fator determinante para a célula evoluir para apoptose ou necrose são os níveis intracelulares de ATP, de forma que níveis diminuídos desta purina estão associados á necrose, bem como níveis adequados associam-se á morte por apoptose (Chen & Nuñez, 2010).

A lesão estéril, como a causada por paracetamol, possui um componente imunológico bastante pronunciado, apesar da ausência de participação de microrganismos em seu desenvolvimento ou manutenção. Vários trabalhos têm relatado a presença dos parâmetros inflamatórios clássicos (*rubor, calor, tumor et dolor* – CELSUS, 30 A.C.) e a participação ativa de leucócitos nesse tipo de lesão (Liu *et al*, 2006; McDonald *et al*, 2010). Isto levou à descoberta da ativação dos receptores pró-inflamatórios por ligantes endógenos, moléculas que foram então denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs “damage-associated molecular patterns”), e embora sejam agrupadas, elas possuem uma estrutura altamente variável. DAMPs são moléculas de natureza bastante heterogênea e podem ser liberadas por qualquer tipo celular encontrado sob estresse ou necrose. Com a ruptura de membrana plasmática e organelas, características desse tipo de morte celular, os seus constituintes internos atingem o meio extracelular podendo estimular uma série de receptores presentes tanto em leucócitos como em células do parênquima (Chen & Nunes, 2010). Em geral, as células do sistema imunológico expressam receptores para quase todas as moléculas que originalmente estão presentes no compartimento intracelular, incluindo o DNA mitocondrial e nuclear, RNA, HMGB-1 (*high-motility group box 1*), HSPs (*heat-shock proteins*), componentes da matriz extracelular, como hialuronato e sulfato de heparan e ATP (Rock *et al*, 2010). Considerando a semelhança da resposta inflamatória a microrganismos em relação à lesão estéril, seria possível que os mesmos receptores do hospedeiro modulassem ambas as respostas. Isso se revelou verdadeiro na descoberta da participação de vários Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) na inflamação estéril, os quais detectam motivos estruturais típicos de microrganismos, originalmente. As cinco classes de PRRs são: Receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG-I (RLR), receptores de lectina tipo C (CLR) e receptores tipo ausente em melanoma 2 (AIM2) (Chen & Nuñez, 2010). A citotoxicidade induzida por APAP desencadeia a morte do hepatócito por necrose e conseqüente aumento de ATP extracelular o qual, por sua vez ativa o inflamasoma através do receptor P2X7, levando à liberação de citocina pró-inflamatória IL-1 β (Rock *et al*, 2009). Esta resposta inflamatória provocada por necrose derivado de ATP foi recentemente descrita como um fator importante para a progressão lesões hepáticas (Hoque *et al*, 2012).

1.4. CLASSES DE RECEPTORES

Receptores são proteínas de membrana capazes de se ligar a um transmissor na parte extracelular e permitir a modificação de algum componente intracelular. Isto é, os receptores são os pontos de entrada da informação na célula. Existem três grandes grupos de receptores (Alberts *et al*, 1994).

- Receptores ionotrópicos são receptores ligados a canais iônicos que quando ativados, permitem a passagem de íons como o sódio, cálcio ou cloreto. São exemplos destes receptores; os glutamatérgicos (permeável ao sódio), gabaérgicos (permeável ao cloreto) e os receptores purinérgicos do tipo P2X (permeáveis ao sódio e cálcio).
- Metabotrópicos: ligados à proteína G, uma proteína de membrana que pode regular a atividade de várias proteínas, como adenilil ciclase (AC - “Adenylyl Cyclase”), fosfolipase C (PLC - “Phospholipase C”) e canais iônicos. Nesta classe estão incluídos os receptores de serotonina, β -adrenérgicos, purinérgico P2Y e purinérgico P1, dentre outros.
- Receptores com atividade enzimática: nestes, a ligação do transmissor induz a uma atividade enzimática intracelular, geralmente a fosforilação em resíduos de tirosina. São exemplo os receptores para fatores de crescimento, como o EGFR, FGFR (“Epidermal Growth Factor Receptor, Fibroblast Growth Factor Receptor” respectivamente).

1.5. RECEPTORES PURINÉRGICOS

Receptores P1 ou de Adenosina

Os receptores P1 respondem principalmente a adenosina e são divididos em quatro subtipos, A1, A2A, A2B, A3, todos acoplados à proteína G e classificados desta forma baseados em evidências moleculares, bioquímicas e farmacológicas. Os receptores P1 estão acoplados aos principais efetores regulados por proteínas G, como a AC, a fosfodiesterase, fosfolipases, canais de K^+ e Ca^{2+} . A ativação dos subtipos A2A, A2B induzem um aumento de cAMP, sendo que o subtipo A2B também aumenta os níveis de IP3. Os subtipos A1, A3 estão

ligados ao aumento de IP₃ e à diminuição de cAMP, sendo que o subtipo A₁ também pode estimular a permeabilidade das membranas ao íon K⁺ e diminuir a entrada de Ca²⁺ (para revisão ver Ralevic, Burnstock, 1998).

Receptores P2

Os receptores P2 são divididos em dois grupos bem distintos, baseado tanto em características estruturais como funcionais, em ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y). Até o momento sete receptores P2X e cinco receptores P2Y de mamíferos foram clonados, caracterizados e aceitos com membros válidos de suas respectivas famílias.

Ionotrópicos (P2X)

Estes receptores foram identificados primeiramente pela preferência a análogos estáveis de ATP, como a,b-MeATP ou b,g-MeATP (“a,b(b,g)-methyl58 ATP”), em contraste 2-metiltio ATP (2-MeSATP - “2-Methylthio ATP”), foi considerado um agonista específico para os receptores P2Y. Até recentemente foram clonados sete receptores (P2X₁₋₇), sendo que um receptor funcional é formado por 3 subunidades, possibilitando a formação de receptores homoméricos ou heteroméricos. Considerando que muitos destes receptores são expressos na mesma célula, a formação de receptores heterotriméricos pode produzir um grande número de receptores com características farmacológicas e funcionais diferenciadas (Ralevic, Burnstock, 1998). Os receptores P2X são acoplados a canais iônicos, com a seguinte permeabilidade iônica: Ca²⁺ >>Na⁺ > K⁺, Desta forma, a principal via de sinalização ativada por estes receptores é o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺, tanto pela via direta como através de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem. Estes receptores são os responsáveis pela sinalização rápida (em aproximadamente 10ms) em comparação à sinalização lenta mediada pelos receptores P2Y, que ativam sinalizações em torno de 100ms (Ralevic, Burnstock, 1998). O principal agonista destes receptores é o ATP, sendo que os outros nucleotídeos (ADP, UTP, UDP) não possuem afinidade, ou uma afinidade muito reduzida (Boarder, Hourani, 1998).

Metabotrópicos (P2Y)

Receptores purinérgicos do tipo P2Y são caracterizados por serem receptores acoplados à proteína G, tendo, portanto a estrutura característica dos receptores metabotrópicos. Como não existem agonistas seletivos para os subtipos de P2Y, muitas características são baseadas nas semelhanças entre o efeito de um conjunto de agonistas em receptores clonados comparado com os efeitos observados em culturas de células. Devido a isto, Ralevic e Burnstock (1998) sugeriram que receptores identificados por intermédio de estudos farmacológicos em células não transfectadas, isto é, o receptor endógeno, fosse acrescido do sufixo “like”, isto é, as características deste receptor são parecidas com um determinado receptor clonado. Esta classificação substitui a anterior, baseada somente em características farmacológicas. Por exemplo, o que era conhecido como purinoceptor P2U corresponde ao receptor P2Y2-“like”. Para melhor entendimento, a tabela 1 mostra a classificação destes receptores, bem como um resumo das sensibilidades aos seus agonistas e antagonistas.

TABELA 1 – Classificação dos receptores purinérgicos

Family	Subfamilies	Natural agonists	Class	Antagonists		
				Selective	Non-selective	
P1	A1	Adenosine	Protein-G coupled receptors	PSB 36	Theophylline, Caffeine (P1A ₁ and P1A _{2a})	
	A2 _a			Istradefylline		
	A2 _b			CVT-6883		
	A3			MRS-1191		
P2	X	1	ATP, 2MeSATP	NF-157	TNP-ATP, NF-023,	
		2	ATP, 2MeSATP	RO-3		
		3	ATP, 2MeSATP	RO-3, NF-110		
		4	ATP, 2MeSATP	Ivermectin		
		5	ATP, 2MeSATP, BzATP	There is no known antagonists		
		6	ATP	OxiATP, Brilliant Blue G		
		7	ATP, 2MeSATP, BzATP			
	Y	1	ADP > ATP	Protein-G coupled receptors	MRS2279	Reactive Blue 2
		2	UTP = ATP			
		4	UTP >> ATP			
		5	Lipo-phosphatidic acid			
		6	UDP >> UTP		MRS-2578	
		8	Orphan receptor			
		9	Lipo-phosphatidic acid			
10	Orphan receptor					
11	ATP		NF-157, NF-340			
12	ADP > ATP		Cangrelor			
13	ADP > ATP		MRS-2211			
14	UDP-glucose > UDP-galactose > UDP-N-acetylglucosamine		UDP disodium salt			

1.6. CÁLCIO- MOLÉCULA SINALIZADORA

Os íons cálcio são classificados como segundos mensageiros intracelulares, sendo considerados como importantes moléculas sinalizadoras. A concentração intracelular desse íon é extremamente regulada para que seus níveis sejam mantidos na faixa de nM, em situações basais, enquanto que sua concentração extracelular está na faixa de mM, possibilitando dessa forma um rápido aumento da concentração intracelular com abertura de canais na membrana celular. O aumento de cálcio intracelular pode ocorrer de duas formas principais. No primeiro momento a abertura desses canais pode ser regulada por transmissores, como exemplo os receptores purinérgicos do tipo P2X, como pelo potencial, como o caso dos canais de cálcio-dependentes de voltagem- (VSCC “Voltage Sensitive Ca²⁺-Channels”), ou mesmo, por ambos, como é o caso do receptor glutamatérgico, que pode ser tanto modulado pelo glutamato quanto pelo potencial (Alberts *et al*, 1994).

A segunda forma de promover o aumento intracelular de cálcio é a liberação desse íon dos estoques intracelulares. Uma das principais via de liberação de cálcio dos estoques intracelulares é a clivagem de fosfatidil inositol, com a produção de IP3, que pode se ligar aos receptores do retículo endoplasmático liberando cálcio destes compartimentos, permitindo que um receptor metabotrópico ligado a fosfolipase C, PLCs, possa elevar a concentração intracelular desse íon (Putney, 1999).

A função do cálcio como segundo mensageiro é fundamental em diversas respostas celulares, participando tanto em eventos como secreção, contração muscular, diferenciação e proliferação celular, bem como morte por apoptose (Pusl and Nathanson, 2004). A sinalização mediada por cálcio é bastante complexa na maioria das células, em hepatócitos, tem sido descrito que o cálcio regula funções como secreção biliar, motilidade canalicular, transcrição gênica, apoptose, liberação de glicose, potencial de membrana mitocondrial, entre outras (Leite e Nathanson, 2009). Ainda não está totalmente entendido como este íon pode modular diversas funções, entretanto acredita-se que a amplitude e a frequência dos sinais de cálcio, bem como o padrão espacial e temporal desses sinais, parecem estar diretamente relacionadas a esta especificidade (Pusl et al., 2002; Berridge et al., 2000). Os mecanismos de sinalização de cálcio são, na sua grande maioria, ativados por canais intracelulares de cálcio (Leite and Nathanson, 2009). Os receptores de rianodina (RyR) e os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R) são os principais canais intracelulares de cálcio presentes nas células. Já é estabelecido que nos hepatócitos são encontrados receptores da classe de InsP3Rs, nas duas isoformas I e II.

1.7. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NO FÍGADO

Purinas (ATP, ADP e adenosina) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras, mediando efeitos biológicos diversos, através de receptores denominados purinoceptores (Ralevic, Burnstock, 1998). Estas moléculas sinalizadoras possuem muitas características em comum com outros sinalizadores, pois também possuem um tamanho relativamente reduzido e provêm de moléculas extremamente abundantes dentro da célula, facilitando a sua biodisponibilidade, mas exigindo mecanismos de liberação e degradação bastante eficientes. Purinas e pirimidinas extracelulares possuem efeitos importantes e diversificados sobre muitos processos biológicos, incluindo neurotransmissão, contração do músculo liso, secreção, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária, dor, modulação da função cardíaca, entre outros.

No fígado, a sinalização purinérgica regula funções primordiais á célula como o metabolismo de glicose e lipídeos, a síntese de proteínas e secreção iônica, bem como participação em processos homeostáticos, tais como ciclo celular, resposta inflamatória e imunidade (Vaughn *et al*, 2012; Haussinger *et al*, 1987). No entanto, a alteração da sinalização mediada por purinas desloca o equilíbrio para estados patológicos, favorecendo a aparecimento e progressão da lesão do fígado, mesmo em situações de assepsia, uma condição descrita como lesão estéril (Menezes *et al*, 2011).

Durante a prolongada estimulação ao ATP, os canais dos receptores P2X tornam-se cada vez mais permeáveis a moléculas orgânicas grandes (North, 2002). Todos os subtipos de receptores P2X foram identificados no fígado, sendo P2X₇ e P2X₄ os mais amplamente distribuídos (Fausther *et al*, 2012). A distribuição dos receptores P2X é altamente dependente do tipo celular. Assim, os hepatócitos expressam P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ e P2X₇, mas não, P2X₆ (Fausther *et al*, 2012; Gonzales *et al*, 2007). Outras células do fígado, tais como colangiócitos, células de Kupffer, células estreladas e células endoteliais também expressam diferentes receptores do tipo P2X (Beldi, *et al*, 2008).

Há pouca informação disponível sobre a expressão de receptores P2Y no tecido hepático. Pensa-se P2Y₂ que é a grande isoforma encontrada nos hepatócitos, onde a sua ativação favorece a sobrevivência das células (Ayata *et al*, 2012). Os hepatócitos também expressam os receptores do tipo P2Y1-like e P2Y2-like nas membranas mitocondriais, que funcionam como sensores de ATP citoplasmático. Estímulo para esses receptores requer concentrações nanomolares de ATP. Assim, em condições em que os níveis intracelulares de ATP são reduzidos, estes receptores são transitoriamente ativados, o que resulta em um

aumento do influxo de cálcio e síntese de ATP (Belous *et al*, 2006). Além disso, os receptores P2Y podem ser encontrados em outros tipos de células hepáticas, tais como células estreladas, em que a expressão dos subtipos de proteína varia, dependendo o seu estado de ativação (Friedman, 2008).

No entanto, pouco se sabe sobre a função dos receptores purinérgicos durante a FHA, bem como as consequências da ativação destes receptores nos mecanismos da atividade de leucócitos na lesão estéril, *in vivo*, sejam como possíveis estímulos quimiotáticos ou mesmo de função efetora, como indutores de explosão respiratória (produção de espécies reativas de oxigênio) e desgranulação (liberação de enzimas e proteínas antimicrobianas granulares) (Brinkmann *et al*, 2004). Dados recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que peptídeos formilados mitocondriais e ATP participam da ativação de células e quimiotaxia de neutrófilos para o sítio de lesão, respectivamente, em um modelo de lesão estéril por queimadura no fígado (McDonald *et al*, 2010). Corroborando com trabalhos publicados nos últimos anos relatam que células NK, NKT (Liu *et al*, 2004) e neutrófilos (Liu *et al*, 2006) podem participar do desenvolvimento da lesão estéril induzida por paracetamol, nosso grupo demonstrou que animais que não possuíam estas células desenvolveram uma lesão significativamente menor quando comparada àquela em animais normais (Marques *et al*, 2012). Esses dados, em conjunto com o conhecimento prévio sobre DAMPs e inflamação, sugerem que o sistema imune tem um importante papel na gênese e na severidade da lesão estéril, e, portanto representa um alvo para intervenções terapêuticas a fim de controlar tal fenômeno e as doenças do qual ele participa.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a sinalização purinérgica, bem como a participação diferencial dos seus receptores, durante o desenvolvimento da falência hepática aguda induzida por sobredose de paracetamol.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar se o metabolismo do ATP extracelular melhora a lesão hepática aguda induzida por APAP.
2. Investigar se os receptores de purinas participam do desenvolvimento da FHA.
3. Avaliar a contribuição da sinalização por ATP como agente inflamatório local ou sistêmico.
4. Investigar a expressão de receptores purinérgicos em células HepG2 tratadas com paracetamol .
5. Investigar a expressão de receptores purinérgicos em pacientes diagnosticados com hepatite não- viral.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, a partir de quatro semanas de idade, com peso aproximado de 25g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os animais foram acondicionados em grupos de cinco por gaiola, com ração (Labina) e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (25°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12h), com exceção da noite anterior aos experimentos, onde foram mantidos em jejum até o início do mesmo. Os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo 051/11).

3.2. INDUÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA E COLETA DE AMOSTRAS: MODELO DE FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

O modelo escolhido para o desenvolvimento desta dissertação foi à lesão hepática induzida por sobredose de paracetamol. Baseado nos trabalhos de Williams *et al*, Hu *et al*, Liu *et al* e Imaeda *et al*, e em resultados do grupo (curva dose-resposta) a dose padrão de paracetamol (*acetaminophen* – N-acetil-*para*-aminofenol - APAP) utilizada foi de 500 mg/kg, e o tempo de sacrifício dos animais a 24^a hora após a administração do fármaco (Marques *et al*, 2012). O APAP foi administrado por via oral (gavagem) dissolvido em salina estéril aquecida, enquanto que os animais controle receberam apenas o veículo aquecido. Na 24^a hora os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e submetidos a uma laparotomia. Foi realizada uma sangria por cisão simultânea da artéria aorta e veia cava inferior, de onde uma amostra de sangue foi coletada para obtenção do soro e dosagem de ALT. O fígado foi retirado e seus lobos coletados em formaldeído 4% tamponado (PBS), para histologia, e congelados em tubos para realização do ensaio de mieloperoxidase (MPO) e para dosagem de citocinas. O pulmão retirado foi destinado para histologia e lavado broncoalveolar (BAL).

3.3. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Para realização dos tratamentos farmacológicos foram utilizados diversos antagonistas de receptores purinérgicos:

1-Teofilina: (1,3-Dimethylxanthine, 2,6-Dihydroxy-1,3-dimethylpurine, 3,7-Dihydro-1,3-dimethyl-1*H*-purine-2,6-dione): É um antagonista de receptores purinérgicos do tipo P1, não-seletivo. O antagonista foi utilizado na dose de 20 mg/Kg para bloqueio farmacológico *in vivo* (Sigma, USA).

2-Reactive Blue: 1-Amino-4-[[4-[[4-chloro-6-[[3 (or 4)-sulfophenyl]amino]-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfophenyl]amino]-9,10-dihydro-9,10-dioxo-2-na). É um antagonista de receptores purinérgicos do tipo P2Y, seletivo. O antagonista foi utilizado na dose de 100 mg/Kg para bloqueio farmacológico *in vivo* (Sigma, USA).

3-Suramina: (8,8'-[Carbonylbis[imino-3,1-phenylene ecarbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene) carbonylimino] bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt). É um antagonista de receptores purinérgicos P2 não-seletivo, porém não é capaz de bloquear os subreceptores da família P2, como P2X₄, P2X₆, P2Y₄ e P2Y₁₄. Este antagonista foi utilizado nas doses de 5,0 mg/Kg para bloqueio farmacológico *in vivo* (Sigma, USA).

4-TNP-ATP:(2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphatetetra (triethylammonium) salt). 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}. O antagonista foi utilizado nas doses 1,0 mg/Kg para bloqueio farmacológico *in vivo* (Sigma, USA).

5-OXI-ATP: (Adenosine 5'-triphosphate-2',3'-dialdehyde). Antagonista de receptores P2X₇, promove efeito similar ao tratamento com aprirase. O antagonista foi utilizado nas doses de 9,0 mg/Kg para bloqueio farmacológico *in vivo* (Sigma, USA).

Todos os grupos de bloqueadores de receptores purinérgicos utilizados como tratamento foram solubilizados em salina estéril e aplicados na calda dos camundongos

através de injeção intravenosa (i.v), após 2h do tratamento com paracetamol na dose de 500 mg/Kg.

3.4. APIRASE

Para avaliar a clivagem de ATP extracelular, foi utilizado neste ensaio a 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. Neste ensaio os animais da raça C57BL/6 foram tratados com Apirase na dose de 20 unidades/0,2 ml solubilizada em salina estéril, a mesma foi aplicada após duas horas de tratamento com paracetamol na cauda do camundongo, através da administração intravenosa.

3.5. VISUALIZAÇÃO DA MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA PELA TÉCNICA DA MICROSCOPIA CONFOCAL INTRAVITAL

A microscopia intravital é uma técnica bastante valiosa no que se refere à observação *in vivo* e em tempo real da microvasculatura e das interações das células, como os leucócitos, com estes vasos. Esta técnica permite a visualização bem como a quantificação de leucócitos em rolamento e aderidos aos vasos, além daqueles transmigrados para o interior dos tecidos, os quais são eventos bem estabelecidos como indicativos de inflamação tecidual. Considerando isso, a microscopia intravital de fígado de camundongos foi realizada utilizando um microscópio confocal Olympus Fluoview e corantes fluorescentes, a fim de observar as interações leucócito-sinusóide, o número total de leucócitos aderidos e possíveis zonas de quimiotaxia, sob as diferentes condições experimentais propostas. Para este fim, usamos um pequeno suporte de acrílico, posicionamos o camundongo anestesiado e expusemos seu fígado a uma distância adequada da objetiva. Após esta pré-montagem, o camundongo recebeu uma injeção do corante fluorescente inespecífico Rodamina 6G (150 µL; 0,05%) ou do anticorpo fluorescente de escolha (5µL/animal), por via intravenosa. Em seguida, uma área do tecido hepático em boas condições foi selecionada e focalizada, a partir da qual vídeos de 60 minutos foram coletados para análise subsequente. O microscópio confocal está localizado no Departamento de Física (ICEX - UFMG), e foi utilizado com o auxílio da Profa. Ana Maria de Paula.

3.6. QUANTIFICAÇÃO DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) PARA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA LESÃO HEPÁTICA

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

3.7. ESTIMATIVA DO INFILTRADO NEUTROFÍLICO PELO ENSAIO DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

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

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

3.8. OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

O lavado bronco-alveolar foi realizado para verificar a presença de leucócitos presentes no espaço alveolar. Após a anestesia, a traquéia de cada animal foi exposta e canulada com um cateter de polipropileno de 1.7 mm. O lavado foi feito através da injeção de três alíquotas de 0,5 mL de solução salina 0.9% estéril, injetadas e recolhidas 2 vezes cada uma, obtendo-se 0.7 – 1.1 mL de volume final recuperado do lavado. O líquido recolhido do lavado foi centrifugado em tubos de 5 mL a 4 °C, por 5 minutos, a uma velocidade de 1500 rpm, formando um precipitado utilizado para contagem total e diferencial de células. O sobrenadante foi congelado para posteriores ensaios de detecção de citocinas e quimiocinas. O precipitado de células foi ressuspensionado em 100 µL de BSA 3%, e o número total de leucócitos foi determinado por contagem das células coradas com solução de Turk no hemocitômetro padrão de Neubauer. As contagens totais foram feitas em microscópios ópticos com objetiva de 40X. Para a contagem diferencial, as lâminas foram preparadas por citocentrifugação (Cytospin 3, Shandon) e foram coradas com May-Grunwald-Giemsa, de acordo com protocolo de coloração hematológica padrão. As contagens diferenciais foram realizadas em microscópios ópticos com objetiva de 100X, utilizando-se óleo de imersão.

3.9. CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

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

utilizando um micrótomo e coletados em lâminas histológicas, as quais foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE).

3.10. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

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

- *Nota 0* – Não houve lesão presente.
- *Nota 1/2* – As células necróticas individuais observadas na primeira camada de células subjacente a veia centrolobular apresentaram degeneração hialina.
- *Nota 1* – As células necróticas estenderam duas ou três camadas de células da veia centrolobular.
- *Nota 2* – As células necróticas estendem três a seis camadas de células a partir das veias centrolobulares, mas limitado em distribuição periférica.
- *Nota 3* – A área de necrose se estendeu de uma veia centrolobular para outra.
- *Nota 4* – Mais grave do que 3, foi classificado quando a área com necrose centrolobular foi extensa ao longo do corte histológico.

O *score* total foi calculado para cada seção de fígado baseado na avaliação de cinco lóbulos por grupo de tratamento.

3.11. DOSAGEM DE CITOCINAS

A produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α e MIP-2 foram quantificadas pela técnica de ELISA em fragmentos de fígado de camundongos submetidos ou não à sobredose de APAP, com ou sem tratamento com Apirase. Os fragmentos de fígado foram pesados e homogeneizados em tampão de extração de citocinas (contendo anti-proteases, Tween 20 e EDTA), e em seguida o sobrenadante foi coletado e armazenado até o dia do ensaio. Para a realização do ensaio utilizamos kits Quantikine Human Immunoassay (R&D System, Abington, United Kingdom) para as referidas citocinas.

3.12. CULTURA CELULAR

Células da linhagem HepG2 (carcinoma hepático imortalizado) doadas pela Prof. Dr. Maria de Fátima Leite (Laboratório de Sinalização de Cálcio, ICB, UFMG) e foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina. As células foram repicadas na proporção de 1:4 partes de meio de cultura, a cada 3 dias. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 por poço, em placas de 96 poços.

3.13. INDUÇÃO DE LESÃO POR PARACETAMOL EM CULTURA CELULAR

Como análise complementar do estudo da lesão hepática por paracetamol e para definir a participação dos receptores purinérgicos nesta doença, utilizamos uma versão *in vitro* do modelo de falência hepática aguda, que se baseia na incubação das células HepG2 com APAP. Avaliando nossos resultados preliminares e os trabalhos de Dai & Cederbaum, e Zhang *et al*, a dose padrão de paracetamol escolhida foi 5 mM, e o tempo de análise da viabilidade celular a 24^a hora após a administração do fármaco. Os grupos experimentais receberam 150 μ L de uma solução de APAP a 5 mM dissolvido em meio RPMI sem soro fetal com 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo aquecido. Na 20^a hora, o sobrenadante foi recolhido para análises posteriores, sendo substituído por 150 μ L de meio RPMI para o ensaio com MTT.

3.14. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT

Para comprovar a viabilidade celular da linhagem HepG2 com ou sem tratamentos, foi realizado o teste de produção de cristais de formazan após incubação com o reagente MTT (3,4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) obtido da Sigma. As células dessa linhagem foram plaqueadas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino, em uma densidade de 10^5 células por poço em um volume final de 150 μ L/poço por 24 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos e substituídos por meio sem soro fetal bovino, com ou sem tratamento, acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO). Após 20 horas de tratamento, os sobrenadantes foram retirados para ensaio de viabilidade, 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 sem soro fetal bovino. Da solução final, foram adicionados 140 μ L/ poço. As placas serão incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C 5% CO₂. Após o período de incubação, os sobrenadantes serão retirados. Os cristais de formazan formados serão solubilizados em 100 μ L de DMSO por poço. A densidade óptica será lida em um leitor de ELISA a uma absorbância de 595 nm. Grupos que não receberem APAP serão considerados como 100% viáveis; a viabilidade de cada amostra tratada será apresentada como um percentual desta.

3.15. PACIENTES

Foram analisados e incluídos em nosso estudo seis pacientes diagnosticados com insuficiência hepática aguda não-viral com suspeita de indução por droga, eles se dirigiram à Clínica do Hospital Federal do Rio de Janeiro, especializado em doenças de fígado. Os critérios de inclusão estabelecidos foram os pacientes apresentarem coagulopatia (tempo de protrombina superior a 15s) ou Razão Normalizada Internacional (INR) $\geq 1,5$, encefalopatia hepática dentro de 8 semanas, icterícia e não apresentar histórico de doença hepáticas. Amostras de fígado foram também obtidas a partir de quatro doadores saudáveis para os experimentos. A expressão de receptores purinérgicos e ectonucleotidases foi quantificada por PCR em tempo real. Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional (CEPFiocruz 22/03), e realizado com um consentimento informado por todos os participantes. O protocolo do estudo obedeceu às normas éticas da Declaração de Helsinque de 1975. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se ANOVA (Tukey pós-teste) e teste t de Student. Os valores foram considerados estatisticamente quando $P < 0,05$.

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4. RESULTADOS

4.1. TRATAMENTO COM APAP PROMOVE NECROSE CELULAR GENERALIZADA

Já é bem caracterizado que o tratamento com sobredose de APAP através da geração do seu metabólito tóxico, NAPQI, induz extensas áreas de necrose celular. Dados do nosso grupo mostraram que camundongos tratados com uma dose de 500mg/Kg de APAP, após um intervalo de 24 horas (Marques et al, 2012), apresentam extensas áreas de morte celular que podem ser visualizadas através de cortes histológicos e coloração com H&E. Isso pode ser observado através das imagens dos cortes histológicos, que evidenciam no nosso grupo controle, animais tratados com salina, áreas homogêneas, com coloração normal e presença de hepatócitos preservados com suas membranas visualmente íntegras, caracterizando um tecido saudável (Figura A e B). Quando analisamos a Figuras C e D, grupo de animais que receberam uma dose de 500mg/Kg de APAP, percebemos consideráveis alterações na morfologia do tecido, evidenciada pelas extensas áreas de necrose, vacuolização, cariólise e uma desorganização completa da estrutura dos hepatócitos. O tecido apresenta coloração heterogênea, e é possível observar a presença de infiltrado inflamatório, caracterizando um tecido extensamente inflamado e com perda de função.

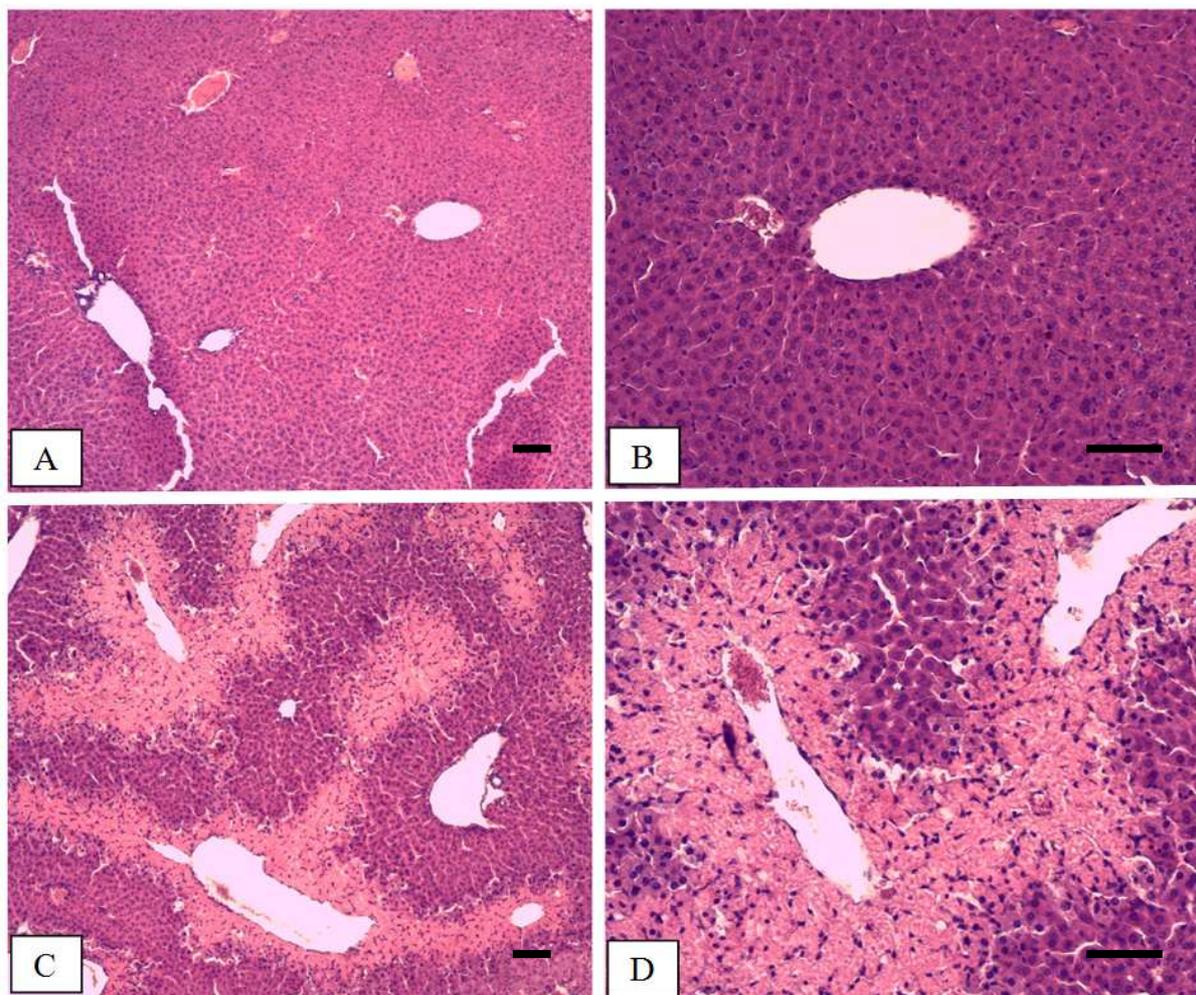


FIGURA 1 - Tratamento com APAP promove áreas de necrose. Cortes histológicos representativos do fígado de camundongos saudáveis (A e B) e submetidos à sobredose de APAP (C e D). APAP (500mg/kg) foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP e seus fígados fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. A escala em menor aumento (A e C) corresponde a 100 μ m e em maior aumento (B e D) corresponde a 50 μ m.

4.2. TRATAMENTO COM APAP INDUZ INTENSO INFILTRADO NEUTROFÍLICO NO TECIDO HEPÁTICO

Através da visualização do parênquima hepático pela técnica de microscopia intravital, e da utilização de camundongos transgênicos que expressam GFP em seus neutrófilos (Lysm-eGFP), demonstramos que durante o tratamento com APAP ocorre um expressivo recrutamento de neutrófilos para o fígado inflamado, que pode ser observado através da figura B, quando comparada com o grupo controle, figura A, que evidencia uma malha sinusoidal preservada com pouco ou nenhum leucócito recrutado, após a gavagem com salina. Também observamos que, na 24^a hora, o influxo de neutrófilos aparentemente se localiza em áreas circunscritas onde não se percebe a arquitetura convencional do tecido, ou seja, prováveis zonas de tecido necrótico, como as observadas pela figura B.

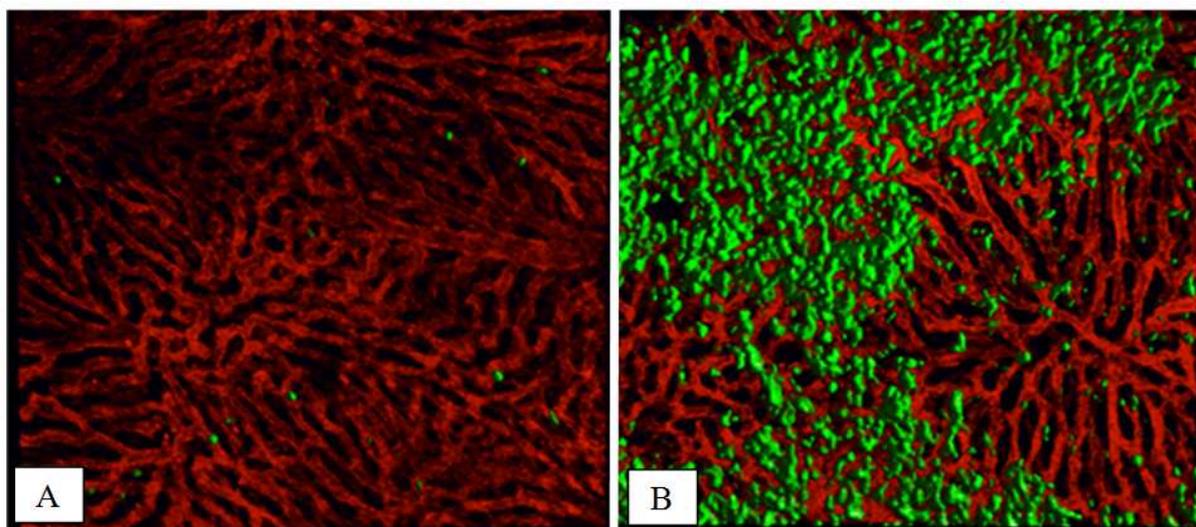


FIGURA 2 - Tratamento com APAP induz recrutamento de neutrófilos para o fígado. Através da técnica de microscopia intravital podemos observar o parênquima hepático corado em vermelho pela rodamina 6G (0.05%) e neutrófilos em verde (camundongo Lysme-GFP). Os camundongos que foram tratados com APAP (500mg/kg) administrado por via oral (gavagem), apresentam intenso recrutamento de leucócitos (figura B) quando comparados com os animais que receberam salina aquecida (figura A). Os animais tiveram seu fígado exposto e visualizado 24 horas após a administração de APAP.

4.3. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR SOBREDOSE DE APAP

Para investigarmos a participação do ATP durante o desenvolvimento da falência hepática aguda, inicialmente metabolizamos essa purina do meio, através do tratamento com a ATPase, apirase, uma enzima que cliva o ATP extracelular. Dessa forma pudemos avaliar se a ausência dessa purina promovia diminuição da lesão hepática, tendo em vista que dados apontam que o ATP extracelular pode ser um fator parácrino de morte celular e que o tratamento com paracetamol promove liberação desse nucleotídeo. Para tal finalidade tratamos os camundongos com a apirase na concentração de 20 U diluída em 200 µL de salina estéril, aplicada após duas horas do tratamento com APAP. Observamos, então, que os animais tratados com apirase tiveram redução da lesão hepática, induzida por APAP 500mg/Kg em comparação ao nosso grupo controle, comprovada através da redução dos níveis séricos de ALT, conforme demonstrado no Gráfico 1. No mesmo gráfico ainda pode ser visualizado que o tratamento quando é realizado pela apirase de grau VII a redução da lesão hepática ocorre de maneira ainda mais significativa, corroborando a idéia que a presença de ATP no compartimento extracelular atua com um fator agravante para o desenvolvimento e manutenção do quadro da FHA.

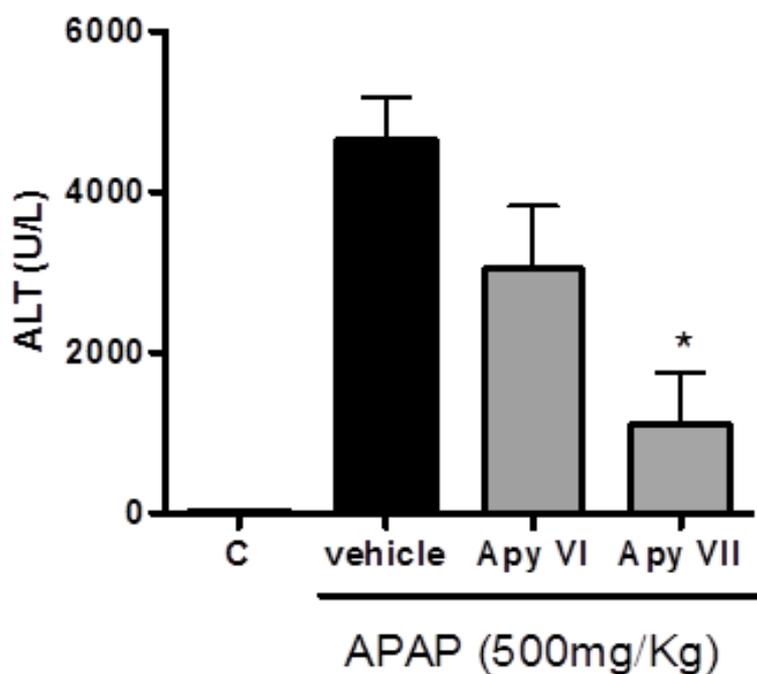


Gráfico 1 - Apirase diminui a lesão hepática induzida por sobredose de APAP. Camundongos C57BL/6 tratados com salina (controle, n=5), ou tratados com APAP 500mg/Kg (veículo, n=8) e tratados por 24 horas com ou sem apirase 20U (Apirase, n=5). Foi observado diminuição da lesão hepática no grupo tratado com apirase de grau VII quando comparado ao tratamento apirase de grau VI. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$, com relação ao seu controle).

4.4. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ ÁREAS DE NECROSE

Sabendo que o tratamento com Apirase reduz a lesão hepática, nós queríamos avaliar se este mesmo tratamento promovia redução das áreas de necrose induzidas pela sobredose de APAP. Corroborando os nossos resultados anteriores que demonstram através da dosagem sérica da enzima hepática, ALT, o tratamento com Apirase reduz a lesão hepática e consequentemente às áreas de necrose também foram significativamente diminuídas. Quando analisamos a Figura A e B, grupo de animais que receberam uma dose de 500mg/Kg de APAP, observamos consideráveis alterações na morfologia do tecido, evidenciada pelas extensas áreas de necrose, coloração heterogênea, com ruptura celular, núcleos fragmentados e presença de infiltrado inflamatório, caracterizando um tecido extensamente inflamado e com perda de função. Já quando observamos a Figura C e D, grupo de animais que receberam Apirase duas horas após tratamento com APAP, observamos que o comprometimento do tecido descrito anteriormente é consideravelmente revertido com o tratamento com essa ATPase.

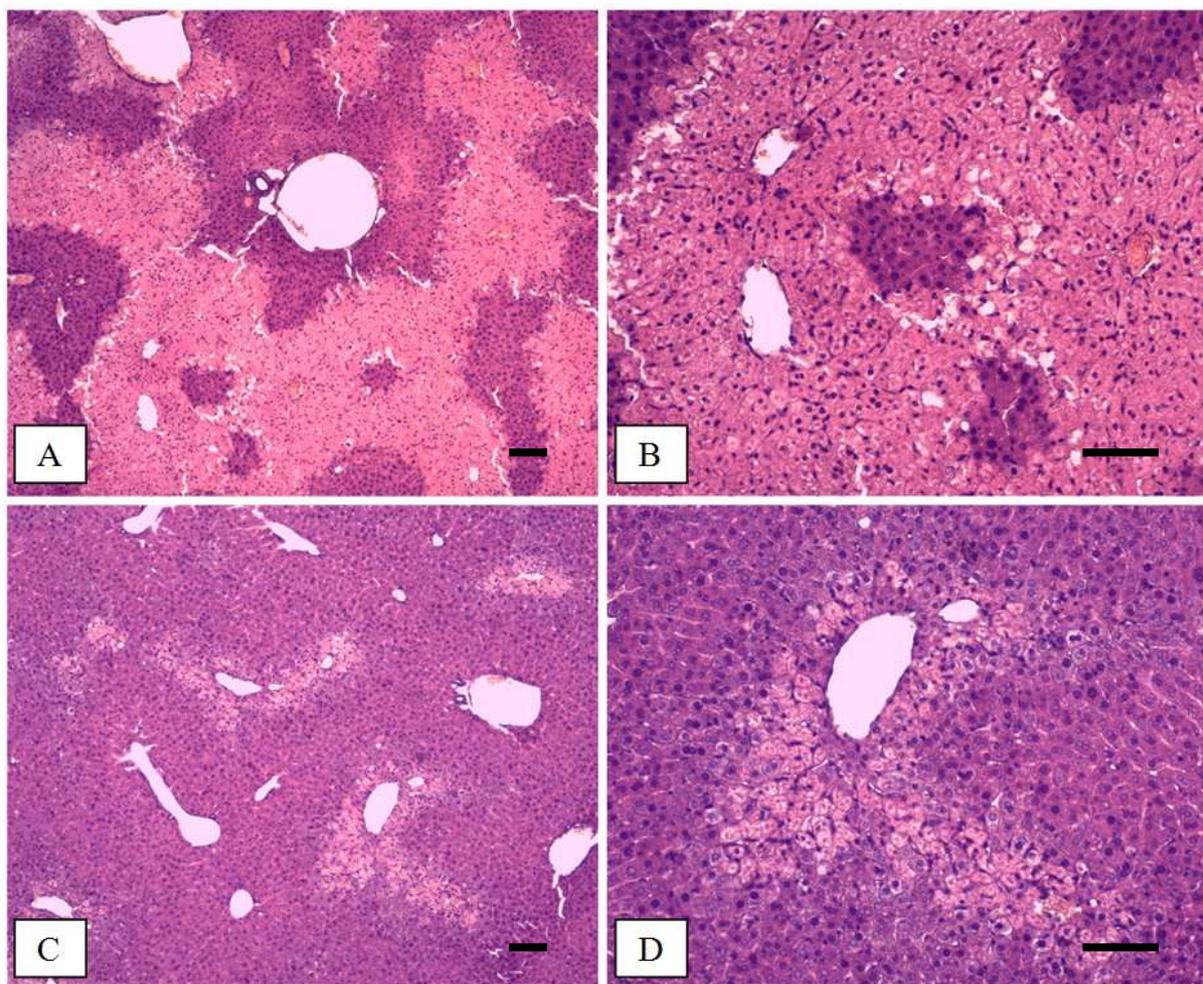


FIGURA 3 - Tratamento com apirase reduz áreas de necrose. Cortes histológicos representativos do fígado de camundongos submetidos á sobredose de APAP (A e B) e submetidos ao tratamento com Apyrase (C e D). O APAP (500mg/kg) foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. A apirase foi aplicada após duas horas de tratamento com o APAP, injeção intavenosa. Os animais (C57BL/6) foram sacrificados 24 horas após a administração de APAP e seus fígados fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. A escala em menor aumento (A e C) corresponde a 100 μ m e em maior aumento (B e D) corresponde a 50 μ m.

4.5. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ A DOSAGEM DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Depois de estabelecido que o tratamento com apirase reduz a lesão hepática, comprovada pela diminuição dos níveis séricos de ALT, queríamos saber se o mesmo tratamento com a enzima que metaboliza o ATP extracelular promovia redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Citocinas como IL-1 β , TNF- α e MIP-2 são conhecidas por seu papel pró-inflamatório no organismo e por isso foram quantificadas através da técnica de ELISA. Como pode ser observado pelo Gráfico 2, o tratamento com APAP aumenta os níveis dessas citocinas, em contrapartida o tratamento com apirase reduz significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias quando comparadas com o nosso grupo veículo, animais que receberam somente APAP. Estes dados nos indicam mais uma vez que um processo inflamatório ocorre no fígado necrótico, e que o aumento dos níveis séricos de citocinas pode estar causando um dano excessivo a este tecido, via recrutamento ou ativação de células do sistema imune.

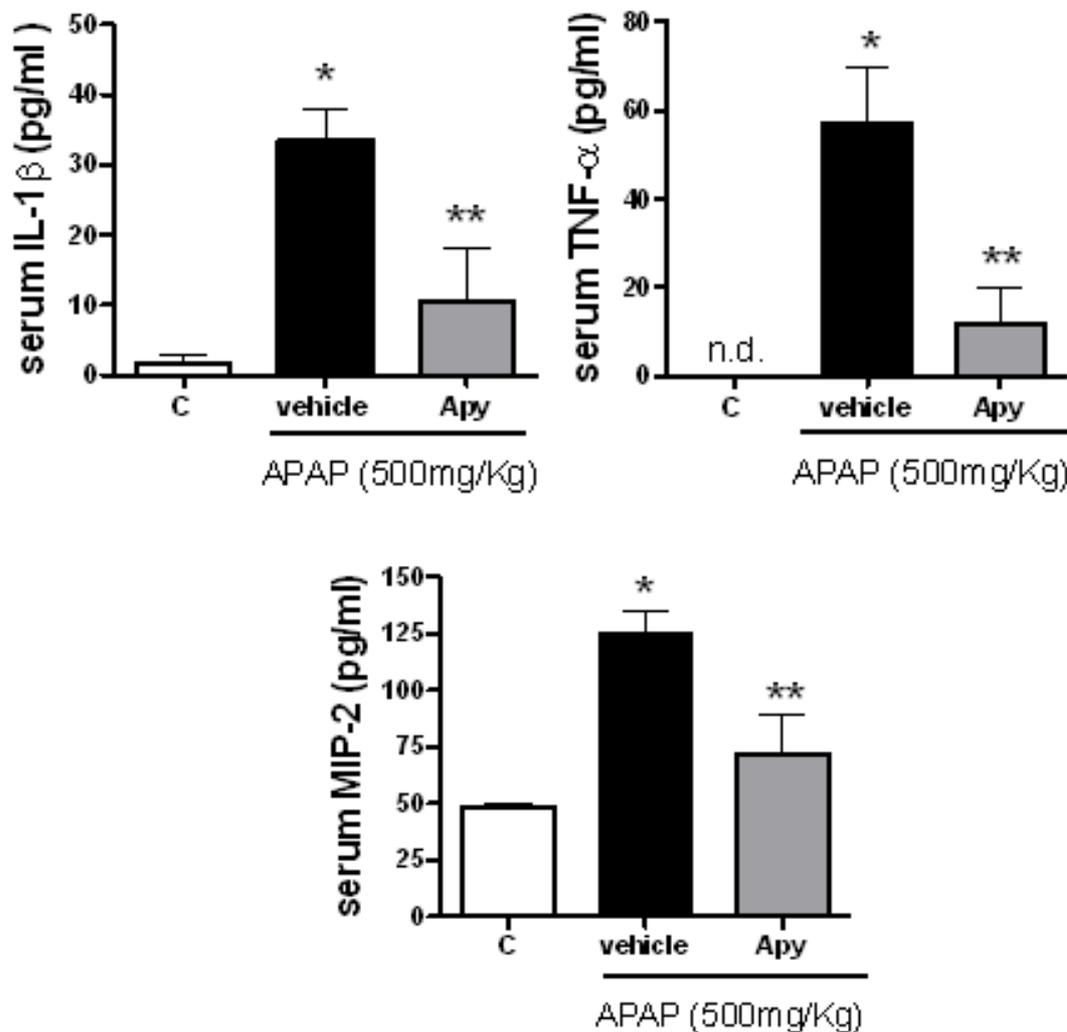


Gráfico 2 - Tratamento com apirase reduz níveis séricos de citocinas. Camundongos C57BL/6 que foram tratados com apirase duas horas após administração APAP (500 mg/Kg) por gavagem, dissolvido em salina aquecida. Os animais foram sacrificados na 24^a hora, e seus fígados foram coletados para extração de citocinas. A quantificação foi feita com o kit Quantikine human immunoassay (R&D Systems). O grupo que recebeu apirase apresentou redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e MIP-2, quando comparada com o veículo. A diferença estatística foi indicada por *(p < 0,05) entre o grupo salina e os grupos APAP. Enquanto que a diferença estatística indicada por **(p < 0,05) foi determinada entre os grupos APAP e Apirase.

4.6. TRATAMENTO COM APIRASE REDUZ O INFLUXO DE NEUTRÓFILOS PARA O TECIDO HEPÁTICO

Avaliamos se o tratamento com apirase além de promover alterações na lesão hepática, através da redução sérica da ALT, também seria capaz de promover alteração no recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático. Para tal realizamos a dosagem da enzima mieloperoxidase, MPO, expressa especialmente por neutrófilos, dessa forma quantificamos indiretamente o infiltrado neutofílico no tecido hepático. Como pode ser observado no Gráfico 3 os animais que receberam apirase após o tratamento com APAP apresentam uma redução no perfil de recrutamento dessas células. De forma a corroborar com esse dado nós realizamos, através da visualização do parênquima hepático, a técnica de microscopia intravital, utilizando camundongos transgênicos que expressam GFP em seus neutrófilos (Lysm-eGFP), e foi possível observar que o principal tipo de leucócito recrutado no fígado é o neutrófilo e que o influxo deste no tratamento com apirase é de fato diminuído (Figura C), quando comparado com o animal que recebeu APAP (Figura A). Também observamos que, na 24^a hora, o influxo de neutrófilos aparentemente se localiza em áreas circunscritas, onde não se percebe a arquitetura convencional do tecido, indicando possíveis áreas de necrose.

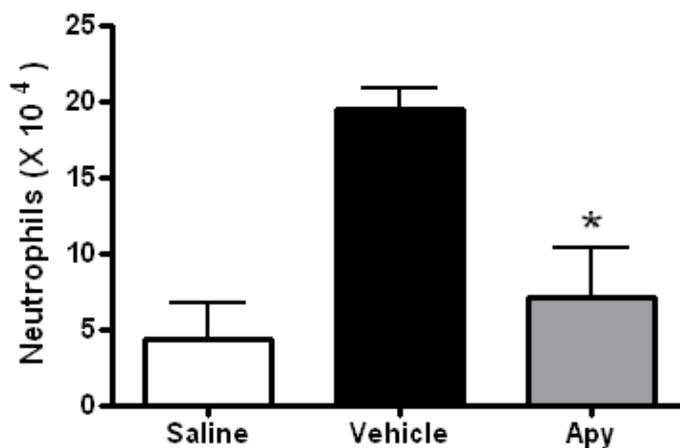


Gráfico 3 - Tratamento com apirase reduz infiltrado neutrofílico no tecido hepático. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500mg/Kg), injeção intravenosa de apirase (20 U). Como pode ser observado pelo gráfico o tratamento com apirase promove redução no recrutamento de neutrófilos para tecido lesado quando comparado com o grupo veículo, camundongos que receberam somente o APAP. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$).

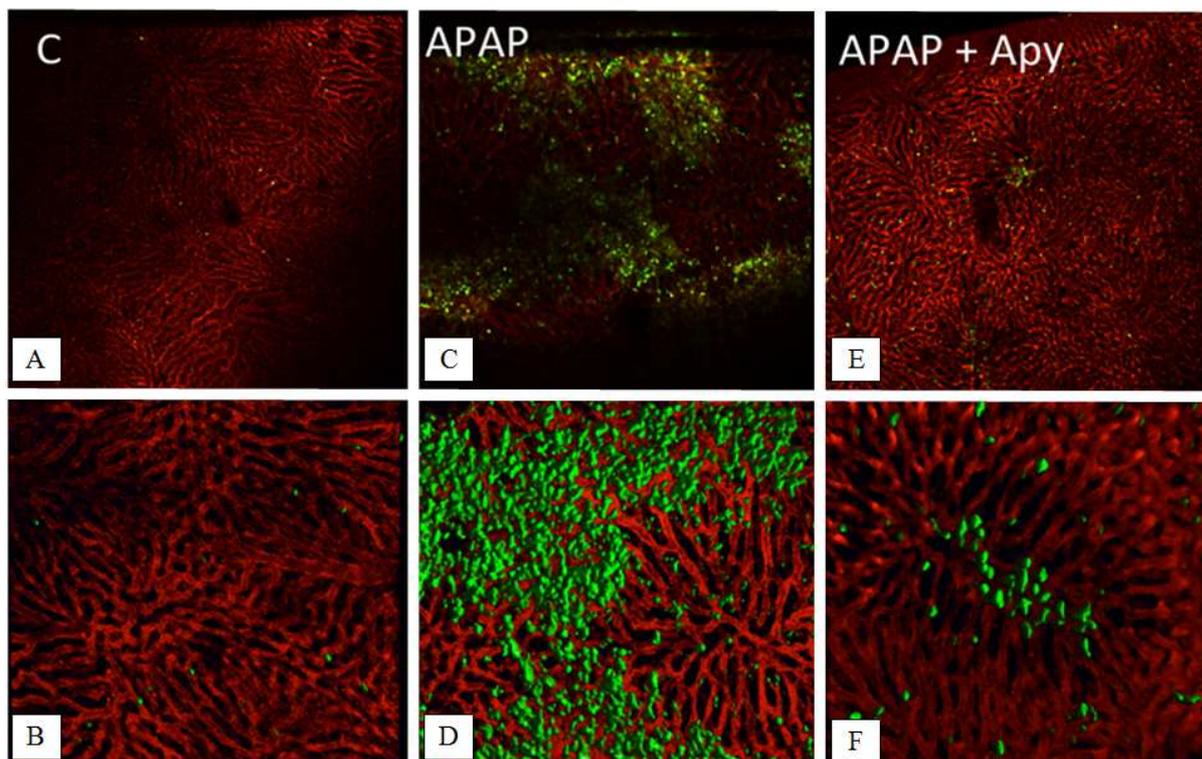


FIGURA 4 - Tratamento com apirase reduz recrutamento de neutrófilos para tecido hepático. Observa-se o parênquima hepático corado em vermelho por rodamina 6G (0.05%) e neutrófilos em verde (camundongo Lysme-GFP). Em A (menor aumento) e B (maior aumento) os animais receberam Salina administrada por via oral. Na imagem C (maior aumento) e D (menor aumento) os animais receberam APAP (500mg/kg) administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Na imagem E (menor aumento) e F (maior aumento) os animais receberam apirase (20U) através de injeção intravenosa, após 2 horas do tratamento com APAP. Observa-se uma drástica redução no recrutamento de neutrófilos para o fígado de animal tratado com apirase. Os fígados foram expostos e visualizados 24 horas após a administração de APAP.

4.7. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS PROMOVEM DIMINUIÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA

Com base nos achados referentes à sinalização purinérgica na morte celular induzida por APAP e baseado em dados que estabeleceram que a apirase revertia parte dos efeitos deletérios causados pela sobredose de APAP, nós investigamos se estes efeitos poderiam ser reproduzidos através do bloqueio farmacológico dos diferentes receptores purinérgicos. Utilizamos diferentes antagonistas, com a finalidade de estabelecer quais destes receptores estariam diretamente participando da lesão hepática aguda induzida por sobredose de APAP. Foram utilizados, antagonistas que bloqueiam receptores do tipo P2, bloqueio não-seletivo, através do uso da Suramina (5mg/Kg), antagonista que bloqueia receptores do tipo P2X, bloqueio específico, através do uso do TNP-ATP (1mg/Kg), antagonista específico de receptores do tipo P2X₇, através do uso do OXI-ATP (9 mg/Kg), antagonista, não seletivo, de receptores do tipo P1, através do uso de Teofilina (20 mg/Kg) e por fim utilizamos antagonista, não seletivo, dos receptores do tipo P2Y, através do uso de Reactive Blue (10 mg/Kg). Como pode ser observado pelo Gráfico 4, os tratamentos com Suramina e Teofilina não promoveram diminuição da lesão hepática, em contrapartida, pelo mesmo gráfico, podemos notar que o tratamento com os bloqueadores TNP-ATP e OXI-ATP promoveram de forma estatisticamente significativa redução nos níveis de ALT, quando comparado com o nosso grupo controle. Este resultado nos sugere que a proteção hepática existente pelo bloqueio da sinalização purinérgica, atua via receptores do tipo P2X e mais especificamente pelo receptor P2X₇.

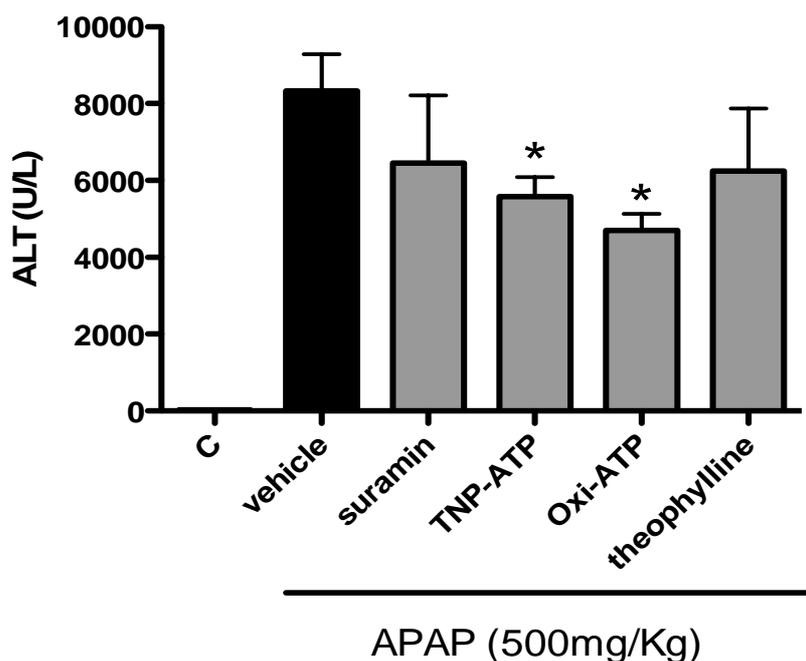


Gráfico 4 - Antagonistas de receptores purinérgicos reduzem lesão hepática. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500 mg/Kg), injeção intravenosa de diferentes antagonistas de receptores purinérgicos. Para tanto, os animais foram divididos em seis grupos (com n=5 por grupo) e foram tratados com os bloqueadores nas doses correspondentes, suramina (5mg/Kg), TNP-ATP (1mg/Kg), OXI-ATP (9 mg/Kg) e teofilina (20mg/Kg). Como pode ser observado pelo gráfico o tratamento com os antagonistas de receptores do tipo P2X e P2X₇ promoveram redução da lesão hepática. A diferença estatística foi indicada por *(p < 0,05).

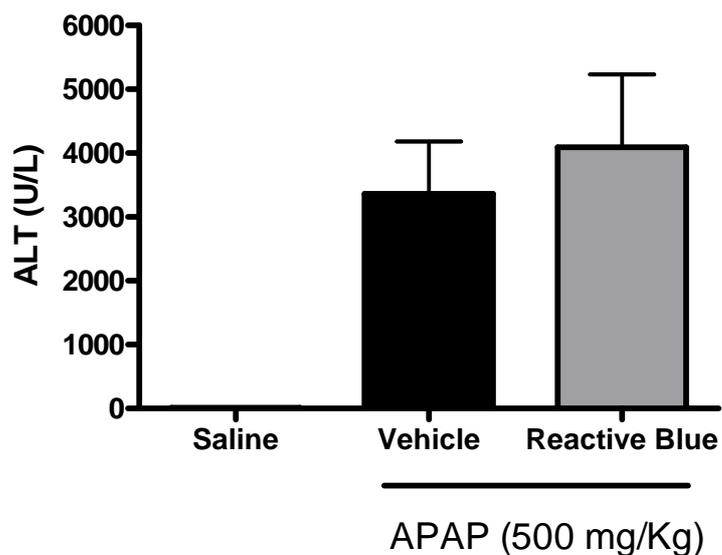


Gráfico 5 - Tratamento com antagonista de receptor do tipo P2Y não diminuí lesão hepática. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500mg/Kg), injeção intravenosa do antagonista do receptor purinérgico do tipo P2Y, Reactive Blue (100 mg/Kg). Como pode ser observado pelo gráfico o bloqueio dos receptores do tipo P2Y não promove redução da lesão hepática. A diferença estatística foi indicada por $*(p < 0,05)$.

4.8. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DIMINUEM RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS

Como já demonstrado, o tratamento com antagonistas dos receptores purinérgicos promovem redução da lesão hepática, medida através dos níveis séricos de ALT. Sabendo disso nós queríamos avaliar o perfil de recrutamento de neutrófilos diante desses tratamentos. Para tanto, foram utilizados antagonistas para os receptores do tipo P2, bloqueio não-seletivo, através do uso da Suramina (dose de 5mg/Kg), antagonista receptores do tipo P2X, bloqueio específico, através do uso do TNP-ATP (dose de 1 mg/Kg), antagonista específico de receptores do tipo P2X₇, através do uso do OXI-ATP (dose de 9 mg/Kg), e por fim utilizamos o antagonista, não seletivo, de receptores do tipo P1, através do uso de Teofilina (dose de 20 mg/Kg). Como pode ser observado pelo Gráfico 6, os tratamentos com os antagonistas dos receptores purinérgicos promoveram de forma estatisticamente significativa a redução do recrutamento de neutrófilos, em contrapartida, pelo mesmo gráfico podemos notar que o tratamento com o antagonista do receptor P1, Reactive Blue, não promoveu alteração no recrutamento de neutrófilos quando comparado com o nosso grupo veículo. O resultado encontrado indica que a proteção hepática existente pelo bloqueio da sinalização purinérgica, pode se dar através da diminuição no influxo de neutrófilos, via receptores do tipo P2.

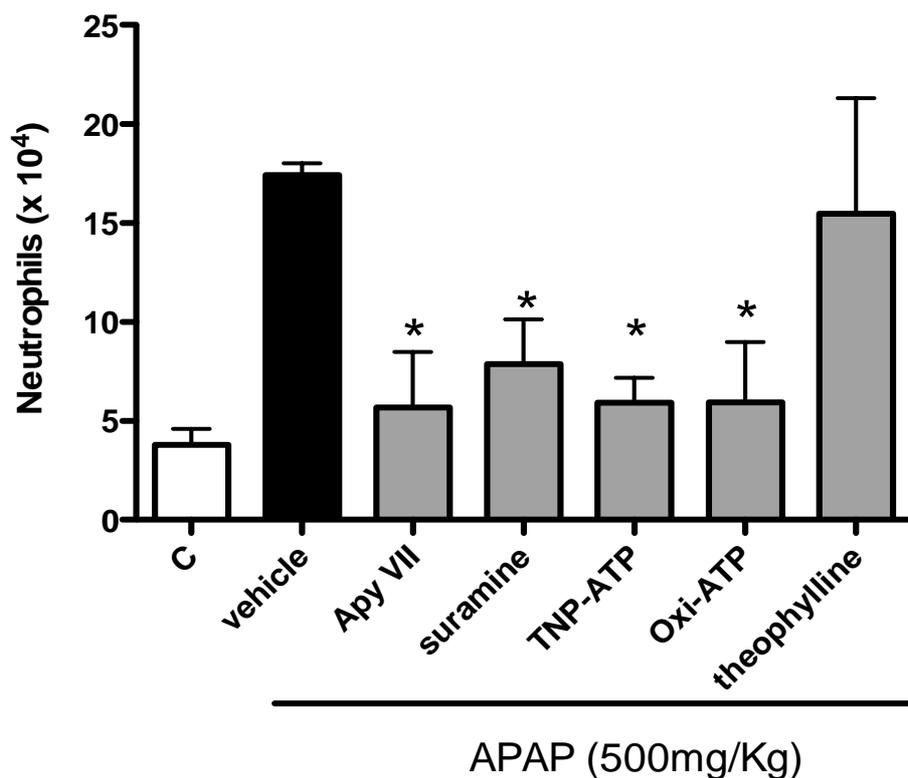


Gráfico 6 - Antagonistas de receptores purinérgicos reduzem recrutamento de neutrófilos. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500 mg/Kg), injeção intravenosa de diferentes antagonistas de receptores purinérgicos. Para tanto, os animais foram divididos em seis grupos (com n=5 por grupo) e foram tratados com os bloqueadores nas doses correspondentes, apirase (20 U), Suramina (5mg/Kg), TNP-ATP (1mg/Kg), OXI-ATP (9 mg/Kg) e Teofilina (20mg/Kg). Como pode ser observado pelo gráfico o tratamento com os bloqueadores de receptores purinérgicos diminuem o recrutamento de neutrófilo para o fígado, em contrapartida o tratamento com o antagonista de P1 não demonstrou alteração desse perfil. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$).

4.9. TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTOR DE ADENOSINA AUMENTA LESÃO HEPÁTICA

Baseado no resultado obtido no Gráfico 4, o tratamento com bloqueadores de ATP promovem redução da lesão hepática, porém quando é aplicado um tratamento similar, utilizando um antagonista inespecífico de receptores do tipo P1, receptores para adenosina, esse perfil de proteção não é obtido. Para confirmarmos este resultado nós reproduzimos o tratamento nas mesmas condições e obtivemos o mesmo resultado anterior, ou seja o bloqueio de receptores de adenosina agravou a lesão hepática induzida por APAP (Gráfico 7).

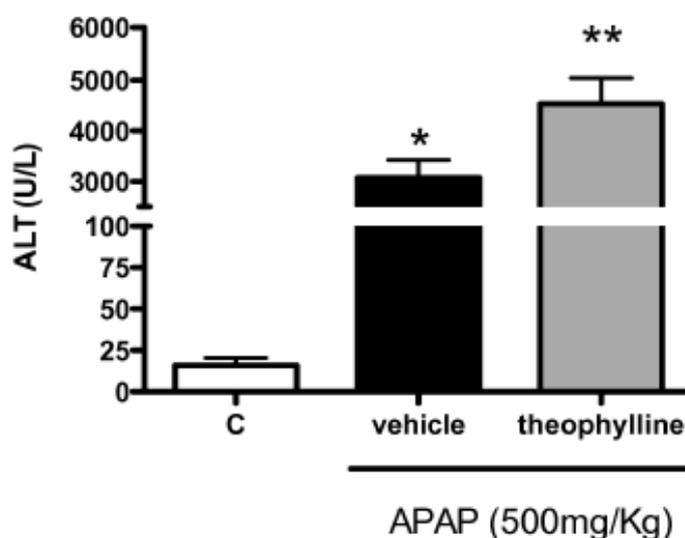


Gráfico 7 - Tratamento com antagonista de receptor purinérgico do tipo P1 aumenta lesão hepática induzida por APAP. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500mg/Kg), injeção intravenosa do antagonista do receptor purinérgico do tipo P1, Teofilina, (20 mg/Kg). Como pode ser observado pelo gráfico o bloqueio dos receptores do tipo P1 agravou a lesão hepática mediada por APAP. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$) entre os grupos controle e APAP, enquanto que a diferença estatística indicada por **($p < 0,05$) ocorre entre os grupos APAP e Teofilina.

4.10. TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES PURINÉRGICOS DIMINUEM ÁREAS DE NECROSE APÓS TRATAMENTO COM APAP

Corroborando com a diminuição de ALT sérica de camundongos após a sobredose de APAP, a histologia dos fígados destes animais tratados com antagonista de receptores purinérgicos, do tipo P2X e P2X₇ evidencia uma considerável redução das áreas de necrose oncótica centrolobular. Como pode ser observado pelas Figuras 6. A e B, camundongos tratados com APAP, apresentam uma lesão característica do envenenamento por APAP, extensas áreas de necrose oncótica centrolobular, disseminada por todo o órgão (JAMES *et al*, 2003). Contudo quando analisamos as Figuras 6. C e D, camundongos que receberam tratamento com antagonista de receptores P2X, TNP-ATP, observamos que as lesões são significativamente reduzidas. O mesmo se aplica quando analisamos as figuras 6E e F, camundongos tratados com antagonista de receptores do tipo P2X₇. É possível observar graves alterações morfológicas no parênquima hepático de animais tratados, quando comparados a animais que não receberam APAP. Na área de necrose e seus arredores há vacuolização, cariólise e uma desorganização completa da estrutura dos hepatócitos (Figura 2B e 2D).

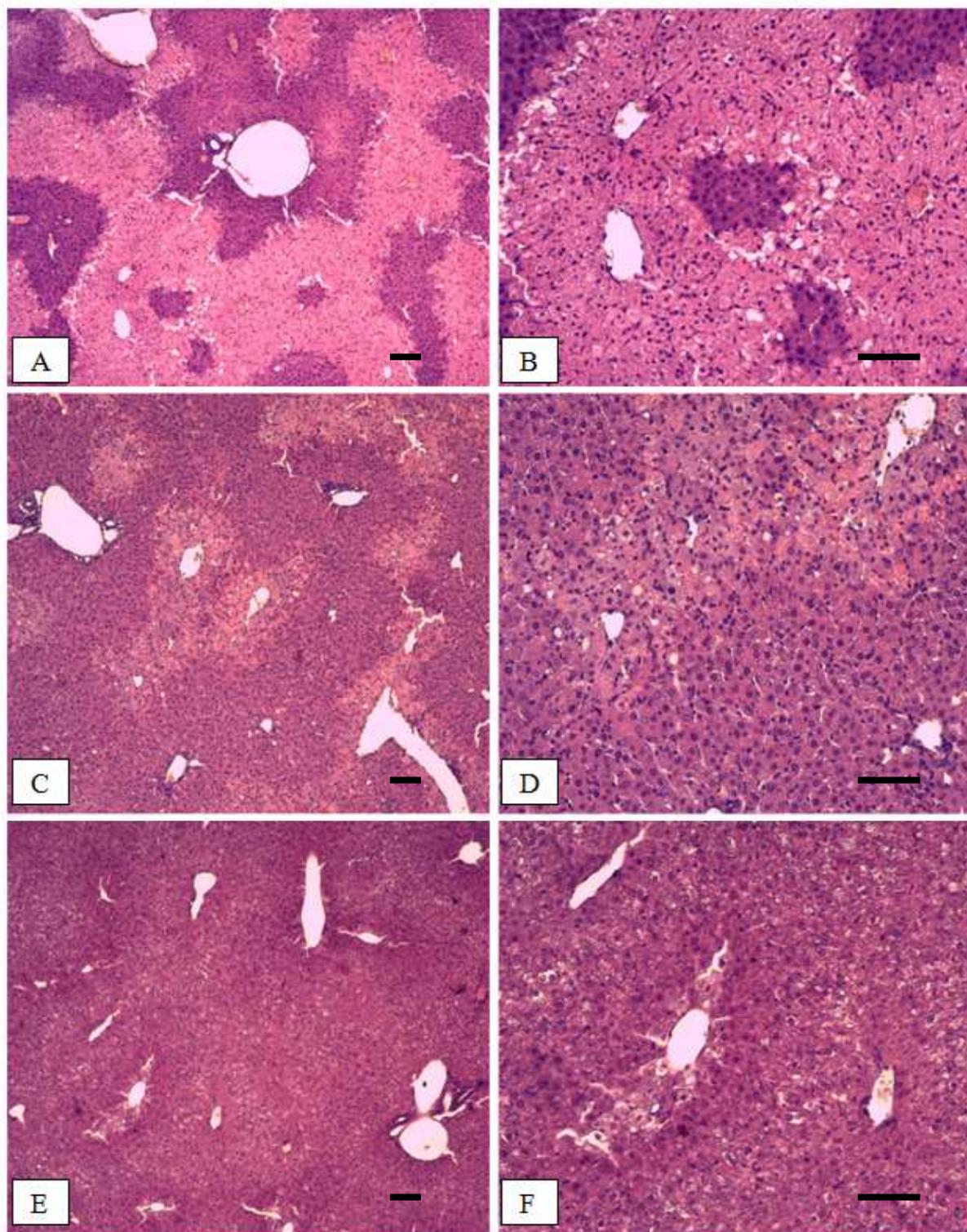


FIGURA 5 - Tratamento com antagonistas de receptores purinérgicos diminuem áreas de necrose. Cortes histológicos representativos do fígado de camundongos submetidos á sobredose de APAP (500mg/Kg), figura A e B e submetidos ao tratamento com TNP-ATP (1mg/Kg), figura C e D e ao tratamento com OXI-ATP (9 mg/Kg), figura E e F. O APAP foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida. Os bloqueadores foram

aplicados após duas horas de tratamento com o APAP, através de injeção intravenosa. Como observado pelas imagens o tratamento com antagonistas de receptores purinérgicos diminuem áreas de necrose, em comparação ao veículo. Após 24 horas dos tratamentos os fígados dos animais foram fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. A escala em menor aumento (A, C e E) corresponde a 100 μ m e em maior aumento (B, D e F) corresponde a 50 μ m.

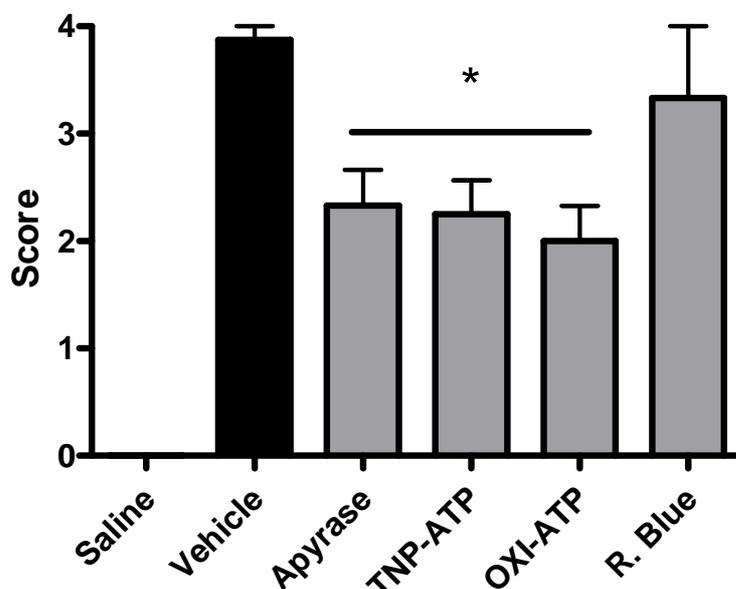


Gráfico 8 - Tratamento com antagonistas de receptores purinérgicos diminuem o *Score* histológico. Fígados de camundongos tratados com APAP e tratados com antagonistas de receptores purinérgicos foram fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. Após este procedimento as lâminas confeccionadas foram analisadas seguindo critérios anteriormente descritos. Como pode ser observado pelo gráfico o tratamento com bloqueadores dos receptores purinérgicos do tipo P2X, P2X₇ e o tratamento com apirase reduziram a lesão hepática mediada por APAP. Em contrapartida o bloqueio por antagonista de receptores P1 não promoveu esse efeito. A diferença estatística foi indicada por * ($p < 0,05$).

4.11. SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA ATUA DE FORMA DELETÉRIA NA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA, PORÉM NÃO PARTICIPA DA INFLAMAÇÃO PULMONAR

Nossos dados demonstram até aqui que a inflamação mediada pela sinalização purinérgica atua contribuindo para a exacerbação da lesão hepática, entretando nós queríamos avaliar se esse mesmo evento observado se aplicaria para a inflamação pulmonar. Para isto nós realizamos a análise histopatológica e contagem diferencial de leucócitos nos pulmões dos animais controle, animais tratados com APAP e animais que receberam apirase após duas horas do tratamento com APAP. Dessa forma podemos observar na Figura 6 e no Gráfico 9 que nenhum efeito foi observado sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão, bem a redução da lesão pulmonar, entretando níveis circulantes de DNA mitocondrial mantiveram aumentados mesmo após tratamento com apirase. Sugerindo que a sinalização purinérgica participa somente da lesão hepática.

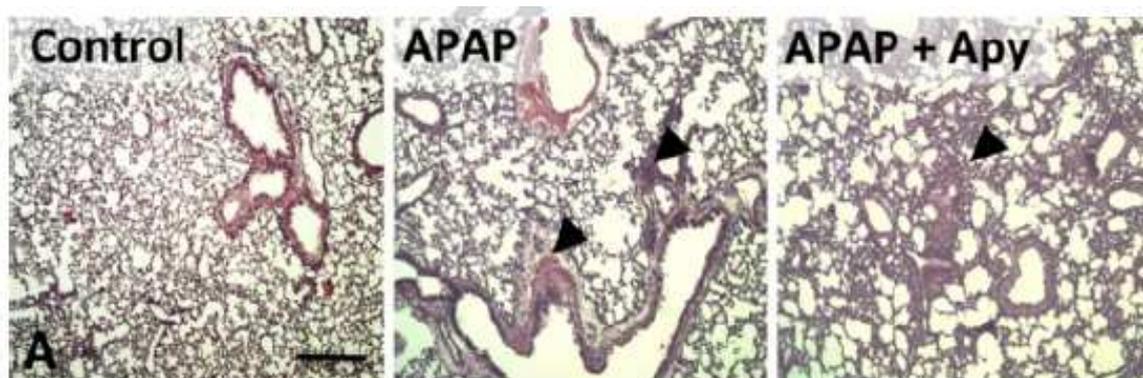


FIGURA 6 - O bloqueio da sinalização purinérgica não promove alteração na lesão pulmonar. Cortes histológicos representativos do pulmão de camundongos submetidos à gavagem com salina, controle, animais tratados com sobredose de APAP (500mg/Kg) e animais tratados com apirase. O APAP foi administrado por via oral (gavagem), dissolvido em salina aquecida e a apirase foi aplicada após duas horas de tratamento com o APAP, através de injeção intravenosa. Como observado pelas imagens o tratamento com apirase não altera as áreas de fibrose. Após 24 horas dos tratamentos os pulmões dos animais foram fixados em formaldeído e processados para histologia. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos e corados com H&E. A escala corresponde a 100 μ m.

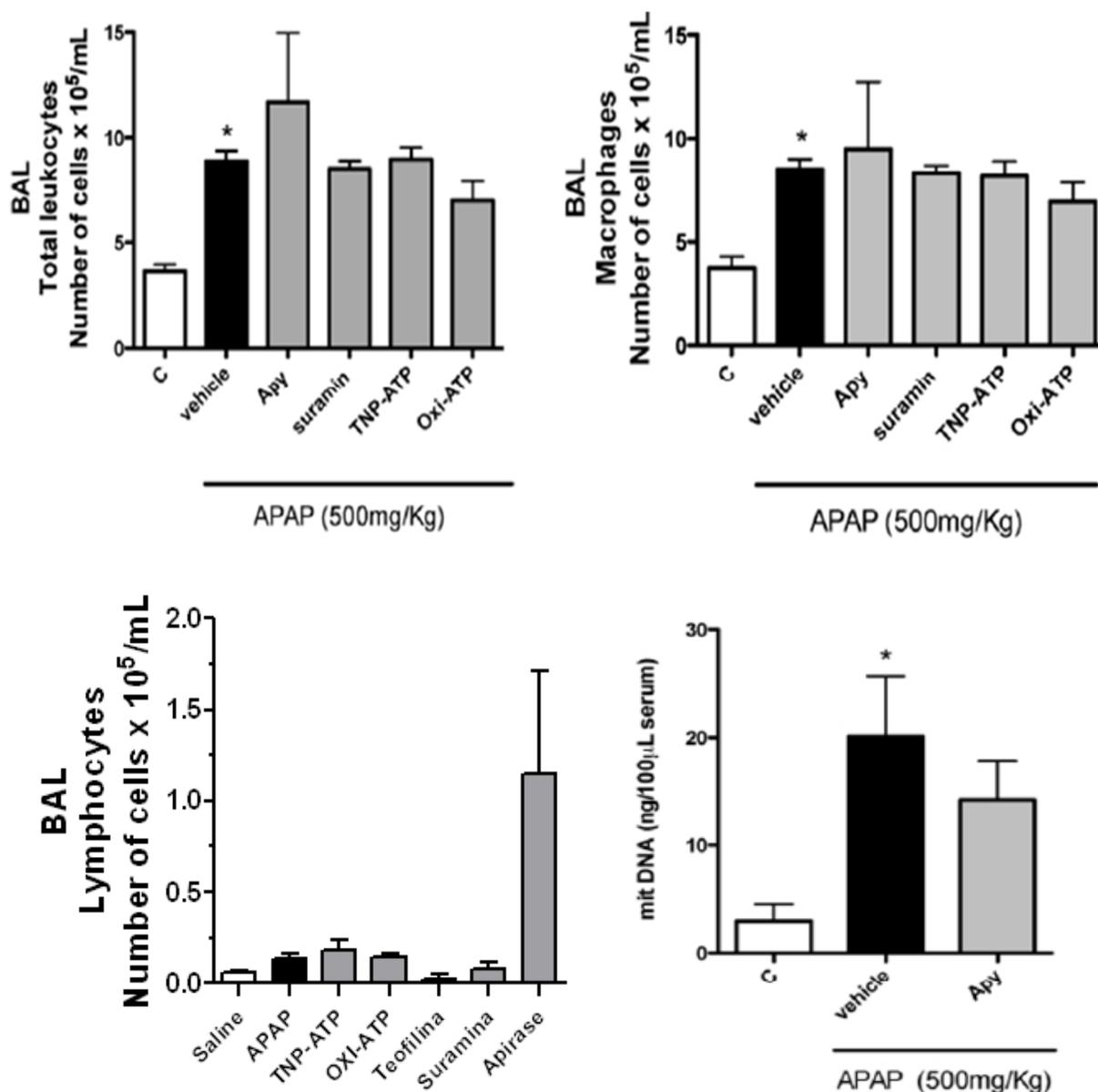


Gráfico 9 - Bloqueio da sinalização purinérgica e metabolismo do ATP extracelular não diminuem lesão pulmonar. Camundongos C57BL/6 receberam, após duas horas do tratamento com APAP (500 mg/Kg), injeção intravenosa de diferentes antagonistas de receptores purinérgicos. Completada 24 horas após tratamento com APAP, os animais foram sacrificados e o lavado bronco-alveolar foi realizado. Camundongos tratados com APAP apresentaram número elevado de leucócitos, demonstrando que a inflamação pulmonar acontece e que a mesma não foi impedida pelo bloqueio ou metabolismo do ATP extracelular. Os macrófagos foram o tipo celular mais freqüente no LBA. O tratamento com APAP aumentou os níveis de DNA mitocondrial, e este permaneceu elevado mesmo após tratamento com apirase. A diferença estatística foi indicada por $*(p < 0,05)$.

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

O cultivo da linhagem celular hepática HepG2 pode ser utilizado, dentre outras finalidades, para avaliar a citotoxicidade de substâncias e medicamentos em geral. As metodologias *in vitro* mais aceitas são aquelas que utilizam células humanas derivadas do fígado, como hepatócitos primários e linhagens celulares de hepatocarcinomas, incluindo a linhagem celular HepG2. A HepG2 é uma linhagem celular imortalizada não-tumorigênica proveniente de um carcinoma hepatocelular humano. Essa linhagem retém muitas funções celulares muitas vezes perdidas por hepatócitos primários.

Não obstante, o APAP em altas concentrações é tóxico para estas células, e reproduz fielmente o perfil já observado em nossos experimentos *in vivo*. APAP inviabiliza células HepG2 de forma dose- e tempo-dependente. Para padronização de experimentos *in vitro*, foi realizado curva dose-resposta a fim de avaliar qual seria a dose de APAP indicada, como pode ser observado pelo Gráfico 10, a dose de 5 mM reduziu em aproximadamente 50% a viabilidade celular, em comparação com células não tratadas. De forma similar foi realizado um experimento tempo resposta para determinação do melhor momento para a coleta de dados. Foi demonstrado que na 24^a hora houve perda de 50% da viabilidade celular, como observado pelo Gráfico 11. Dessa forma, foi determinado que, para os experimentos posteriores seriam adotados a dose de APAP a 5 mM e o tempo de 24 horas.

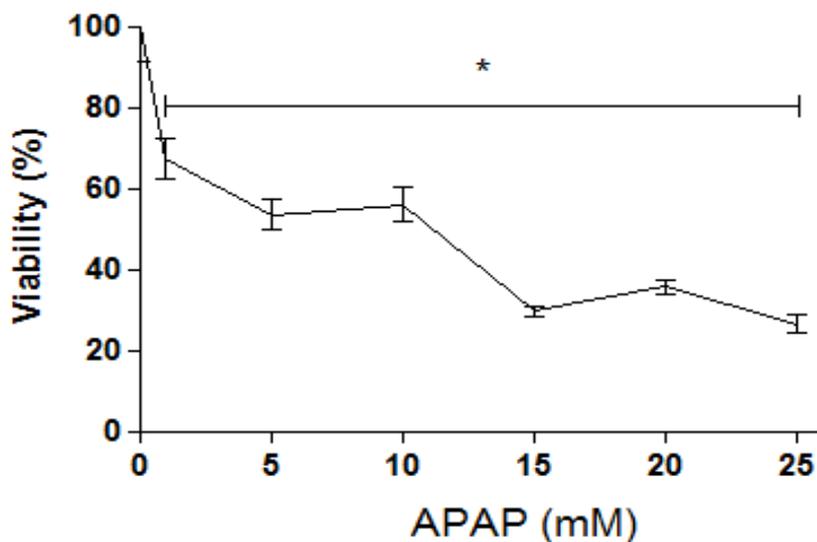


Gráfico 10 - Curva dose-resposta de APAP. Células HepG2 foram cultivadas e plaqueadas a uma densidade de 10^5 células/poço por 24 horas. Foram utilizadas as doses de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 mM. Foi então determinado que a dose de 5mM, tendo em vista que a mesma é compatível com a LD 50. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$). Amaral (2012)

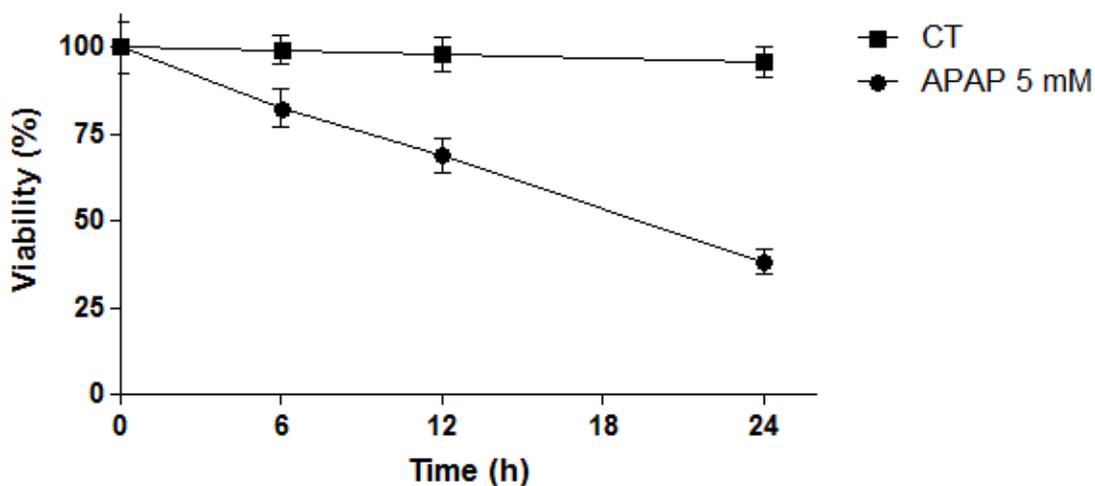


Gráfico 11 - Curva tempo-resposta de APAP 5 mM. Células HepG2 foram incubadas a 10^5 células/poço pelos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas. Foi determinado, então, o tempo de 24 horas de incubação para os experimentos posteriores, uma vez que o mesmo corresponde à LD 50. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$). Amaral (2012).

4.13. O TRATAMENTO COM APAP ALTERA O PERFIL DE EXPRESSÃO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM CÉLULAS HEPG2

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na sensibilidade elevada para purinas extracelulares, os mRNA foram isolados a partir de células HepG2 incubadas ou não com APAP e a expressão de receptores purinérgicos foram avaliados. A análise de quantitativa por PCR revelou que vários receptores do tipo P2 (P2X1, P2X2, P2X3, P2X7, P2Y2, P2Y4) e ectonucleotidasas (NTPDase 2 e 6) foram regulados positivamente durante a incubação com APAP quando comparados com os nossos controles, Gráfico 12. Considerando os efeitos prejudiciais de uma sinalização exacerbada de ATP extracelular, a hipótese de que a expressão elevada de ectonucleotidasas pode consistir em um mecanismo de restrição da sinalização por ATP e consequente proteção celular, permitindo que o ATP extracelular seja metabolizado à adenosina. De forma a corroborar o dado, foi mostrado anteriormente que o bloqueio dos receptores de adenosina promovem aumento da lesão hepática atribuindo à esse receptor um papel de proteção, Gráfico 7. Além disso, foi observado também que células incubadas com APAP demonstram aumento da expressão de receptores de adenosina, do tipo A2a (A2aR), confirmando seu papel resolutório na inflamação, Gráfico 12.

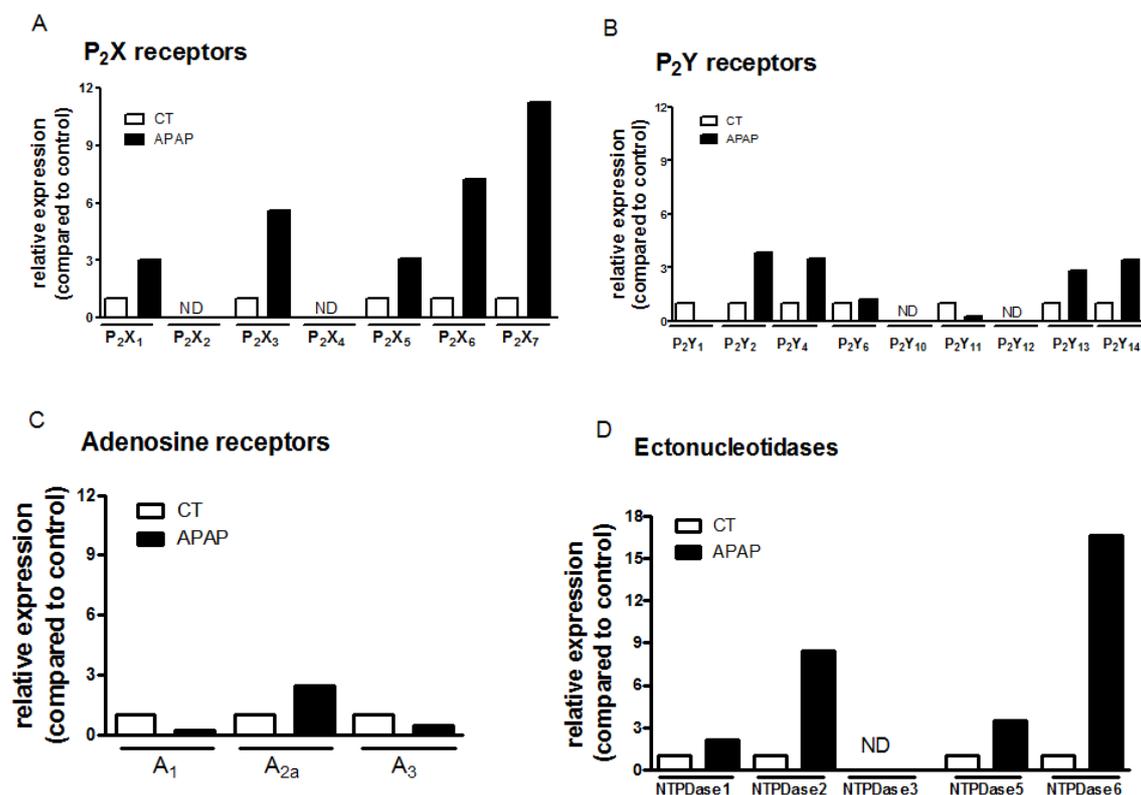


Gráfico 12 - O tratamento com APAP altera a expressão de receptores purinérgicos. As células HepG2 foram cultivadas na presença ou ausência de APAP (5mM) durante 24 horas, e o RNA total foi extraído para ensaio enzimático por PCR em tempo real. As células HepG2 não tratadas representaram os valores basais, enquanto que as demais células apresentaram aumento na expressão dos receptores purinérgicos. Os dados foram apresentados como média de dois experimentos independentes, ambos executados usando quintuplicatas.

4.14. AUMENTO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS FORAM IDENTIFICADOS EM PACIENTE DIAGNOSTICADOS COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA NÃO VIRAL

Foram analisados e incluídos em nosso estudo seis pacientes diagnosticados com insuficiência hepática aguda não viral, com suspeita de indução por droga, eles se dirigiram à Clínica do Hospital Federal do Rio de Janeiro, especializado em doenças do fígado. Os critérios de inclusão estabelecidos foram os pacientes apresentarem coagulopatia (tempo de protrombina superior a 15s) ou Razão Normalizada Internacional (INR) $\geq 1,5$, encefalopatia hepática dentro de 8 semanas, icterícia e não apresentar histórico de doença hepáticas. Amostras de fígado foram também obtidas a partir de quatro doadores saudáveis para as experiências. Expressão de receptores purinérgicos e ectonucleotidases foram quantificados por PCR em tempo real. Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional (CEPFiocruz 22/03), e realizado com um consentimento informado por todos os participantes. O protocolo do estudo obedeceu às normas éticas da Declaração de Helsinque de 1975. Os valores foram considerados estatisticamente quando $*(P < 0,05)$.

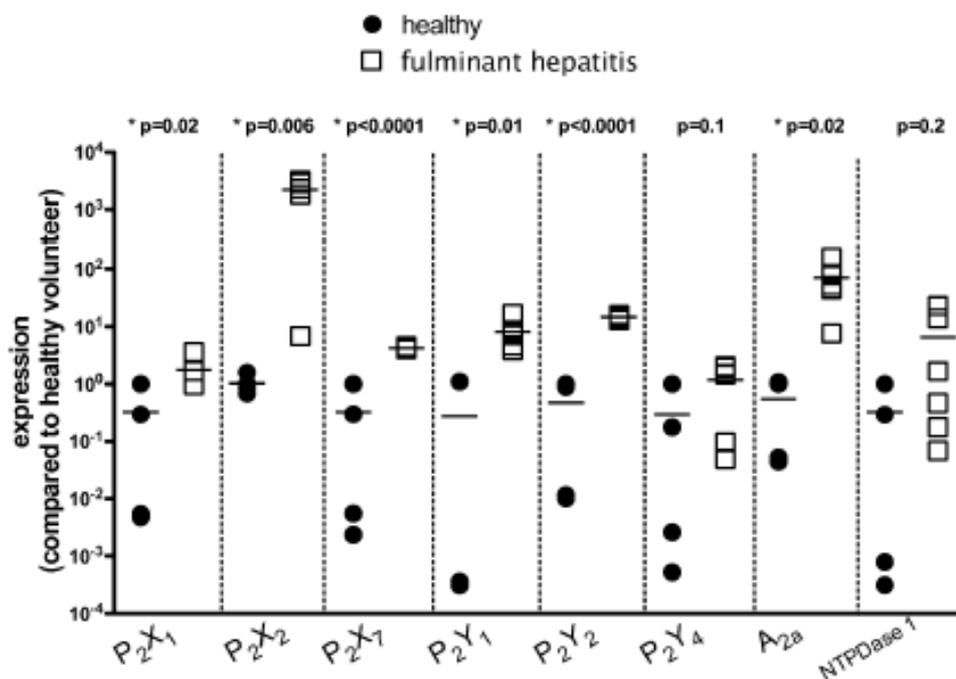


Gráfico 13 - Pacientes com hepatite apresentaram aumento na expressão dos receptores purinérgicos. Seres humanos foram diagnosticados com hepatite, não viral, e a expressão de receptores purinérgicos e ectonucleotidases foi quantificada por PCR em tempo real. A análise quantitativa das amostras de fígados dos pacientes com hepatite revelaram um aumento da expressão de vários receptores purinérgicos, em comparação com voluntários saudáveis. O nosso controle foi determinado por amostras de fígado de pacientes voluntários e saudáveis. A diferença estatística foi indicada por *($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstrou que a sobredose de APAP leva diretamente, de forma tempo e dose dependente, à morte de hepatócitos que culmina em lesão hepática aguda. Esta lesão está relacionada a uma grave e disseminada necrose hepatocelular, evento onde há um grande extravasamento de conteúdo intracelular, produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Durante a lise celular ocorre liberação de algumas substâncias, como o ATP, que quando no meio extracelular atua como potente ativador do sistema imune. Em resposta a isso, ocorre o influxo de neutrófilos para as áreas lesadas do fígado, potencializando o efeito deletério da toxicidade induzida por APAP. Quando metabolizamos o ATP extracelular, através do uso de apirase ou mesmo pelo bloqueio farmacológico dos receptores purinérgicos, através do uso de antagonista seletivos e não-seletivos, verificamos que há diminuição da lesão hepática e redução no recrutamento de neutrófilos para o tecido lesado. Para melhor compreender a participação da sinalização purinérgica neste contexto inflamatório o modelo utilizado já bem estabelecido de lesão hepática aguda induzida por sobredose de APAP (Boyd & Berezky, 1966), que reproduz o perfil observado em pacientes que apresentam clinicamente a doença (Bernal *et al*, 2010). A morte celular desencadeada pela sobredose de APAP é, em parte, pela produção excessiva do metabólito tóxico NAPQI, com o seu excedente não-passível de conjugação com a glutatona. Porém um importante ponto que ainda precisa melhor ser esclarecido é a participação do sistema imune na indução e agravamento do dano hepático por sobredose de APAP.

A sobredose por APAP induz elevação intracelular dos íons cálcio por mecanismos que envolvem disfunção mitocondrial, promovendo dificuldades no manejo dos estoques intracelulares, e liberação de ATP para o meio extracelular. Para estudarmos a participação da sinalização purinérgica na lesão hepática estéril induzida por sobredose de APAP padronizamos uma dose (500mg/Kg) capaz de causar uma lesão hepática reversível e avaliamos a cinética desta lesão hepática ao longo do tempo, percebendo que o pico da lesão foi a 24^a hora (Marques *et al*, 2012). A necrose hepática por APAP possui algumas características específicas, como a localização centrolobular da necrose. O mecanismo desta localização específica ainda não foi esclarecido completamente, mas acredita-se que tenha relação com o repertório enzimático dos hepatócitos desta área (Lee, 2003). Como observado na Figura 1, à avaliação dos cortes histológicos confirmou a correta indução de lesão hepática por APAP, com a localização e as alterações morfológicas esperadas (vacuolização, cariólise

e necrose oncótica). De forma interessante observamos que o tratamento com APAP induz o recrutamento de neutrófilos para o fígado, visualizados através da técnica de microscopia intravital, (Figura 2B), e que a presença destes é coincidente com as áreas de necrose, e seu pico ocorreu após 24 horas do tratamento com APAP. A partir dessa técnica direta, verificamos que o recrutamento de neutrófilos ocorre de maneira significativamente aumentada em comparação ao nosso grupo controle, fígados de camundongos que receberam salina apresentaram uma microvasculatura completamente perfundida como mostrado pela coloração regular dos sinusóides (Figura 2A) . Já como ressaltado anteriormente o tratamento com APAP induz à morte celular por necrose, que por sua vez promove liberação de ATP. Para avaliarmos qual a participação da sinalização dessa purina no contexto da falência hepática aguda, inicialmente, nós metabolizamos essa purina utilizando a apirase, ectonucleotidase sintética, que cliva o ATP extracelular a ADP e AMP e conseqüentemente, outra ectonucleotidase (CD73) cliva AMP em adenosina. O tratamento com apirase reduziu significativamente a lesão hepática (medida através dos níveis séricos de ALT), (Gráfico 1). De forma a corroborar com a diminuição da lesão hepática, o tratamento com apirase, reduziu as áreas de necrose (Figura 3C e D). Considerando o importante papel dos neutrófilos durante a lesão hepática aguda e sabendo que essa população celular é recrutada para o fígado após tratamento com APAP, nós queríamos avaliar se a diminuição da lesão hepática era justificada pelo influxo dessas células. Como pode ser visualizado através da microscopia intravital, os camundongos que foram tratados com apirase de fato apresentam notória redução do recrutamento dessas células (Figura 4) quando comparados com os animais tratados com APAP. De forma quantitativa esse influxo de neutrófilos foi medido indiretamente através da dosagem da MPO, que como esperado teve redução estatisticamente considerável quando comparado com o grupo que recebeu apenas APAP (Gráfico 3).

A inflamação hepática decorrente da sobredose de APAP é bastante descrita na literatura. Levando em conta essa informação e os dados sobre a diminuição de neutrófilos, após tratamento com APAP, é de grande importância que os mecanismos pelo qual esta inflamação decorre sejam definidos. Assim, decidimos quantificar alguns mediadores inflamatórios estabelecidos, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF α e MIP-2, cujo papel no recrutamento de neutrófilos é bastante descrito (Gráfico 2) (ZLOTNIK *et al*, 2006). Para nossa satisfação os níveis séricos das citocinas analisadas estavam aumentados após tratamento com APAP, seguida da diminuição muito expressiva das mesmas citocinas após tratamento com apirase. A diminuição das citocinas pode explicar de forma eficaz a redução

da chegada de neutrófilos na lesão hepática por sobredose de APAP, mas também a redução da ativação dos mecanismos danosos por estas células no tecido.

Seguindo esta linha de raciocínio, onde a sinalização por ATP extracelular atua de forma prejudicial na lesão hepática, realizamos um experimento onde os camundongos foram tratados com diferentes antagonistas de receptores purinérgicos. Os animais receberam após duas horas do tratamento com APAP, antagonistas de receptores do tipo P2, bloqueio não-seletivo, através do uso da Suramina (5mg/Kg), antagonista de receptores do tipo P2X, bloqueio específico, através do uso do TNP-ATP (1mg/Kg), antagonista que possui bloqueio específico de receptores do tipo P2X₇, através do uso do OXI-ATP (9 mg/Kg), antagonista, não seletivo, de receptores do tipo P1, através do uso de Teofilina (20 mg/Kg) (Gráfico 4) e por fim utilizamos antagonista, não seletivo, dos receptores do tipo P2Y, através do uso de Reactive Blue (10 mg/Kg) (Gráfico 5). Observamos que o emprego dos antagonistas de receptores do tipo P2, suramina, bem como o bloqueador de P2Y, reactive blue, não promoveram alteração na lesão hepática mediada por sobredose de APAP. Entretanto, verificamos, que o bloqueio do receptor P2X, TNP-ATP, e P2X₇, OXI-ATP, promoveu redução da lesão hepática de forma estatisticamente significativa. Tais dados sugerem fortemente o envolvimento de receptores do tipo P2X e mais especificamente P2X₇, no processo de lesão hepática induzida pelo fármaco, de um modo independente de receptores P2Y. O bloqueio farmacológico dos receptores purinérgicos também alterou o recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático (Gráfico 8). De forma interessante observamos que o bloqueio dos receptores do tipo P1, através do uso de teofilina, (Gráfico 7) agrava a lesão hepática, isso pode ser explicado pelo seu papel citoprotetor. Quando há elevação de adenosina extra-celular, este nucleotídeo não só anula os efeitos de receptores P2, mas também ativa receptores P1, que possuem efeitos diversos comparados àqueles mediados por receptores do tipo P2 (Beldi *et al*, 2010) dessa forma seu bloqueio anula estes efeitos descritos. Quando analisamos as histologias desses grupos de camundongos tratados com bloqueadores de ATP (Figura 5), observamos que as áreas de necrose estão visualmente reduzidas nos grupos de bloqueadores de receptores purinérgicos do tipo P2X (TNP-ATP) e P2X₇, (OXI-ATP), enquanto que nos demais bloqueios não houve melhora nas áreas de necrose (histologias não mostradas). Para quantificar essas observações, nós realizamos o *score* histológico (N > 5 animais por grupo) dos diversos grupos de antagonistas de receptores purinérgicos testados e como demonstrado (Gráfico 10) foi confirmado que tanto o tratamento com apirase quanto o tratamento com os antagonistas P2X e P2X₇ reduzem de forma estatisticamente significativa a as áreas de necrose induzidas pela toxicidade por APAP.

Até agora, neste estudo, mostramos que a sinalização purinérgica atua de forma deletéria no fígado, entretanto é sabido que durante a FHA induzida por APAP, ocorre uma inflamação pulmonar, explicada em parte por células como, neutrófilos, linfócitos e monócitos estarem 50 vezes aumentados em comparação á outros órgãos (Burns *et al*, 2003), proporcionando um perfil pró-inflamatório durante respostas sistêmicas (Matthay *et al*, 2012). Apesar do hepatoproteção (redução dos níveis séricos de ALT, diminuição das áreas de necrose, adicionada pela redução dos níveis de citocinas circulantes promovidas pelo tratamento com apirase e os bloqueadores de receptores P2X e P2X₇), a inflamação pulmonar não foi alterada (Gráfico 9 e Figura 6). Podemos observar que após tratamento com apirase e com os bloqueadores de ATP, as populações celulares residentes nos pulmões permanecem inalteradas. De acordo com esta interpretação, trabalhos recentes demonstraram que o aumento dos níveis séricos de ATP foram encontrados durante a hepatectomia apenas transitóriamente (aproximadamente 5 minutos), isso pode ser explicado pela presença de ectonucleotidases que rapidamente clivam o ATP extracelular, permitindo que este volte aos valores basais (Graubardt *et al*, 2012). Estes dados sugerem que, enquanto o ATP extracelular desempenha um papel-chave na lesão hepática local, ele não age como mediador da resposta inflamatória sistêmica.

Como o nosso modelo de estudo abrange uma extensa e disseminada lesão necrótica hepática devemos considerar a participação de outros DAMPs como o DNA mitocondrial, como possíveis responsáveis pela manutenção do quadro inflamatório sistêmico apresentado após clivagem do ATP extracelular. Para confirmar nossa hipótese a dosagem sérica de DNA mitocondrial foi realizada. E como apresentado (Gráfico 9), observamos que os níveis desta molécula permanecem aumentados mesmo após tratamento com apirase, sugerindo que seja este o responsável por induzir a inflamação nestes órgãos.

Além dos dados, *in vivo*, apresentados aqui, alguns experimentos foram realizados *in vitro*. Neste contexto, a cultura celular permite isolar os componentes de interesse em uma composição conhecida, e por isso a utilizamos essa metodologia para estudar os efeitos da sinalização purinérgica, bem como a participação dos seus receptores. Para tanto foram utilizadas células imortalizadas de origem hepática (HepG2). No Gráfico 9 é possível observar uma representação *in vitro* do nosso modelo de falência hepática em camundongos, no qual a inviabilização celular por APAP ocorre na dose de 5 Mm, e inclusive chega ao nível mais alto observado na 24^a hora (Gráfico 10), portanto sendo aparentemente representativo do que já observado no modelo *in vivo*.

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na sensibilidade elevada para purinas extracelulares, os mRNA foram isolados a partir de células HepG2 incubadas ou não com APAP e a expressão de receptores purinérgicos foram avaliados. A Análise de quantitativa por PCR revelou que vários receptores do tipo P2 (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄) e ectonucleotidasas (NTPDase 2 e 6) foram regulados positivamente durante a incubação com APAP quando comparados com os nossos controles, (Gráfico 12). Curiosamente, em situações de privação de ATP mitocondrial, como se observada durante a falência hepática aguda induzida por APAP, as células podem utilizar receptores P2 para aumentar cálcio intracelular e conseqüentemente estimular a síntese de ATP dentro da mitocôndria, como tentativa de escapar da morte celular (Bravo *et al*, 2012 e Glancy *et al*, 2012). Portanto, sugerimos que o aumento de vários receptores purinérgicos, observados tanto pelo tratamento das células HepG2 com APAP, quanto pelas análises em biópsias de fígado de pacientes diagnosticados com falência hepática fulminante (Gráfico 13), pode ser entendido como uma estratégia da célula para restringir o sofrendo com aumento do influxo de cálcio mediado pelos receptores do tipo P2.

Em conclusão, nosso trabalho demonstrou que no fígado, o ATP atua não só como ativador do sistema imune, mas também como um DAMP citotóxico, por aumentar a concentração intracelular de cálcio, e que o tratamento com apirase ou bloqueio dos receptores purinérgicos, oferecem uma opção terapêutica para diminuição da inflamação hepática, mas não pulmonar. Além disso, o aumento dos receptores do tipo P2 podem consistir uma estratégia fisiológica para regular funções das células. Estes resultados têm implicações claras na patogênese e na terapia da doença hepática, fornecendo abordagens farmacológicas alternativas para o tratamento da falência hepática aguda.

6. CONCLUSÕES

Nossos dados nos permitem concluir que o tratamento com APAP causa lesão hepática com conseqüente liberação de conteúdo intracelular, que inclui o ATP. Dentro do fígado o ATP atua não só como um ativador do sistema imunológico, mas também como um DAMP, promovendo alteração na homeostase intracelular dos íons cálcio, sendo citotóxico para os hepatócitos. O seu metabolismo por apirase ou a inibição da sinalização, por bloqueio dos seus receptores, reduzem a lesão hepática induzida por APAP. A incubação com APAP modifica a expressão de receptores purinérgicos, levando a um quadro de hiper-responsividade ao ATP, justificando a participação de purinas na patogênese da FHA.

O manejo dos níveis de purinas extracelulares, bem como a modulação dos receptores do tipo P2X, especialmente P2X₇, podem constituir uma importante estratégia fisiológica para regular as funções das células. Estes resultados têm implicações claras para a patogênese e terapia da falência hepática aguda, apontando esta via de sinalização como abordagem farmacológica alternativa para o tratamento da mesma.

7. REFERÊNCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Science, 2002.
2. Alberts *et al.* *Biologia Molecular da Célula*, 3a Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997.
3. Amaral, Sylvia Stella, 2012. *A sinalização parácrina por ATP/ADP é detrimental durante a morte celular estéril induzida por paracetamol*. Mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal de Minas Gerais.
4. Ayata, C.K., Ganai, S.C., Hockenjos, B., Willim, K., Vieira, R.P., Grimm, M., Robaye, B., Boeynaems, J.M., Di Virgilio, F., Pellegatti, P., Diefenbach, A., Idzko, M., Hasselblatt, P., *Purinergic P2Y2 Receptors Promote Neutrophil Infiltration and Hepatocyte Death in Mice with Acute Liver Injury*, *Gastroenterology*, 2012.
5. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. *Acute liver failure*, *Lancet*, 2010.
6. Bhaduri BR, Mieli-vergani G. *Fulminant hepatic failure: pediatric aspects*, *Semin Liver Dis*, 1996.
7. Beldi G, Enjoji K, Wu Y, Miller L, Banz Y, Sun X, and 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*, 2010.
8. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*, *Science*, 2004.
9. Burns AR, Smith CW, Walker DC. *Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung*, *Physiol Rev*, 2003.
10. Burnstock G. *Unresolved issues and controversies in purinergic signaling*, *J Physiol*, 2008.

11. Burnstock G. *Purinergic signalling: past, present and future*, Braz J Med Biol Res, 2009.
12. Burnstock G. *Purinergic nerves*. Pharmacol, 1972.
13. Burnstock G. *Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling*, Pharmacol, 2006.
14. Chen GY, Nuñez G. *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunology, 2010.
15. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Kinnally KW. *Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, Mac, by BCL-2 family proteins*, Biochim Biophys Acta, 2006.
16. Emmett DS, Feranchak A, Kilic G, Puljak L, Miller B, Dolovcak S, McWilliams R, R. Doctor RB and Fitz JG. *Characterization of Ionotropic Purinergic Receptors in Hepatocytes*, Hepatology, 2008.
17. Fausther M, Gonzales E, and Dranoff JA. *Role of purinergic p2x receptors in the control of liver homeostasis*, WIREs Membr Transp Signal, 2012.
18. Friedman S L. *Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver*, 2008.
19. Glancy B, Balaban RS. *Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetic*, Biochemistry, 2012.
20. Gonzales,EB, , Prigent S, Abou-Lovergne A, et al. *Rat hepatocytes express functional P2X receptors*, FEBS Lett, 2007.
21. Graubardt N, Fahrner R, Trochsler M, Keogh A, Breu K, Furer C, Stroka D, et al. *Promotion of liver regeneration by natural killer cells in mice is dependent on extracellular ATP phosphohydrolysis*, Hepatology, 2012.

22. 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
23. Haussinger D, Stehle T and Gerok W. Actions of extracellular UTP and ATP in perfused rat liver, Eur. J. Biochem, 1987.
24. Hinson JA, Roberts DW, James LP, *Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis*, Handb Exp Pharmacol, 2010.
25. Hoque R, Sohail MA, Salhanick S, Malik AF, Ghani A, Robson SC, Mehal WZ. *P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012.
26. Ichai P, Duclos-Vallée JC, Guettier C, Hamida SB, Antonini T, Delvart V, Saliba F, Azoulay D, Castaing D, Samuel D. *Usefulness of corticosteroids for the treatment of severe and fulminant forms of autoimmune hepatitis*. Liver Transpl, 2007.
27. Jaeschke H, Bajt ML. *Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death*, Toxicol Sci, 2006.
28. James LP, Mayeux PR, Hinson JA, *Acetaminophen-induced hepatotoxicity*, Drug Metab Dispos, 2003.
- 29 Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2008.
30. Kim CH, Cho YS, Chum YS, Park JW, Kim MS. *Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3*, Nature, 2006.
31. Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. *Acute liver failure: a review*, Clin Liver Dis, 2006.

32. Kinnally KW, Antonsson B. *A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis*, Apoptosis, 2007.
33. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. *Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes*, Hepatology 2004.
34. 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.
35. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiodt 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.
36. Lee WM. *Drug-induced hepatotoxicity*, N Engl J Med, 2003.
37. Leite, M.F. and Nathanson, M.H. *Ca²⁺ signaling in the liver*, In The Liver, 2009.
38. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. *Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity*, Gastroenterology, 2004.
39. Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. *Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity*, Hepatology, 2006.
40. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kuberski P. *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*, Science, 2010.
41. Menezes GB, Mansur DS, McDonald B, Kuberski P, Teixeira MM. *Sensing sterile injury: opportunities for pharmacological control*, Pharmacol Ther, 2011.

42. Marques PE, Amaral SS, Pires DA, Nogueira LL, Soriani FM, Freire Lima BH, Oliveira GA, et al. *Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure*, Hepatology, 2012.
43. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. *The acute respiratory distress syndrome*, J Clin Invest, 2012.
44. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. *Animal models of Fulminant Hepatic Failure: A critical Evaluation*. Liver Transplantation, 2000.
45. North R A. *Molecular physiology of P2X receptors*, Physiology, 2002.
46. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, Mc cashland 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.
47. Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, Proudfoot AT. *Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine*, Lancet, 1977.
48. Prescott L. *Paracetamol (acetaminophen): a critical bibliographic review*. London: Taylor and Francis, 1996.
49. Pusl,T. and Nathanson,M.H. *The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the regulation of bile secretion in health and disease*, Biochem, 2004.
50. Putney Jr, J, W. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, 6th Ed.* Editores Siegel, calcium, 1999.
51. Ralevic V., Burnstock, G. *Receptors for Purines and Pyrimidines*, Pharmacol,. 1998.
52. Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. *Protection of acetaminophen induced hepato-cellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment*, J Pharmacol, 1996.

53. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. *The sterile inflammatory response*, Immunology, 2009.
54. Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA. *Acetaminophen overdose: 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment*. Arch Intern Med, 1981.
55. Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. *Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine*, Hepatology, 2010.
56. Thonson AW, Knolle PA. *Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment*, Immunology, 2010.
57. 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 Gastroenterology, 2009.
58. Turner CM, Elliott JI and Tam FWK. *P2 receptors in renal pathophysiology Purinergic Signalling*, 2009.
59. Vaughn, B., Robson, S.C., Burnstock, G. *Pathological roles of purinergic signaling in the liver*, Journal of Hepatology, 2012.
60. Wang Y, Roman R, Lidofsky SD, and Fitz JG. *Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation*, Physiology, 1996.
61. Weisman GA, Erb L, Garrad RC, Theiss PM, Santiago-Perez LI, Flores RV, Santos-Berrios C, Mendez Y, Gonzalez FA. *P2Y nucleotide receptors in the immune system: Signaling by a P2Y (2) receptor in U937 monocytes*, Drug Development Research, 1998.
62. Wigg AJ, Gunson BK, Mutimer DJ. *Outcomes following liver transplantation for seronegative acute liver failure: experience during a 12 years period with more than 100 patients*, Liver Transplantation, 2005.

63. Xie, Y; Williams, D; McGill, M; Lebofsky, M; Ramachandran, A; Jaeschke, H. *Purinergic Receptor Antagonist A438079 Protects Against Acetaminophen-induced Liver Injury by Inhibiting P450 Isoenzymes and Inflammation Activation*, Toxicological Sciences, 2012.

64. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*, Genome Biol, 2006.

8. ANEXO

Artigo científico publicado em 2013 na revista *Cell Communication and Signaling* e intitulado como:

Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity.