

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Damião Carlos Moraes dos Santos

Mecanismos Inflamatórios de Imunidade Inata Associados com Extensa Lesão do
Fígado na Falência Hepática Fulminante

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

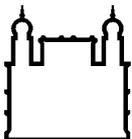
RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Damião Carlos Moraes dos Santos

**Mecanismos Inflamatórios de Imunidade Inata Associados com Extensa Lesão do
Fígado na Falência Hepática Fulminante**

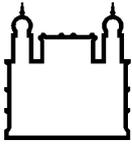
ORIENTADOR : Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: 30/ 01/ 2008

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Claire Fernandes Kubelka (presidente)
Prof. Dra. Albanita Viana de Oliveira
Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2008.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mecanismos Inflamatórios de Imunidade Inata Associados com Extensa Lesão do Fígado na Falência Hepática Fulminante

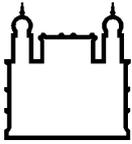
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Damião Carlos Moraes dos Santos

A falência hepática fulminante (FHF) é uma síndrome clínica resultante da morte maciça das células hepáticas, podendo ser induzida por agentes como vírus, drogas além de resposta autoimune, com taxa de mortalidade extremamente alta. Esta grave doença é caracterizada principalmente pelo rápido aparecimento de encefalopatia e coagulopatia, em indivíduos com função hepática previamente normal, sendo o transplante de fígado o tratamento de escolha. Os mesmos agentes envolvidos na FHF podem induzir formas menos graves de doença hepática, podendo o resultado clínico ser relacionado à resposta imunológica do hospedeiro, a qual envolve um sistema de moléculas sinalizadoras e células inflamatórias. Contudo, os elementos chave que determinam esta forma de doença hepática ainda não foram esclarecidos. Nossa contribuição foi identificar e quantificar marcadores de fenótipos celulares, citocinas e outros mediadores inflamatórios no parênquima hepático e sangue periférico de pacientes com FHF nos períodos pré e pós-transplante. Amostras de fígado de doadores saudáveis e pacientes com hepatite crônica, além do sangue de indivíduos saudáveis, foram utilizados como controle. Métodos histoquímicos, imunofluorescência, citometria de fluxo e tecnologia multiplex foram usados para identificar e quantificar fenótipos celulares, assim como citocinas e outros mediadores inflamatórios em amostras de fígado, sangue total periférico e plasma. Pacientes com FHF apresentaram um inesperado aumento do número de eosinófilos no ambiente intrahepático e no sangue periférico, concomitantemente detectou-se um aumento na expressão de IL-6 nos mesmos territórios, com ausência de IL-5 intrahepática. No sangue periférico, foi também observado um aumento no percentual de células Natural Killer (NK) expressando os marcadores de ativação/citotoxicidade (CD16⁺ e CD38⁺), ativação precoce (CD69⁺ and HLADR⁺) e a molécula de adesão (CD44⁺), além de um aumento de células Natural Killer T (NKT) (CD56⁺CD3⁺). Uma elevada expressão do marcador de ativação CD38⁺ e das moléculas de adesão (CD29⁺ e CD44⁺) foi também observada em linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), no entanto, sem alteração significativa do percentual total destes fenótipos. Níveis circulantes de IFN- γ , IL-8, MCP-1 MIP-1 α e IL-10 foram mais elevados na FHF enquanto que os níveis circulantes de IL-5 e RANTES não foram significativamente elevados nestes pacientes. Níveis sanguíneos de células NK

(CD56⁺CD3⁻), células T expressando marcador de ativação (CD38) e moléculas de adesão (CD29 e CD44), além das citocinas IL-8 e IL-10 foram mais significativamente elevados em pacientes com pior prognóstico. Foi também observada uma forte expressão de IFN- γ no fígado de pacientes com FHF, além da forte expressão de iNOS, juntamente com células CD68⁺ também no fígado. Estas descobertas sugerem que a FHF é regida principalmente por mecanismos inatos, orquestrados por eosinófilos, macrófagos e células NK, enquanto que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ assumem um papel secundário no processo necroinflamatório hepático. A detecção de iNOS, sugere participação do estresse oxidativo atuando no desequilíbrio da resposta tecidual, potencializando a extensa taxa de lesão observada na FHF.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mecanismos Inflamatórios de Imunidade Inata Associados com Extensa Lesão do Fígado na Falência Hepática Fulminante

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Damião Carlos Moraes dos Santos

Fulminant Hepatic Failure (FHF) is a clinical syndrome resulting from a massive death of liver cells, which can be induced by agents such as virus, drugs, besides autoimmune responses with extremely high mortality rate. This severe disease is mainly characterized by abrupt appearing of encephalopathy and coagulation disturbances in patients with previously normal liver function and the liver transplantation is the treatment of choice. The same agents involved in FHF, may also induce less severe forms of liver disease, and clinical outcome may be associated to host immune response, which involve a network of signaling molecules and inflammatory cells. However, the key elements that determine this form of liver disease are still unclear. Our contribution was identify and quantify cell phenotypes markers, cytokines and other inflammatory mediators in liver parenchyma and peripheral blood from FHF patients at pre and post-transplantation steps. Liver samples from healthy donors and chronic hepatitis patients, besides blood samples from healthy individuals, were used as controls. Histochemical and immunofluorescence methods, flow cytometry and multiplex cytokine assay were used to identify/quantify cells and inflammatory mediators in liver and plasma samples. FHF patients showed unexpected high number eosinophils in liver and blood concomitantly with the increased expression of IL-6, associated with lack of IL-5. In peripheral blood from FHF patients, we also observed an increase in the mean percentages of Natural Killer cells (NK) expressing activation/cytotoxicity markers (CD16⁺ and CD38⁺), early activation (CD69⁺ and HLADR⁺) and cell adhesion molecule CD44⁺, besides an increase in mean percentages of Natural Killer T cells (NKT) (CD56⁺CD3⁺). It was also observed an elevated percentages of the activation marker (CD38⁺) and adhesion molecules (CD29⁺CD44⁺) in T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺), however, none significant change in total percentages of this phenotypes. Circulating plasma levels of IFN- γ , IL-8, MCP-1, MIP-1 α and IL-10 were elevated in FHF patients with poor expression of IL-5 and RANTES. Blood levels of NK cells (CD56⁺CD3⁺), T cells expressing activation marker (CD38), and adhesion molecules (CD29 and CD44), besides cytokines IL-8 and IL10, were more significantly elevated in patients with worst prognosis. It was also observed the strong liver expression of IFN- γ , besides the elevated iNOS expression and CD68⁺ in FHF patients. These findings suggest that FHF

is target mainly by innate immune response, mediated by eosinophils, macrophages and natural killer cells, while T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) play a secondary role in necroinflammatory process. The detection of iNOS, suggests the involvement of oxidative stress in imbalance of tissue response, which may worsen the extensive liver lesion observed in FHF.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Desenvolvimento Tecnológico e de Imunologia Viral, do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, sob orientação do Dr. Marcelo Alves Pinto

AGRADECIMENTOS

- A todos os pacientes e às suas famílias que, mesmo passando por um momento tão delicado, se dispuseram a participar da pesquisa.
- Ao Dr. Marcelo Alves Pinto, por sua orientação e por tantas oportunidades proporcionadas.
- À Dra. Claire Kubelka, Chefe do Laboratório de Imunologia Viral, por ter permitido a realização dos experimentos no referido laboratório, pela revisão deste trabalho e pelas indispensáveis sugestões.
- À Patrícia Neves pela sua companhia, carinho e por toda sua ajuda em diversos aspectos deste trabalho.
- À Dra. Elzinandes Azeredo por sua ajuda nas análises de citometria e revisão do manuscrito de linfócitos
- Ao Dr. Marcelo Pelajo do Departamento de Patologia- IOC/Fiocruz, pela sua colaboração e auxílio no uso do confocal.
- Ao Dr. Renato Marchevsky pela sua colaboração na leitura das lâminas em microscópio de campo claro.
- À Mariana Gandini e à Karen Soares Trinta, pela colaboração na realização do Luminex.
- À Dra. Denise Matos, pela colaboração na realização do ELISA.
- À Dra. Luzia Pinto e Dra. Sandra Perez pelas sugestões dadas ao trabalho de eosinófilos.
- Ao Dr. José Manoel Martinho, Dr. Lúcio Pacheco, Enfa. Cristina de Araújo e a todos os demais membros da equipe de transplante do Hospital Geral de Bonsucesso (HGB), pela colaboração no fornecimento das amostras de fígado de pacientes com hepatite fulminante.
- À Dra. Vera Lúcia Pannain e Dra. Adriana Caroli-Bottino, responsáveis pelo Setor de Patologia Hepática do HUCFF (Departamento de Patologia-UFRJ), pelo fornecimento das amostras de fígado em blocos de parafina.
- À Dra. Patrícia Fonseca Pereira, e aos demais membros do Serviço de Anatomia Patológica do HGB, pelo fornecimento das amostras de fígado em blocos de parafina.
- Ao Maurício e aos demais doadores de fígado que, além do ato de amor e coragem, consentiram na utilização de fragmentos do fígado para a pesquisa.

- Ao Pedro Paulo e ao Bernardo Pascarelli pela sua ajuda no uso do confocal.

- A Dra. Vanessa de Paula pela sua colaboração na caracterização dos genótipos nas amostras de FHF de etiologia viral.

- À Bárbara de Oliveira pela colaboração nos cortes de amostras parafinadas para extração do RNA viral.

- À Dra. Paula Marins do Serviço de Pediatria do HGB pela ajuda na coleta de sangue dos pacientes na pediatria.

- À Sezonía, técnica do Serviço de Patologia do HUCCF/UFRJ pela ajuda nos cortes das amostras de fígado.

- À Luzia Caputo do Departamento de Patologia- IOC/Fiocruz, que colaborou com a coloração das lâminas em *Sirus Red*.

- À Dra. Aline Campos do Setor de Gastroenterologia do HGB, pela colaboração no recrutamento de casos pregressos de hepatite fulminante.

- Ao José Enes que ajudou na coleta de amostras de fígado.

- À toda equipe dos Laboratórios de Desenvolvimento Tecnológico e Imunologia Viral – IOC/Fiocruz.

- À minha família, e em especial à minha mãe, por todo apoio e carinho que tive até hoje.

- À Coordenação de Pós-graduação em Biologia Parasitária-IOC/FIOCRUZ, e em especial à Dra. Ana Gaspar, pelo apoio.

- Ao CNPq e à FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

*“Vou mostrando como sou
E vou sendo como posso
Jogando meu corpo no mundo
Andando por todos os cantos
E pela lei natural dos encontros
Eu deixo e recebo um tanto
E Passo aos olhos nus
Ou vestidos de lunetas
Passado, presente
Participo sendo o mistério do planeta”
(Morais/Galvão)*

LISTA DE FIGURAS

Caracterização do problema

Figura 1 - Hipóteses sobre a patogênese da encefalopatia hepática na falência hepática fulminante.	07
Figura 2 - Mecanismos de ação dos principais imunossupressores utilizados pós-transplante hepático.	13
Figura 3 - Diferentes vias (entrada e saída) do fluxo sangüíneo hepático e principais funções do fígado.	16
Figura 4 - Modelo representativo das diferentes funções descritas para os eosinófilos.	25
Figura 5 - A cascata das citocinas/quimocinas por meio da qual células NK recrutam células T.	32
Figura 6 - Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de morte celular em hepatócitos.	37
Figura 7 - Representação esquemática das funções do óxido nítrico (NO).	40
Figura 8 - Representação esquemática da síntese do óxido nítrico (NO).	41

Resultados

Figura 9 - Gráfico representativo da evolução dos parâmetros bioquímicos na FHF pré/pós transplante.	54
Figura 10 - Fígados explantados de pacientes com falência hepática fulminante - Aspecto macroscópico.	55
Figura 11 - Expressão intra-hepática de óxido nítrico sintase tipo II (iNOS) juntamente com a presença do antígeno HBsAg.	56
Figura 12 - Expressão intra-hepática de óxido nítrico sintase tipo II	57
Figura 13 - Expressão intra-hepática de óxido nítrico sintase tipo II	58
Figura 14 - Marcação intra-hepática de células CD68 ⁺ e iNOS	59
Figura 15 - Marcação intra-hepática de nitrotirosina	60
Figura 16 - Expressão intra-hepática de Bcl-x e iNOS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Manifestações clínicas de acordo com o grau de encefalopatia hepática segundo critérios de O' Grady et al. 1989.	05
Tabela 2- Casos de hepatite fulminante e hepatite aguda grave incluídos no estudo entre 2000 e 2006.	53

ABREVIATURAS

FHF- Falência Hepática Fulminante

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

BT - Bilirrubina Total

γ GT-gama-Glutamiltransferase

TAP- Tempo de Atividade da Protrombina

INR - (*International Normalized Ratio*)

HAV- Vírus da Hepatite A (*Hepatitis A Virus*)

HBV- Vírus da Hepatite B (*Hepatitis B Virus*)

HCV- Vírus da Hepatite C (*Hepatitis C Virus*)

HDV- Vírus da Hepatite D (*Hepatitis D Virus*)

HEV- Vírus da Hepatite E (*Hepatitis E Virus*)

RNA - Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)

RNA_m - Ácido Ribonucléico mensageiro (*messenger Ribonucleic Acid*)

DNA - Ácido Desoxiribonucléico (*Desoxyribonucleic Acid*)

NO - Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)

nNOS – Óxido Nítrico Sintase neuronal (*neuronal Nitric Oxide Synthase*)

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial (*endothelial Nitric Oxide Synthase*)

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida (*inducible Nitric Oxide Synthase*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species*)

FMO – Falência Múltipla dos Órgãos

CID - Coagulação Intravascular Disseminada

HCVV - hemofiltração contínua venovenosa

LSEC - Células Endoteliais do Sinusóide Hepático (*Liver Sinusoidal Endothelial Cells*)

PBC – Cirrose Biliar Primária (*Primary Biliary Cirrhosis*)

PSC - Colangite Esclerosante Primária (*Primary Sclerosing Cholangitis*)

CD - *Cluster Differentiation*

IFN- γ - Interferon gama

IL- Interleucina

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- (*Tumor Necrosis Factor- α*)

TNF-R1 - Receptor do Fator de Necrose Tumoral- (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*)
RANTES - *Regulated upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted*
ICAM -1 - Molécula de Adesão Intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule-1*)
VCAM -1 - Molécula de Adesão Vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)
MIP-1 α - Proteína Inflamatória de Macrófagos (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*)
MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos (*Monocyte Chemoattractant Protein -1*)
MBP- Proteína Básica Principal (*Major Basic Protein*)
ECP- Proteína Catiônica de Eosinófilos (*Eosinophil Cationic Protein*)
EPO- Peroxidase de Eosinófilos (*Eosinophil Peroxidase*)
EDN - Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (*Eosinophil-derived Neurotoxin*)
Con A - Concanavalina A
SOD - Superóxido-dismutase
GSH - Glutathiona reduzida
CTL – Linfócito T Citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte*)
APC – Célula Apresentadora de Antígeno (*Antigen-Presenting Cell*)
TCR – Receptor de Célula T (*T Cell Receptor*)
BCR – Receptor de Célula B (*B Cell Receptor*)
DC – Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)
MHC -Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex*)
PBMC – Células Mononucleares de Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).
MMP- Metaloproteinase de Matriz (*Matrix Metalloproteinase*)
TIMP- Inibidor Tecidual das Metaloproteinases (*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*)
TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento (*Transforming Growth Factor- β*)
MAPK - *MAP kinases*
JNK - *Jun N-terminal kinase*
ERK - *extracellular signal-regulated kinase*
NF- κ B - Fator Nuclear - κ B (*Nuclear factor - κ B*)
STAT 3 - *Signal Transducers and Activators of Transcriptions*
PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
AIF - Fator Indutor de Apoptose (*Apoptosis-inducing factor*)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
1.1- Caracterização do problema	01
1.2- A Hepatite Fulminante	02
1.2.1-Aspectos clínicos e laboratoriais da falência hepática fulminante	03
1.2.1.1-Coagulopatia	04
1.2.1.2-Encefalopatia Hepática	04
1.2.1.3-Falência múltipla de órgãos	08
1.3- Aspectos Epidemiológicos da Hepatite Fulminante	08
1.3.1- Hepatite Fulminante induzida por vírus.	08
1.3.2- Hepatite Fulminante induzida por drogas.	09
1.4- Manejo Clínico da Hepatite Fulminante	10
1.4.1-Transplante hepático ortóptico	10
1.4.2-Transplante de hepatócitos	11
1.5- Imunossupressão pós transplante hepático	11
1.6- Aspectos imunológicos do fígado	14
1.6.1- Papel das citocinas nas doenças hepáticas	17
1.6.2 - Quimiocinas na patogênese das doenças hepáticas	20
1.6.3 - Papel de eosinófilos nas hepatopatias	22
1.6.4- Papel de linfócitos nas hepatopatias	26
1.6.4.1- Células Natural Killer (NK)	26
1.6.4.2- Linfócitos T e B	28
1.6.5 - Mecanismos de morte celular na falência hepática aguda	33
1.6.5.1-Necrose e Apoptose	33
1.6.5.1a-Vias TNF- α e TNFR	34
1.6.5.1b-Via receptor Fas/ Fas-ligante	35
1.6.5.1c-Estresse oxidativo intracelular	36
1.6.5.1d-Papel do óxido nítrico	38

2.JUSTIFICATIVA	42
2.1- Objetivos gerais	43
2.2-Objetivos específicos	43
3.MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1- Submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP- FIOCRUZ)	44
3.2- Inclusão dos Indivíduos na Pesquisa pelo Termo de Consentimento	44
3.3- Instituições envolvidas	45
3.4- Obtenção das amostras biológicas de casos pregressos	45
3.5- Obtenção das amostras biológicas no estudo prospectivo	45
3.6- Amostras de fígado de doadores saudáveis	46
3.7- Amostras de fígado de Casos de Hepatite Crônica	46
3.8- Preparo dos cortes histológicos	47
3.9- Preparo das amostras de sangue	47
3.10- Obtenção dos dados clínicos e bioquímicos	47
3.11- Determinação dos casos de hepatite aguda de etiologia viral	48
3.12- Caracterização histológica da hepatite fulminante	48
3.13- Imunofluorescência para detecção de citoninas e iNOS	48
4.RESULTADOS	50
4.1- Resultados Gerais	50
4.1.1- Caracterização dos casos de Hepatite Fulminante e Hepatite Aguda Grave incluídos no estudo entre 2000 e 2006	50
4.1.2- Expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em amostras de fígado de pacientes com FHF	51
4.1.3- Elevado número de células CD68 ⁺ presentes no infiltrado inflamatório hepático juntamente com a expressão da iNOS nas amostras de fígado de pacientes com FHF	51
4.1.4- Marcadores de estresse nitrosativo na FHF	52
4.1.5- Presença da proteína anti-apoptótica (Bclx) em amostras de fígado de pacientes com FHF.	52

4.2- Manuscrito 1	61
Eosinophils-involved in Fulminant Hepatic Failure Are Associated with High IL-6 Expression and Absence of IL-5 in Liver and Peripheral Blood	
4.3- Manuscrito 2	62
Activated Lymphocytes And High IFN- γ , IL-8, IL-10 and MCP-1 Levels Are Associated With Fulminant Hepatic Failure in Human Patients	
5.DISSCUSSÃO	63
5.1- Papel da óxido nítrico sintase e das células de Kupffer na FHF	63
5.2- Papel de eosinófilos na falência hepática fulminante	67
5.3- Papel de linfócitos na falência hepática fulminante	70
6- CONCLUSÕES	75
7- PERSPECTIVAS	76
8- Anexo 1 – Aprovações dos Comitês de Ética em Pesquisa	77
9- Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	80
10.BIBLIOGRAFIA	82

1.INTRODUÇÃO

1.1-Characterização do Problema

A hepatite é um processo inflamatório multifatorial, podendo ser induzida por agentes como o álcool (hepatite alcoólica) e alguns medicamentos, incluindo-se os antiinflamatórios não esteroidais (hepatite medicamentosa) (Escorsell *et al*, 2007). Por outro lado, existem situações nas quais um desequilíbrio na resposta imunológica faz com que antígenos próprios, presentes na superfície dos hepatócitos, sejam alvos do ataque de linfócitos, sendo este quadro denominado como hepatite auto-imune. Além disso, diversos microorganismos são conhecidos causadores de hepatite no homem, estando entre eles bactérias, fungos e vírus (Chauveau *et al*, 1999, Trachana *et al*, 2001, Pappachan *et al*, 2004, Ader *et al*, 2006). Os principais agentes causadores de hepatite são o vírus da hepatite A (HAV) e o vírus da hepatite E, de transmissão fecal-oral, os vírus das hepatites B (HBV) e Delta (HDV) de transmissão parenteral, sexual e perinatal e o vírus da hepatite C (HCV) transmitido principalmente por via parenteral.

Têm sido descritas relações variáveis do curso clínico da hepatite de acordo com com o agente etiológico, a idade e as características genéticas do indivíduo infectado. Alguns estudos também sugerem uma associação entre o genótipo viral e a gravidade do quadro clínico de hepatite, enquanto que outros, não associaram a gravidade com variabilidade das seqüências nucleotídicas nos genótipos encontrados (Fujiwara *et al*, 2003, Hussain *et al*, 2006, Sainokami *et al*, 2007). As diversas formas clínicas de hepatite são a hepatite aguda benigna (que pode ser icterica ou anictérica), hepatite fulminante e hepatite crônica, esta podendo levar a cirrose hepática ou hepatocarcinoma.

As hepatites A e E não evoluem para a forma crônica. No entanto, cerca de 10 a 15 % dos casos de hepatite A apresentam uma evolução arrastada. Embora raramente (menos de 1% dos casos), a hepatite A também pode levar a um quadro de hepatite fulminante. Cerca de 20 % das gestantes infectadas pelo vírus da hepatite E, principalmente no terceiro trimestre, também apresentam um quadro de hepatite fulminante (Jilani *et al*, 2007). Por outro lado, a hepatite B é uma infecção em que 5 a 10 % dos casos podem evoluir para a forma crônica. As chances de evolução para a cronicidade podem chegar a 90 % se a infecção for adquirida por um recém-nascido no

primeiro ano de vida. A hepatite delta também pode evoluir para a forma crônica. A hepatite fulminante, secundária à hepatite B, é considerada uma das causas mais freqüentes de falência hepática em todo o mundo; cerca de 1% dos casos de infecção pelo HBV apresentam falência hepática fulminante. Por outro lado, em determinadas regiões, devido à alta prevalência de co-infecção HBV/HDV, a hepatite Delta parece ter um papel mais relevante nos casos de falência hepática (Fonseca, 2002). O vírus da hepatite C raramente causa a forma fulminante, no entanto, 50 a 90 % dos indivíduos infectados pelo HCV podem apresentar um quadro crônico (Alberti *et al*, 1999).

Agentes como drogas, autoimunidade e doenças metabólicas são também associados à falência hepática fulminante. Dados epidemiológicos têm demonstrado um aumento no número de casos de falência hepática fulminante induzida por drogas conhecidamente hepatotóxicas, sendo na maioria dos casos, associadas à altas doses ingeridas de medicamentos (Escorsell *et al*, 2007).

1.2- A Hepatite Fulminante

A falência hepática fulminante (FHF) é uma síndrome clínica dramática, resultante de um grau crítico de lesão parenquimal não adequadamente balanceado pela atividade regenerativa hepatocelular, a qual apresenta uma taxa de mortalidade bastante elevada, cerca de 80% dos indivíduos não transplantados. Clinicamente, a FHF é caracterizada pelo aparecimento abrupto de encefalopatia e coagulopatia em indivíduos com função hepática previamente normal, podendo nesses indivíduos ocorrer falência de múltiplos órgãos (O'Grady *et al*, 1989).

Apesar das atuais opções de manejo clínico, incluindo os sistemas de suporte bioartificial e o transplante de hepatócitos, o transplante hepático ortotópico vem sendo considerado como a principal medida terapêutica para a FHF, embora ainda apresente significativas morbidade e mortalidade (Goldstein *et al*, 2003). Por outro lado, o número limitado de doadores de fígado e o alto custo dos transplantes são os principais obstáculos desta modalidade de tratamento. Estes fatos, suportam a necessidade da identificação de biomarcadores específicos que poderiam prever a evolução para um quadro de falência hepática fulminante, podendo ser de grande impacto no manejo clínico e na implementação de medidas terapêuticas que previnam a extensa lesão hepática (Schmidt & Dalhoff, 2005, Schiodt *et al*, 2006).

1.2.1- Aspectos clínicos e laboratoriais da falência hepática fulminante

Em 1970 Trey e Davidson propuseram uma definição para insuficiência hepática fulminante. Eles usaram o termo FHF para descrever uma condição clínica conseqüente à lesão hepática grave, com a encefalopatia se iniciando dentro de 8 semanas após o surgimento dos primeiros sintomas na ausência de doença hepática pré-existente (Trey & Davidson, 1970). Uma outra forma clínica da doença de acometimento mais gradual da função hepática com manifestações clínicas e agentes etiológicos semelhantes, porém prognóstico diferente, ficou então reconhecida como insuficiência hepática subfulminante, com intervalo entre a icterícia e a encefalopatia de 8 a 24 semanas (Gimson *et al*, 1986). Em 1986 Bernuau e colaboradores, sugeriram um ponto de corte de duas semanas na demarcação do quadro fulminante e subfulminante, descrevendo como FHF a ocorrência de encefalopatia até duas semanas após o início da icterícia em associação com coagulopatia (fator V < 50%) e falência hepática subfulminante quando o intervalo era de 2-12 semanas, novamente em associação com coagulopatia (Bernuau *et al*, 1986).

Em 1989 O'Grady e colaboradores, da escola inglesa, analisaram indicadores precoces de prognóstico na FHF e acharam que o intervalo entre o início da icterícia e o desenvolvimento da encefalopatia é um preditor independente para o seguimento da doença. Posteriormente, o mesmo grupo propôs uma sub-categorização da forma aguda em hiper-aguda (intervalo entre icterícia encefalopatia de até 7 dias), aguda (intervalo de 8 a 28 dias) e sub-aguda (intervalo 28 a 56 dias) (O'Grady *et al*, 1989, O'Grady *et al*, 1993).

Embora não sejam marcadores específicos, outras alterações bioquímicas encontradas na falência hepática fulminante, podem auxiliar o diagnóstico, dentre elas, o aumento significativo das transaminases, decorrente do alto grau de lesão hepatocelular. Valores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são proporcionais ao nível de extensão da lesão parenquimal, variando geralmente entre 500 a 2.000 UI/L, no entanto, alguns indivíduos com quadro de hepatite fulminante, podem não apresentar alterações significativas de transaminases. Em geral, os valores séricos da ALT são mais elevados do que os da AST. Hipoglicemia por redução do débito hepático de glicose é uma outra alteração característica, por conta da depleção dos estoques de glicogênio e diminuição da capacidade de

gliconeogênese. O colesterol baixo e hiperamoniemia também podem ser encontrados nesta síndrome. Além das transaminases, outras clássicas alterações bioquímicas que reforçam o diagnóstico de FHF são o aumento da gama Glutamilttransferase (γ -GT) e da bilirrubina total, principalmente pela sua fração direta ($> 20\text{mg}/100\text{ml}$) (Dufour *et al*, 2000, Kanda *et al*, 2002).

1.2.1.1 - Coagulopatia

O fígado normal é responsável pela síntese de diversos fatores envolvidos na cascata de coagulação. A elevada taxa de lesão hepatocelular leva à deficiência na síntese hepática destes fatores ocasionando quadros importantes de hemorragia. Assim, a coagulopatia está entre os principais aspectos clínicos da falência aguda do fígado, caracterizada pela diminuição do tempo de atividade de protrombina $< 40\%$ (TAP > 15 segundos) ou da “International Normalized Ratio” (INR ≥ 1.5), além da diminuição do fator V $< 50\%$ (Pereira *et al*, 1992, Dufour *et al*, 2000).

Além do alto grau de lesão tecidual, a coagulopatia pode estar relacionada ao quadro de sepse, que ocorre devido à deficiência na função depuradora do sistema porta-hepático. Nestes casos, mecanismos inflamatórios sistêmicos induzem, dentre outras alterações, a ativação de fatores de coagulação dentro de pequenos vasos, levando à coagulação intravascular disseminada (CID). Este desequilíbrio na resposta inflamatória potencializa a coagulopatia devido ao consumo das proteínas de coagulação, hiperativadas na CID (Franchini *et al*, 2007). Por outro lado, a coagulopatia isoladamente não determina quadro de falência hepática fulminante; quadros de coagulopatia sem encefalopatia são classificados como hepatite aguda grave.

1.2.1.2 - Encefalopatia hepática

Durante a fase de falência hepática, grandes quantidades de neurotoxinas escapam do processo de detoxificação no espaço porta e chegam à circulação sistêmica, sendo associadas ao aparecimento da encefalopatia hepática. Além disso, o acúmulo de outras substâncias neurotóxicas, dentre elas os produtos liberados dos hepatócitos necróticos e outras células presentes no ambiente hepático, além da alta

produção de mediadores inflamatórios, têm sido descritos como prováveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos com as alterações na função neuronal normal e no fluxo sanguíneo cerebral, que determinariam o quadro de encefalopatia (Larsen, 2004).

A encefalopatia hepática, que é graduada de I a IV, evolui desde alterações de comportamento e do nível de consciência até o coma, podendo estar presentes o edema cerebral e aumento da pressão intracraniana, o que pode induzir herniação do encéfalo, com perda tecidual e morte encefálica, sendo a principal causa de mortalidade na falência hepática (tab. 1) (O'Grady *et al*, 1989, Av, 2007).

Tabela 1 - Manifestações clínicas de acordo com o grau de encefalopatia hepática segundo critérios de O' Grady *et al*. 1989.

Grau	Sinais e sintomas
I	Alteração do sono, euforia ou depressão, desorientação
II	Sonolencia, <i>flapping</i>
III	Maior sonolência, estupor, confusão mental
IV	Comatoso, sem resposta a estímulos dolorosos

Flapping: tremor de extremidades

Uma das hipóteses para o desenvolvimento de encefalopatia hepática seria o aumento nos níveis séricos de amônia devido à deficiência no ciclo da uréia hepático. Na falência hepática humana, níveis elevados de amônia arterial (> 200 µg/dL) também podem estar associados com a herniação do encéfalo e a morte encefálica (Clemmesen *et al*, 1999). Durante o edema vasogênico, a amônia, que também atua como uma neurotoxina, induz a alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo o acesso incontrolado de componentes do plasma e água ao compartimento

cerebral extracelular, levando ao edema, além de distúrbios na neurotransmissão. O acúmulo de amônia também leva a alterações no sistema glutamato e à disfunção de astrócitos. No cérebro, a amônia é detoxificada nos astrócitos, via amidação de glutamato, levando à formação de glutamina. O acúmulo de glutamina nos astrócitos aumenta seu gradiente osmótico, levando ao edema intracelular (edema citotóxico). Na FHF, evidências de modelos experimentais e em cérebro humano pós-mortem, suportam cada um destes mecanismos, mas alguns autores têm sugerido que o edema na FHF é principalmente citotóxico (Vaquero *et al*, 2003, Jalan *et al*, 2004, Blei, 2005, Detry *et al*, 2006, Ahboucha & Butterworth, 2007) (Fig. 1).

A outra hipótese que também tem sido sugerida na hipertensão intracraniana é o aumento do volume e do fluxo de sangue no cérebro. A causa exata para este aumento, provavelmente relacionada com a vasodilatação, ainda não é conhecida. O óxido nítrico (NO) tem sido implicado, mas pode ser que o aumento de NO ocorra após o aumento do fluxo intracraniano (Larsen *et al*, 2001, Blei, 2005). Outros possíveis marcadores sistêmicos da inflamação podem estar associados com o aumento do fluxo sanguíneo cerebral e da pressão intracraniana (Racanelli *et al*), dentre eles as citocinas: interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (Jalan *et al*, 2004).

Apesar dos estudos anteriores, os respectivos papéis de todos esses fenômenos no desenvolvimento de hipertensão intracraniana na FHF precisam ser mais bem determinados. Pode-se ter como hipótese que tanto o edema, secundário ao efeito osmótico da glutamina nos astrócitos, quanto o aumento do volume de sangue, secundário à vasodilatação (citocinas, produtos do fígado necrótico e outros) possam contribuir para a hipertensão intracraniana levando à herniação do encéfalo e da medula e morte na FHF (Detry *et al*, 2006).

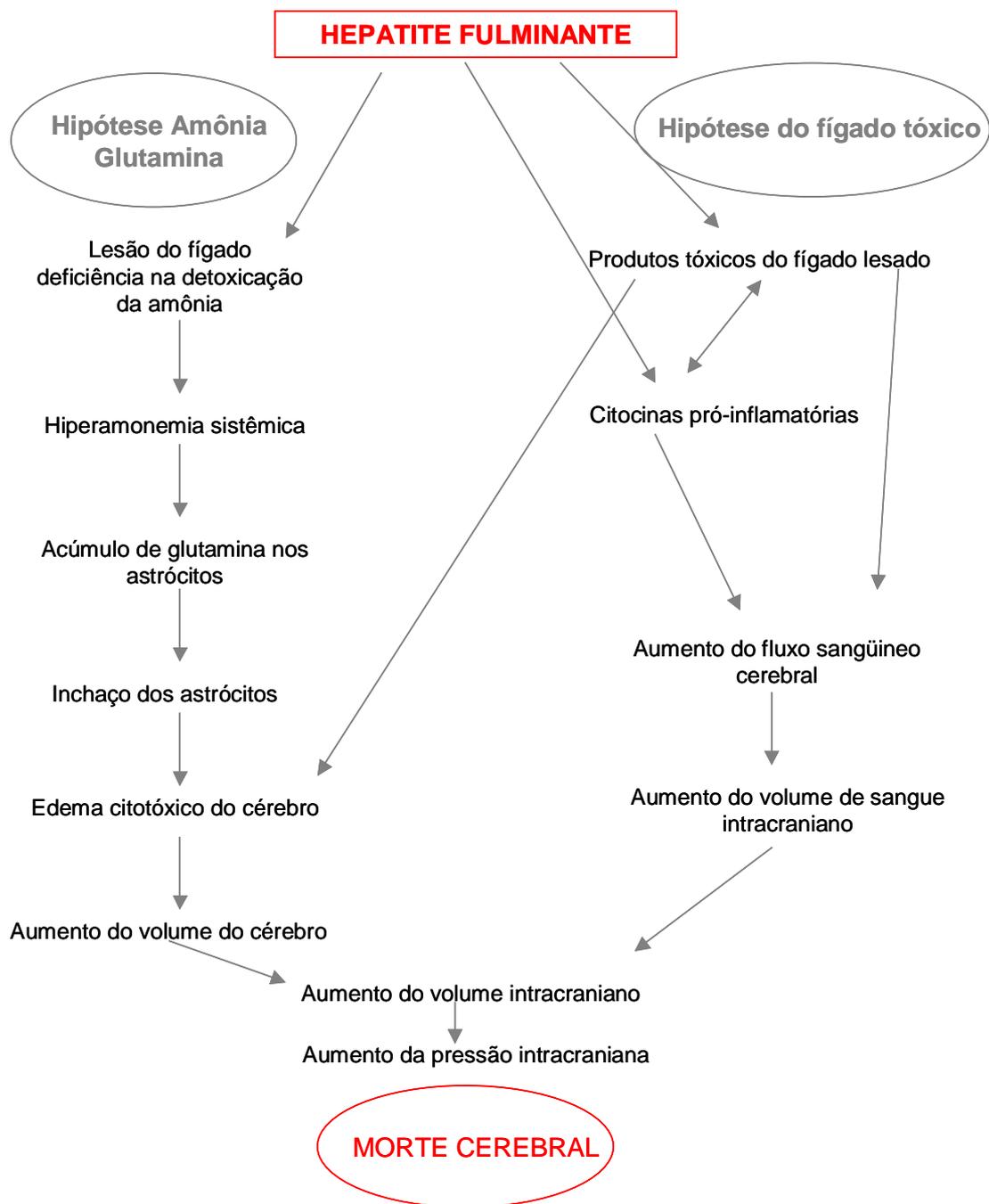


Fig.1- Hipóteses sobre a patogênese da encefalopatia hepática na falência hepática fulminante.

Em uma das hipóteses, o processo deficiente de detoxificação hepática levaria ao acúmulo de amônia no sangue, provocando a degradação da barreira hematoencefálica. O metabolismo da amônia pelos astrócitos, levaria ao aumento de seu potencial osmótico, induzindo edema e alteração do processo normal de transporte de glutamato. Na outra hipótese, o aumento de produtos tóxicos do fígado lesado, seguido da alta produção de mediadores inflamatórios vasoreguladores, aumentaria o fluxo sanguíneo cerebral, causando aumento da pressão intracraniana. (Adaptado de Detry, 2006).

1.2.1.3- Falência Múltipla de Órgãos

Considera-se que o acúmulo de toxinas como amônia e lactato, além dos efeitos deletérios de algumas citocinas vasoativas e outros mediadores inflamatórios como o NO ao lado das complicações da sepse, sejam fatores que contribuem para o desenvolvimento de falência múltipla de órgãos (FMO) na hepatite fulminante (Eum *et al*, 2007).

A sepse é uma ocorrência clínica freqüente em pacientes com falência hepática, devido à perda da barreira representada pelo trato digestivo e pelo sistema porta-hepático na detoxificação de produtos da microbiota intestinal. Por outro lado, considerando-se que fígado é o sítio para síntese de complemento, baixos níveis de C3a e C5a são descritos na FHF de diversas etiologias. Esta baixa atividade do complemento é associada com opsonização deficiente de fungos e bactérias, seguida de deficiente fagocitose pelas células de Kupffer (Rolando *et al*, 1991, Rolando *et al*, 1993).

A FMO se caracteriza pela vasodilatação generalizada, a qual resulta em reduzida resistência vascular sistêmica e queda brusca na pressão arterial, sendo que esses distúrbios circulatórios contribuem para a ocorrência de falência renal (Shawcross *et al*, 2004). A associação entre a vasodilatação sistêmica e a alta produção de óxido nítrico, é bem descrita na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (Iskit & Guc, 2003). Dados experimentais e clínicos também sugerem que elevados níveis das citocinas IL-6 e IL-8 contribuam para vasodilatação esplênica e hipotensão sistêmica (Minghini *et al*, 1998).

1.3- Aspectos Epidemiológicos da Hepatite Fulminante

1.3.1 - Hepatite Fulminante Induzida por Virus

Dentre os diversos agentes relacionados à indução da falência hepática, o HBV vem sendo considerado o mais importante (Durand *et al*, 2002, Rivero *et al*, 2002). Formas fulminantes de hepatite também foram relacionadas ao vírus do herpes simplex tipo 2 em mulheres jovens (Chauveau *et al*, 1999). Um estudo epidemiológico realizado na Itália, no período de 1995 a 2000, demonstrou uma taxa de mortalidade entre os

casos de hepatite aguda de 0.4% pelo HBV, 0.1 % pelo HCV e 0.01% pelo HAV. A taxa total de mortalidade foi de 0.1% dos casos agudos (Bianco *et al*, 2003). Em crianças, a hepatite fulminante, embora incomum, está associada com uma alta taxa de mortalidade. Neste grupo, as hepatites virais agudas são as causas mais comuns de falência hepática. Em países como França e Argentina, a hepatite fulminante pelo HAV em crianças é causa de 10% e 20% dos transplantes hepáticos respectivamente (Ciocca, 2000).

1.3.2 - Hepatite Fulminante induzida por drogas

A lesão hepática pode ser produzida por duas categorias de drogas. A primeira delas consiste de hepatotoxinas intrínsecas, nestes casos drogas e seus metabólitos induzem uma hepatotoxicidade preditiva. Existe uma alta incidência de lesão hepática em pacientes expostos à essas drogas. Ainda nestes casos, a hepatotoxicidade pode ser dose-dependente e resultante da alteração no metabolismo hepático. Estudos realizados na França mostram que, em indivíduos adultos, vem se observando um aumento na incidência dos casos fulminantes de etiologia medicamentosa, principalmente pelo uso indiscriminado de alguns medicamentos reconhecidamente hepatotóxicos como o paracetamol (acetaminofeno). Embora a hepatotoxicidade do paracetamol seja considerada dose-dependente, por razões ainda desconhecidas, já foi descrito que alguns indivíduos parecem desenvolver hepatotoxicidade com doses “terapêuticas” (< 4 g/dia) (Amar & Schiff, 2007).

A segunda categoria de drogas consiste de hepatotoxinas idiossincráticas. Nestes casos, drogas ou seus metabólitos, induzem uma hepatotoxicidade não previsível em uma pequena parcela de pacientes expostos. Nestes pacientes, a hepatotoxicidade não é dose-dependente e reações imunes adversas podem contribuir para a lesão induzida por essas hepatotoxinas idiossincráticas. Embora acometendo apenas 13% dos casos, as reações a drogas idiossincráticas permanecem importantes pelo seu pior prognóstico. Proeminente entre estes casos encontra-se a isoniazida (Fontana, 1999, Murphy *et al*, 2000).

1.4- Manejo Clínico da Hepatite Fulminante

Devido à rápida deterioração clínica, o tempo é a essência da conduta terapêutica de pacientes com FHF. Nos últimos 10 anos tem ocorrido um aumento significativo no número de opções de tratamento para esta condição, incluindo o transplante de fígado, sistemas de suporte bioartificial e o transplante de hepatócitos. Contudo, o transplante hepático ortotópico, vem sendo a única medida terapêutica definitiva. Assim, enquanto se aguarda por um órgão compatível, medidas terapêuticas de suporte são implementadas, desde a adequação da dieta até medidas mais técnicas, dentre elas: a hemofiltração contínua venovenosa (HCVV), sistemas de suporte hepático bio-artificiais e o transplante de hepatócitos (Rahman & Hodgson, 2001).

1.4.1 - Transplante Hepático Ortotópico

Devido à gravidade do quadro clínico, o transplante hepático na FHF é considerado como de urgência zero, situação na qual o paciente não necessita entrar em fila de transplantes. Entre as modalidades de transplante ortotópico do fígado, encontram-se o transplante com doador cadáver e o transplante intervivos. Este procedimento, embora tenha proporcionado significativa melhora no prognóstico de pacientes com FHF, não é isento de riscos. Um estudo anterior demonstrou uma alta taxa de mortalidade no primeiro ano pós-transplante. Dentre as complicações deste procedimento, está a falência do enxerto; devido à disfunção primária do órgão, complicações do procedimento cirúrgico, trombose arterial e infecções, dentre outras (Nunez-Martinez *et al*, 2003).

Por outro lado, não são todos os pacientes com FHF que podem ser submetidos ao transplante hepático ortotópico. Dentre as contra-indicações, incluem-se o aumento da PIC nos casos em que o dano neurológico é suspeito, hipotensão refratária, sepse grave e doença cardíaco-pulmonar avançada. Esses critérios consideram principalmente as chances de sobrevivência do receptor, visando assim, evitar a seleção inadequada de um paciente como receptor do órgão, o que irá reduzir o já diminuído número de órgãos para transplante (Rahman & Hodgson, 2001).

1.4.2- Transplante de Hepatócitos

Os avanços na biotecnologia têm permitido que o transplante de hepatócitos seja uma proposta relevante no tratamento de doenças do fígado. A técnica se baseia no isolamento e cultura de hepatócitos usando múltiplas fontes, dentre elas células tronco embrionárias, usando métodos desenvolvidos recentemente, sendo as vias intraportal e intraesplênica os sítios mais usados para o transplante (Fox & Chowdhury, 2004, Horslen & Fox, 2004).

Em animais experimentais, o transplante de hepatócitos tem sido descrito como um método seguro e efetivo de suporte da função hepática (De Vree *et al*, 2000). Em humanos, esta técnica de transplante tem emergido como um método promissor e menos agressivo para tratamento de doenças hepáticas (Habibullah *et al*, 1994). Assim, tem sido especulado que nos casos de doença crônica com falência hepática terminal, este procedimento proveria um suporte temporário aos pacientes enquanto aguardam por um transplante. Desta forma, considera-se que essa modalidade terapêutica possa mudar a crescente mortalidade nas filas de espera para o transplante hepático devida a escassez de órgãos (Fox & Chowdhury, 2004).

Na falência hepática fulminante, esse método tem sido sugerido para facilitar a regeneração do órgão lesado. Estudos realizados anteriormente em pacientes com FHF, os quais apresentavam graus III e IV de encefalopatia hepática, utilizaram hepatócitos fetais humanos injetados via intraperitoneal por meio de um cateter de diálise, demonstrando que todos os pacientes apresentaram recuperação completa da encefalopatia (Habibullah *et al*, 1994).

1.5- Imunossupressão pós-transplante hepático

O fígado tem uma situação imunológica privilegiada em relação aos outros órgãos, pois não apresenta episódios de rejeição hiperaguda e a rejeição aguda incontrolável é pouco frequente (de Groen *et al*, 1994). Atualmente, os protocolos de imunossupressão utilizam duas ou três drogas, sendo que as mais frequentemente usadas são: glicocorticóides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus e basiliximab. A ação dos corticóides parece ser potencializada com o uso concomitante de inibidores de calcineurina, dentre elas a ciclosporina (Drewe *et al*, 1992) e o tacrolimus (FK506);

ambas com mecanismo de ação similar, sendo no entanto, o tacrolimus considerado mais potente (Marsh *et al*, 1992). O bloqueio da calcineurina por estas classes de drogas inibe a transcrição do RNA mensageiro da interleucina 2 (IL-2), reduzindo sua produção e, desta forma, suprimindo a proliferação de linfócitos T. O sirolimus (rapamicina), assim como o tacrolimus é um antibiótico macrolídico com potente efeito citostático nas células musculares lisas, atuando sobre a fase 1 do ciclo celular. Basiliximab é um anticorpo monoclonal que se liga à subunidade α (CD25) do receptor de IL-2 em linfócitos T ativados, agindo como um antagonista da IL-2. A vantagem do uso de basiliximab é a possibilidade de redução nas doses de inibidores de calcineurina, evitando a nefrotoxicidade, no entanto, sua eficácia em transplantes de fígado é controversa, principalmente os casos pediátricos (Mueller, 2004) (Fig. 2).

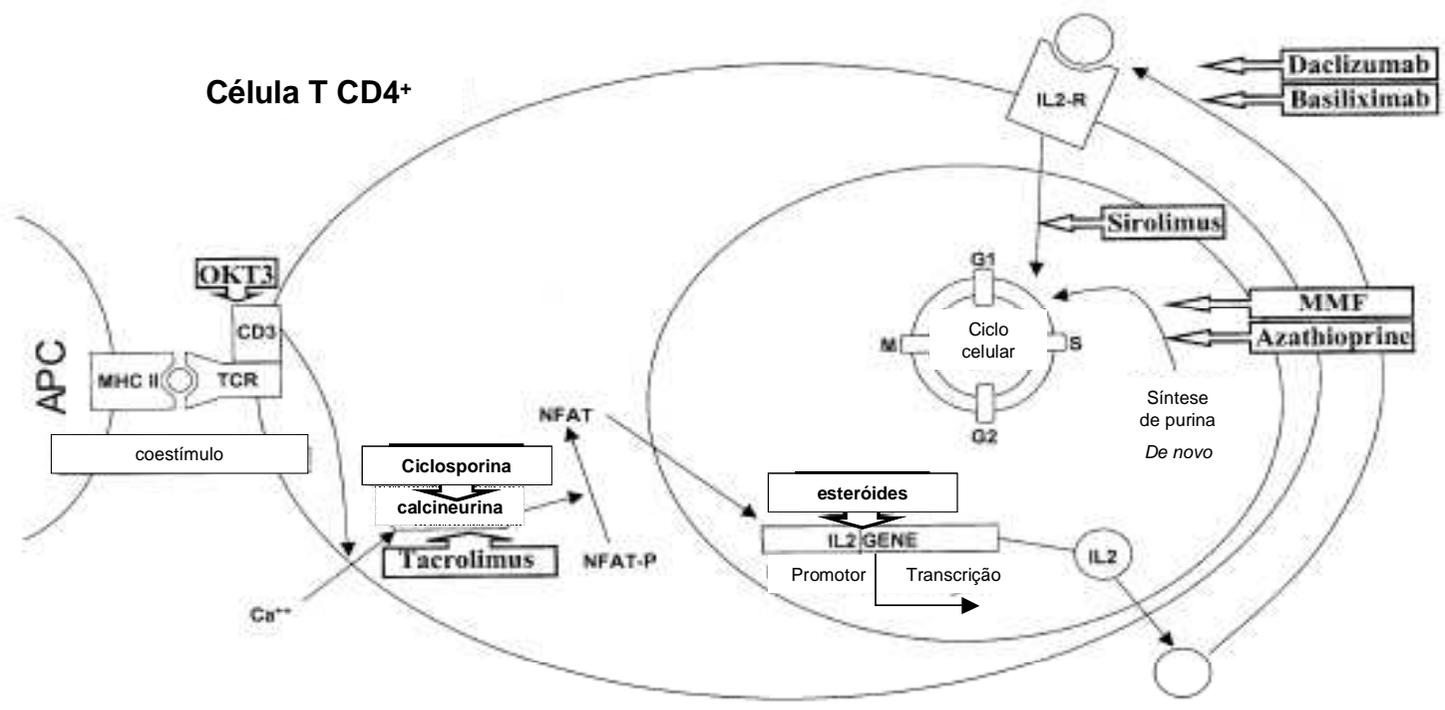


Fig. 2 – Mecanismos de ação dos principais imunossupressores utilizados pós-transplante hepático.
 Estágios de ativação de linfócitos T e produção de citocinas com identificação de sítios de ação de diferentes agentes imunossupressores .

1.6- Aspectos imunológicos do fígado

O fígado tem duplo suplemento sangüíneo, mantido pela veia portal e pela artéria hepática. Devido à sua localização anatômica estratégica e à sua função, o órgão é continuamente exposto a uma grande carga de antígenos intestinais que incluem patógenos, toxinas e células tumorais (Mowat, 2003), fazendo com que desempenhe não apenas função de depuração interna do sangue, mas também remova substâncias estranhas oriundas do trato digestivo. Estas características fazem do fígado um órgão dotado de um mecanismo imunológico rápido e alternativo em resposta a potenciais agressores específicos. Ele é o sítio para a produção de citocinas, componentes do complemento e proteínas de fase aguda, além de conter um grande número de fagócitos, células apresentadoras de antígeno e linfócitos (Wick *et al*, 2002). Por outro lado, o fígado é considerado classicamente um órgão de tolerância, já que a presença constitutiva de moléculas microbianas e outros antígenos, impõe restrições à resposta imunológica que é gerada no órgão, e existem diferentes mecanismos de controle que determinam se o encontro com o antígeno irá resultar em imunidade ou tolerância (Crispe, 2003) (Fig. 3).

O processo inflamatório hepático é dependente da quantidade e da qualidade do antígeno e maneira como é processado pelo tecido hospedeiro. A ineficácia do processo inflamatório em debelar o agente causal, relacionada com uma tolerância imunológica, leva à manutenção do processo e cronicidade, caracterizada pelo aumento da produção e liberação de mediadores solúveis e de seus componentes. Por outro lado, um processo inflamatório maciço induz à lesões teciduais extensas (Williams & Iatropoulos, 2002).

Uma ampla rede de componentes, tanto dos mecanismos inatos quanto adaptativos de imunidade, pode estar envolvida no processo inflamatório hepático. Classicamente, numa etapa inicial do contato do fígado com o patógeno, predominam os mecanismos inatos, com a ativação do sistema complemento e outros componentes solúveis, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-12, que determinam a produção local de gradientes teciduais de quimiocinas, prostanóides, leucotrienos e moléculas de adesão, orquestrados pelas células de Kupffer e outras células apresentadoras de antígeno (APC, do inglês: *Antigen Presenting Cells*), resultando na lesão hepatocelular inicial (Williams & Iatropoulos, 2002). Ainda dentro da

imunidade inata, são descritos neutrófilos, que participam como produtoras de espécies reativas de oxigênio, além de atuarem como importantes células inflamatórias pela síntese de TNF- α (Wang *et al*, 1995). Outros tipos de granulócitos, como os eosinófilos, também têm sido indicados como importantes células da imunidade inata em pacientes com diferentes patologias do fígado (Nagral *et al*, 2001, Takahashi *et al*, 2006). Em estudos experimentais, células Natural Killer (NK) (CD56⁺ CD3⁻) e células Natural Killer T (NKT) (CD56⁺ CD3⁺), em associação com granulócitos, também foram descritas na lesão hepática após isquemia-reperfusão (Shimamura *et al*, 2005).

O envolvimento da imunidade adquirida, é desencadeado pela polaridade dos linfócitos do tipo T *helper* CD4⁺ em resposta Th1 ou Th2, ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) seguida da produção de anticorpos pelos plasmócitos. Diversas citocinas, incluindo as interleucinas (IL-2, IL-12 e IL-18) e o interferon- γ (IFN- γ), vêm também sendo descritos no aumento da atividade citotóxica mediada por células como linfócitos citotóxicos T CD8⁺, tendo como alvo o tecido hepático (Kimura *et al*, 1999). Concorrendo para a eliminação do patógeno e fim do estímulo inflamatório, mediadores antiinflamatórios como as interleucinas: IL-4, IL-5 e IL-10, predominam na resposta tipo Th2, regredindo o processo e evitando a lesão aos tecidos vizinhos (Balkwill & Pitha, 1997).

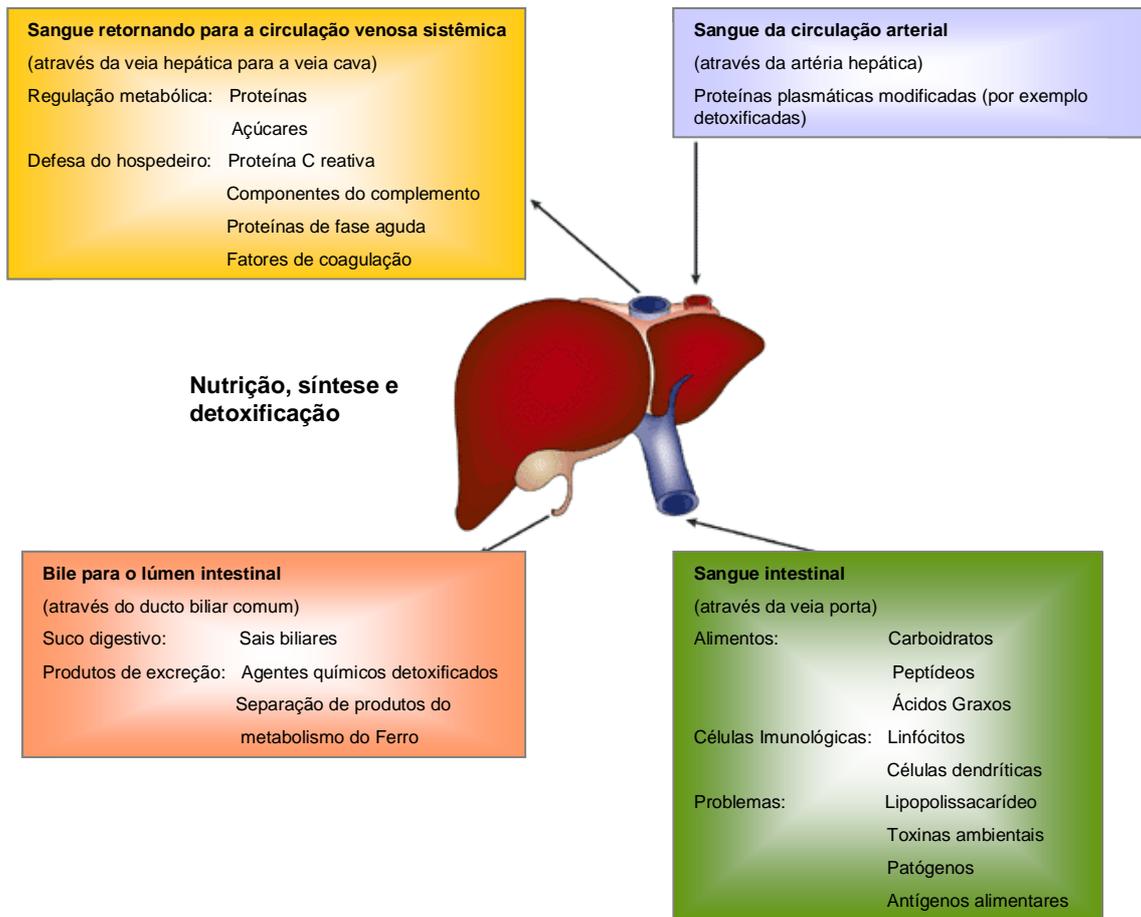


Fig. 3- Diferentes vias (entrada e saída) do fluxo sanguíneo hepático e principais funções do fígado.

A figura mostra que, em adição ao papel metabólico central e à sua interação com as células T, o fígado dá uma importante contribuição para a defesa do hospedeiro pela síntese de moléculas de defesa, incluindo componentes do complemento e fatores de coagulação (Adaptado de Crispe, 2003).

1.6.1- Papel das citocinas nas doenças hepáticas

As famílias de citocinas consistem de diversas subfamílias: as interleucinas, a família do fator de necrose tumoral, os interferons (IFNs), as quimiocinas, o fator de transformação do crescimento (TGF- β), fatores estimuladores de colônias entre outros (Tracey & Cerami, 1993, Dinarello, 1996)

Nas doenças hepáticas, as citocinas são associadas com morte dos hepatócitos e fibrose, mas paradoxalmente medeiam a regeneração do fígado após a lesão (Trauner *et al*, 1998, Friedman, 2000, Tilg & Diehl, 2000). As citocinas Th1 têm importante papel nas hepatites agudas, não sendo relevantes na indução de fibrose, enquanto que as citocinas Th2 aumentam a transcrição de diversos genes fibrogênicos, incluindo pró-colágeno I e III, metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), MMP-9 e inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMP) (Hoffmann *et al*, 2001, Sandler *et al*, 2003). Na esteato-hepatite, citocinas Th1 caracteristicamente geram uma resposta inflamatória e são associadas com a gravidade da doença em alguns modelos animais (Kremer *et al*, 2006).

Dentre as citocinas proinflamatórias, o TNF- α vem sendo descrito por sua importância central nas hepatopatias devido à sua capacidade de induzir tanto a morte quanto a proliferação dos hepatócitos, este efeito dual reflete sua habilidade em induzir tanto o fator nuclear κ B (NF- κ B do inglês: *Nuclear factor - κ B*) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK do inglês: *mitogen-activated protein kinase*), quanto os mecanismos de apoptose por caspases (Tilg *et al*, 2006, Wullaert *et al*, 2007). Sua produção ocorre principalmente por macrófagos ativados e em pequenas quantidades por muitos outros tipos celulares, sendo um dos eventos mais precoces em diversos tipos de lesão hepática (Ding & Yin, 2004). O papel hepatoprotetor e regenerativo do TNF- α é atribuído principalmente à ativação de NF- κ B, já que em modelos experimentais, a deficiência de proteínas relacionadas à sua via de sinalização leva a um aumento da apoptose (Rudolph *et al*, 2000, Luedde *et al*, 2005). A ativação da via de NF- κ B pelo engajamento do TNF- α ao seu receptor TNF-R1, leva a um controle do tempo e da magnitude da ativação de MAPKs como P38, ERK (do inglês: *extracellular signal-regulated kinase*) e quinase ativada por c-JUN (JNK) (do inglês: *Jun N-terminal*

kinase), pois sabe-se que uma ativação transitória de JNK leva à sobrevivência da célula, enquanto que a ativação prolongada leva à morte (Wullaert *et al*, 2006). A associação destes mecanismos com os de outras citocinas, como a IL-6, em várias formas de doenças do fígado, como câncer hepático, lesão por isquemia/reperfusão e hepatite alcóolica tem sido bem documentada (Yamada *et al*, 1997, Bradham *et al*, 1998, Teoh *et al*, 2003, Pikarsky *et al*, 2004, Maeda *et al*, 2005).

A IL-6, assim como o TNF- α , é uma citocina pró-inflamatória com propriedades diversas como diferenciação celular, apoptose e sobrevivência, sendo bastante estudada em modelos de sepse (associada à vasodilatação esplênica e hipotensão sistêmica), inflamação e câncer (Minghini *et al*, 1998, Mudter & Neurath, 2007, Rose-John *et al*, 2007). Existem muitas descrições de um amplo efeito hepatoprotetor da IL-6, mediado pela ligação ao seu receptor IL-6R (gp80), seguido pela dimerização da proteína gp 130 e ativação da via de sinalização Janus Kinase (JAK) - STAT 3 (do inglês: signal transducers and activators of transcriptions) (Taub, 2003). Este mecanismo leva à síntese de várias proteínas antiapoptóticas, entre elas Bcl-xl e Bcl-2 (Hong *et al*, 2002). Estudos anteriores, demonstraram que a injeção de IL-6 previne a lesão hepática induzida por concanavalina A (Con A), acetaminofeno, molécula FasL e etanol (Tiegs *et al*, 1992, Trautwein *et al*, 1998, Kovalovich *et al*, 2001, Hong *et al*, 2002, Masubuchi *et al*, 2003). Por outro lado, a IL-6 pode contribuir para o processo fibrótico (Kershenovich Stalnikowitz & Weissbrod, 2003).

Outras citocinas produzidas por macrófagos em resposta a estímulos como o estresse oxidativo e/ou endotoxinas bacterianas são os membros membros da família IL-1 (IL-1 α e IL-1 β). Em conjunto com o TNF- α e a IL-6, as citocinas IL-1 α e β promovem a maciça síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, como Amiloidose A, Proteína C reativa, C3, fibrinogênio e macroglobulina (Maher, 1999). A ligação da IL-1 ao seu receptor celular IL-1R, leva à sinalização intracelular idêntica à dos receptores de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês: *pathogen-associated molecular patterns*), uma vez que existe alta homologia entre eles. Esta sinalização leva à produção de outras proteínas efetoras da inflamação, como por exemplo citocinas/quimiocinas, óxido nítrico sintase induzida, prostanóides e MMPs e induz sintomas como febre e anorexia (Barksby *et al*, 2007).

Ainda respondendo a estímulos inflamatórios, as células de Kupffer também são produtoras de outra citocina pertencente à família da IL-1, a IL-18. Esta citocina possui características importantes, como a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão, óxido nítrico sintase e Fas-L, tendo um papel marcante na patogênese da lesão por isquemia-reperfusão no fígado, rins e coração e em outras doenças hepáticas induzidas por endotoxina e Con A. Além disto, um papel imunoregulador proeminente desta citocina se dá pela sua propriedade biológica de induzir a síntese de IFN- γ , agindo em sinergismo com a IL-12 e a IL-15, desviando a resposta para Th1 (Nakamura *et al*, 1989, Dinarello, 2007).

Em contraste às citocinas pró-inflamatórias descritas, diversas outras citocinas com papel antiinflamatório têm sido bastante discutidas na patogênese das doenças hepáticas, dentre elas a IL-10 e o TGF- β . Ambas são conhecidas como inibidoras da função dos linfócitos T pró-inflamatórios e no fígado possuem ação principalmente na formação da fibrose (Gressner & Weiskirchen, 2006, Zhang *et al*, 2006). A IL-10 é produzida por uma variedade de células, como subtipos de células T, monócitos e macrófagos. No fígado, a produção de IL-10 tem sido documentada em resposta a estímulos de estresse, em hepatócitos, células endoteliais sinusoidais, células de Kupffer, células estreladas hepáticas e linfócitos residentes do fígado (Wan *et al*, 1997, Platzer *et al*, 2000, Riese *et al*, 2000).

Os efeitos da IL-10 têm sido observados na hepatite viral e auto-imune, doença alcoólica do fígado e em modelos animais (Santucci *et al*, 1996). Pacientes com uma intensa resposta pró-inflamatória durante a infecção aguda pelo HCV podem fazer o “clearance” viral, enquanto que pacientes que respondem com um padrão antiinflamatório (com altos níveis de IL-10) se tornam portadores crônicos (Barrat *et al*, 2002). Em modelos de lesão hepática induzida por galactosamina/LPS, o tratamento com IL-10 reduziu marcadamente níveis de transaminases e o dano hemorrágico hepático nos camundongos expostos à toxinas (Louis *et al*, 1997). Outros dados sugerem que IL-10 proteja contra a lesão por isquemia/reperfusão por suprimir a ativação de NF κ B e subsequente expressão de mediadores pró-inflamatórios (Yoshidome *et al*, 1999).

O TGF- β é a uma citocina que demonstra atividade em um grande número de tipos celulares. Em mamíferos são produzidas três isoformas (TGF- β 1- β 2 - β 3). Destas, o TGF- β 1 é a mais amplamente expressa, e a maioria das células é capaz de sintetizá-lo e de responder ao seu estímulo. Age como potente inibidor do ciclo celular, promove a cicatrização e estimula a produção de componentes da matriz extracelular, porém sabe-se que sua principal função é a de controlar a resposta imunológica, já que em modelos experimentais *Knockout* ocorre inflamação generalizada e autoimunidade (Gorham, 2005). No fígado, tem ação importante na formação de fibrose, sendo esta ação diretamente dependente de sua concentração no tecido, enquanto que sua inibição em modelos tais como de inflamação crônica, é capaz de suprimir a fibrose. Está envolvido em diversos processos crônicos de hepatite, como a cirrose. Em relação às hepatites virais, o TGF- β se encontra aumentado no plasma de pacientes em fase aguda das hepatites A e B, logo na primeira semana, enquanto que na hepatite C se encontra aumentado a partir da terceira semana e também na fase crônica. Em modelos de hepatite fulminante, encontra-se o aumento da expressão do RNAm do TGF- β na fase regenerativa (Nakamura *et al*, 2000, Arias *et al*, 2003, Flisiak *et al*, 2005, Aihaiti *et al*, 2006, Kamal *et al*, 2006).

1.6.2 - Quimiocinas na patogênese das doenças hepáticas

Quimiocinas são mediadores inflamatórios classicamente conhecidos por atraírem células inflamatórias ao foco da inflamação/infecção. Atualmente, as quimiocinas são separadas em duas famílias estruturalmente e funcionalmente distintas de acordo com o posicionamento relativo de dois resíduos de cisteína no seu N-terminal (Simpson *et al*, 2003). Na família das CC quimiocinas, incluem-se as proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1 a MCP-5 do inglês: *protein chemoattractant to monocytes*), eotaxina, RANTES (do inglês *Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*) e as proteínas inflamatórias de macrófagos (*MIPs* do inglês: *macrophage-inflammatory proteins*). Na família das CXC quimiocinas, incluem-se entre outras, a IL-8 (CXCL8).

Devido ao seu envolvimento em diversos processos patológicos, um maior entendimento do papel das quimiocinas e seus receptores em diversas doenças poderia levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estudos anteriores, vêm demonstrando o envolvimento de algumas destas quimiocinas em diferentes modelos de doença hepática (Simpson *et al*, 2003).

A IL-8 foi uma das primeiras quimiocinas a ser identificada e caracterizada, sendo produzida por diferentes células após um estímulo apropriado (Simpson *et al*, 2003). A exposição de hepatócitos a estímulos como o estresse oxidativo, etanol, IL-1 β e TNF- α resulta na produção de IL-8 (Rowell *et al*, 1997). Alguns estudos têm descrito níveis circulantes da IL-8 em pacientes com doença hepática, tendo sido relatadas altas concentrações em pacientes com hepatite alcoólica (Hill *et al*, 1993, Huang *et al*, 1996). Níveis circulantes de IL-8 também estão aumentados em pacientes com hepatite viral crônica (Shimoda *et al*, 1998). Em geral níveis aumentados de IL-8 são correlacionados com reduzida sobrevida e piora da função hepática (Huang *et al*, 1996).

Uma alta produção hepática de MCP-1 (CCL2) foi observada em modelo murino de sepse, no entanto, a fonte desta expressão aumentada não foi conhecida. Por outro lado, outros estudos demonstraram que níveis de MCP-1 são elevados no soro e fígado devido à sua produção por monócitos/macrófagos (Matsukawa *et al*, 2000). A MCP-1 também é liberada por células de Kupffer em resposta a radicais de oxigênio, tendo suas concentrações diminuídas, seguida de redução da lesão hepática após a inibição deste estímulo. Além disso, esta quimiocina pode modular a lesão tecidual dependente de leucócitos polimorfonucleares regulando o aumento da expressão de adesão endotelial. Estes dados apontam o papel de MCP-1 no recrutamento de células inflamatórias para o fígado (Simpson *et al*, 2003).

MIP-1 α (CCL3) é descrita em um modelo de sepse experimental, e também na hepatite crônica induzida por álcool em ratos. O aumento da expressão hepática de MIP-1 α também ocorre em células de linhagem sinusoidal e ductos biliares intra-lobulares no fígado de camundongos com doença enxerto-versus-hospedeiro (Murai *et al*, 1999, Serody *et al*, 1999).

1.6.3- Papel de eosinófilos nas hepatopatias

Eosinófilos são granulócitos bilobulados com grânulos secundários que podem ser corados especificamente em cortes histológicos por suas propriedades catiônicas. As ações citotóxicas destas células consistem na liberação de proteínas catiônicas pré-formadas, que estão armazenadas nos grânulos. Foram descritas quatro proteínas catiônicas primárias, denominadas peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (Rothenberg & Hogan, 2006). Além de seu papel bem descrito na patogênese de doenças alérgicas e infecções parasitárias, eosinófilos também são conhecidos por responderem a outros diversos estímulos, incluindo lesões teciduais não específicas, rejeição a enxertos e tumores (de Groen *et al*, 1994, Nagral *et al*, 2001, Wagner *et al*, 2006).

Entre as citocinas envolvidas na ativação de eosinófilos, a interleucina 5 (IL-5) é considerada uma das mais importantes, por estimular a mobilização destas células da medula óssea até o sangue periférico (Palframan *et al*, 1998). Eosinófilos ativados podem sintetizar IL-5, cujas atividades autócrinas aumentam suas próprias funções efectoras (Huang *et al*, 2005). Além disso, os eosinófilos podem responder ao estímulo da eotaxina, uma quimiocina descrita por ativar seletivamente eosinófilos, sendo recrutados da circulação ao foco inflamatório, modulando a resposta imunológica por meio de uma rede de mecanismos que podem envolver a produção de citocinas próinflamatórias como IFN- γ e antiinflamatórias como IL-10, além da IL-6 (Fig. 4). Além da eotaxina, outras quimiocinas como: ecalectina/galectina-9 (ECL/GL9), MIP-1 α , MCP-1, RANTES e IL-8 estão também envolvidas na migração e ativação de eosinófilos (Nagano *et al*, 1999, Pham *et al*, 2001, Rothenberg & Hogan, 2006, Takahashi *et al*, 2006). MIP-1 α é quimioatraente para eosinófilos e neutrófilos tanto *in vitro*, quanto em diversos modelos de doença em camundongos (Campbell *et al*, 1998, Teixeira, 1998), sendo sua ação principalmente mediada pelo receptor CCR-1 (do inglês: chemokine receptor-1). Estudos recentes, descreveram o papel de MIP-1 α na resposta inflamatória envolvendo eosinófilos em infecções por paramixovírus (Domachowske *et*

al, 2000, Domachowske *et al*, 2000). Um modelo representativo de diferentes funções descritas para os eosinófilos está ilustrado na figura 4.

Nas doenças gastrointestinais humanas, o papel de eosinófilos é bastante discutido, sendo o acúmulo destas células no trato gastrointestinal uma característica comum destes distúrbios, nos quais se incluem a gastroenterite eosinofílica, reações a drogas, infecções helmínticas, colite alérgica, doença inflamatória de Bowel e doença do refluxo gastresofágico (Keshavarzian *et al*, 1985, Carvalho *et al*, 2003, Rothenberg, 2004) .

O papel de eosinófilos em diversos processos patológicos do fígado, assim como na rejeição do enxerto pós-transplante hepático também é bastante discutido. Foi descrito em pacientes com episódios de rejeição aguda celular ao enxerto hepático, um aumento significativo na contagem dos valores absolutos e relativos de eosinófilos em comparação àqueles que não tiveram rejeição. Todavia, não houve diferença significativa na contagem absoluta de eosinófilos no período pré-transplante entre os dois grupos estudados (Nagral *et al*, 2001). Nos estágios iniciais da cirrose biliar primária (CBP), um infiltrado eosinofílico do trato portal é freqüentemente observado, sendo que alguns autores descreveram em pacientes com CBP, elevados níveis plasmáticos de RANTES, consistentemente com o aumento na contagem de eosinófilos no sangue periférico. Além disso, uma correlação significativa entre níveis de RANTES no plasma e o número de eosinófilos no infiltrado hepático foi observada (Miyaguchi S, 1997). Tsuneyama e colaboradores, também mostraram um provável papel da eotaxina e RANTES associado ao dano de ductos biliares na CBP. Neste estudo, os autores sugerem que a expressão biliar de RANTES pode desempenhar um papel na migração de precursores de macrófagos e eosinófilos para áreas do tecido próximas às células do epitélio biliar. Também é sugerido que em resposta à inflamação ou infecção das células do epitélio biliar, células inflamatórias como macrófagos e eosinófilos, podem ser ativadas e expressar eotaxina, o que leva ao recrutamento de eosinófilos nas áreas lesadas dos ductos biliares (Tsuneyama K, 1999). Ainda na CBP, a caracterização do perfil de citocinas no fígado de pacientes demonstrou uma mais alta expressão de IL-5, associada com infiltrado eosinofílico, quando em comparação com biópsias de paciente com hepatite C crônica e controles normais (Nagano *et al*, 1999). A síndrome hipereosinofílica com um infiltrado inflamatório composto principalmente de eosinófilos,

também está presente na forma aguda e crônica ativa de hepatite, sendo associada com necrose das células hepáticas (Ung *et al*, 2000).

A lesão hepática induzida por drogas é referida freqüentemente como sendo de origem alérgica, sendo ocasionalmente acompanhada de infiltrado hepático eosinofílico, onde pode ser observada uma alta expressão de ecalectina/galectina-9 (presente em linfócitos T) em fígados de pacientes (Pham *et al*, 2001, Takahashi *et al*, 2006). Infiltrados eosinofílicos hepáticos associados com a produção de IL-5 foram observados em modelos animais de lesão hepática induzida por Con A. A lesão no fígado foi drasticamente reduzida em camundongos deficientes de IL-5 ou com depleção de eosinófilos. Relacionou-se também a presença de NKT com a lesão hepática, as quais foram sugeridas como uma crítica fonte de IL-5 (Louis *et al*, 2002). Em modelos de lesão hepática induzida por LPS, camundongos exibiram marcado infiltrado eosinofílico e extensa necrose lobular hepática. A transmigração de eosinófilos através do endotélio vascular e a degranulação citotóxica foi observada em áreas inflamadas. Neste estudo, foi sugerido que as células de Kupffer, ativadas pelo LPS, desempenhavam um papel chave na citotoxicidade eosinofílica pela liberação de TNF- α (Tsuda *et al*, 2001).

Na falência hepática fulminante, são escassos os estudos descrevendo o papel de eosinófilos, sendo que estes estudos sugeriram uma necrose eosinofílica relacionada à infecção pelo HDV ou ao uso de medicamentos (Ljunggren *et al*, 1985, Buitrago *et al*, 1986, Robbie *et al*, 1988, Verrico *et al*, 2000).

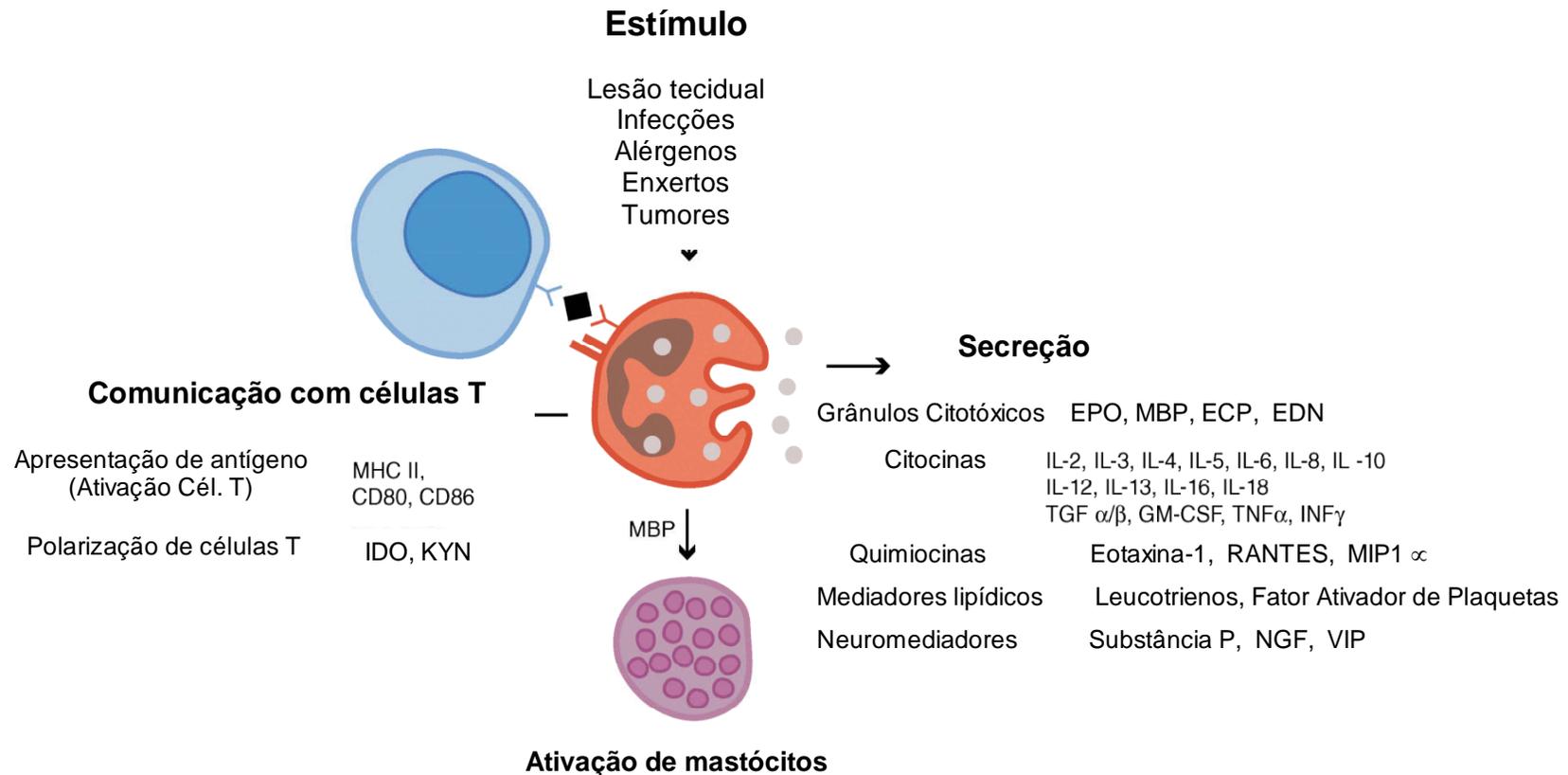


Fig. 4 – Modelo representativo das diferentes funções descritas para os eosinófilos.

Os eosinófilos possuem grânulos, os quais contêm quatro proteínas catiônicas primárias, designadas, peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). Todas as quatro proteínas são moléculas citotóxicas. Os eosinófilos respondem a diversos estímulos, incluindo lesão tecidual não-específica, infecções, enxertos, alérgenos e tumores. Eosinófilos também liberam diversas citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e neuromoduladores, podem ativar células T via MHC II, servindo como APC. A MBP derivada de eosinófilos também está envolvida na ativação de mastócitos. Estas células também podem regular a polarização celular por meio da síntese de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima que cataliza a conversão de triptofano à quinureninas (KYN), um regulador do balanço Th1/Th2 (Rothenberg e Hogan, 2006).

1.6.4- Papel de Linfócitos nas hepatopatias.

1.6.4.1 – Células Natural Killer

As células Natural Killer (NK) são descritas como importantes coadjuvantes da resposta inflamatória inata, sendo sua ação mediada por citotoxinas ou via receptores de morte celular (Smyth *et al*, 2005). Estas células são capazes de reconhecer e induzir morte de células que apresentam alterações em moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe I (MHC-I do inglês, *Major Histocompatibility Complex*). Sem a necessidade de ativação prévia, células NK podem responder e eliminar células tumorais, células infectadas e até mesmo células que expressem metabólitos de drogas (Castell, 1998, Karre, 2002). As células NK humanas expressam em sua superfície moléculas como CD56, que é um dos marcadores principais deste fenótipo; cerca de 90% destas células expressam esta molécula em baixa densidade (CD56^{Low}) e expressam em grande quantidade o receptor de Fc de alta afinidade (Fc γ RIII, CD16^{High}). Por outro lado, 10% destas células, expressam em alta densidade o receptor CD56 (CD56^{High}) e baixos níveis de CD16 (CD16^{Low}). Estas particularidades fenotípicas refletem o alto potencial de citotoxicidade (CD56^{Low} CD16^{High}) ou a maior produção de citocinas (CD56^{High} CD16^{Low}) (Cooper *et al*, 2001) .

Além das células NK, um outro subtipo de célula CD56⁺ foi definido como célula T que expressa o receptor de células T invariável (TCR), descrita como Natural T Cell (NKT) (CD56⁺CD3⁺). Esse receptor de NKT é responsável pelo reconhecimento de antígenos glicolipídicos ligados às moléculas CD1 expressas por APCs (MacDonald, 2002, Tupin *et al*, 2007).

Na ausência de um processo inflamatório, os mecanismos efetores das NK estão regulados negativamente por receptores inibidores, dentre eles Ly49, CD94/NKG2, KIRs (do inglês: *killer immunoglobulin-like receptors*). Esses receptores inibidores são descritos por evitarem a ativação desnecessária destas células, evitando a auto-reatividade (Hamerman *et al*, 2005, Lanier, 2005) .

As células NK e NKT são as populações de linfócitos predominantes no fígado, totalizando mais de 50% dos linfócitos hepáticos totais. Sabe-se que o número de NK e NKT aumenta ainda mais durante os processos inflamatórios hepáticos (McIntyre & Welsh, 1986, Li & Diehl, 2003).

Durante a lesão experimental induzida por Con A e durante a infecção do fígado por vetores de adenovírus, as células NK desempenham um papel crucial no recrutamento de células T (Toyabe *et al*, 1997, Liu *et al*, 2000). Na infecção de camundongos pelo citomegalovírus, a produção de interferons do tipo I pelos hepatócitos infectados induz a síntese da quimiocina MIP-1 α , além de IL-12 e IL-18, pelas células de Kupffer, provocando um aumento da migração e acúmulo de células NK no fígado (Salazar-Mather *et al*, 1998). Estas células iniciam, então, a produção local de IFN- γ , promovendo a secreção de uma outra quimiocina a MIG (Monocina Induzida por IFN- γ (do inglês: *Monocin induced by Interferon γ*), provavelmente por hepatócitos e/ou LSECs, o que seria responsável pelo acúmulo de células T e indução de imunidade (Crispe, 2003). Na hepatite crônica pelo HCV, as NK desempenham uma importante função no controle da replicação viral nas células hepáticas por um mecanismo dependente de IFN- γ (Li *et al*, 2004).

Diferentes receptores de ativação são descritos nas células NK, sendo importantes ferramentas de estudo das funções destas células durante processos de destruição tecidual. Dentre esses receptores, incluem-se os de ativação precoce CD69, CD38 e as moléculas HLA-DR, e outros relacionados com a regulação positiva da atividade citotóxica, como CD11a (LFA-1 do Inglês *Lymphocyte Function Associated Antigen-1*) e CD44 (Rafi-Janajreh *et al*, 1998, Matsumoto *et al*, 2000, Mallone *et al*, 2001). Os receptores usados por células NK para mediar a função citotóxica não estão bem definidos, embora tenham sido sugeridas algumas moléculas que possam servir para esta função, dentre elas o CD38 (Sconocchia *et al*, 1999).

Durante o processo de ativação, células NK respondem ao estímulo de diferentes citocinas, produzidas por células como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs do Inglês *Dendritic Cells*), principalmente IL-12, IL-15 e IL-18. Diferentes citocinas também são liberadas pelas NK, principalmente o IFN- γ (Moretta *et al*, 2002, Watford *et al*, 2003).

Assim como para as células NK, diversos estudos demonstram a importância das células NKT no ambiente hepático. Estas células são hábeis em produzir tanto IFN- γ quanto IL-4 dependendo do seu estágio de diferenciação (Chen & Paul, 1997), induzindo a proteção nos estágios hepáticos da malária, suprimindo a síntese de RNA viral do HBV em modelos murinos e protegendo contra metástases hepáticas do

melanoma (Toura *et al*, 1999, Gonzalez-Aseguinolaza *et al*, 2000, Kakimi *et al*, 2000). Por outro lado, em infecções murinas pela bactéria *Propionibacterium acnes* e na esteatose hepática, estas células se encontram diminuídas (Matsui *et al*, 1997, Guebre-Xabier *et al*, 2000).

1.6.4.2 – Linfócitos T e B

O desenvolvimento da imunidade adaptativa envolve a proliferação dos linfócitos T e B antígeno-específicos, que ocorre quando receptores de superfície destas células ligam-se ao antígeno. Cada clone de linfócitos desempenha importante função efetora. As células B secretam as imunoglobulinas responsáveis, principalmente, pela eliminação de patógenos extracelulares, enquanto que as T podem ser subdivididas em dois grupos principais: As células CD4⁺, que auxiliam a secreção de anticorpos pelas células B e na ativação de outras células como macrófagos e células citotóxicas e as células CD8⁺ que possuem principalmente função citotóxica contra células infectadas e tumorais (Schwartz, 2003).

Os linfócitos T são ativados pelo engajamento de seus receptores (TCR do Inglês *T Cell Receptor*) às moléculas MHC-I (CD8⁺) ou MHC-II (CD4⁺) contendo o peptídeo antigênico na presença de moléculas co-estimuladoras. As APC, dentre elas macrófagos e DCs, têm um papel crucial na ativação de linfócitos T CD4⁺, expondo antígenos via MHC-II e produzindo citocinas como a IL-12. Já o processo de reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos B se dá pela ligação direta de seu receptor (BCR do Inglês *B Cell Receptor*) à molécula estranha na sua forma nativa, porém, sem o auxílio de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5, produzidas pelos linfócitos T ativados, estas células são incapazes de proliferarem e sofrerem maturação dos anticorpos. Em um momento posterior, linfócitos em estágio de ativação/expansão clonal, passam a expressar diferentes moléculas, envolvidas na sinalização intracelular e nos processos de migração para os tecidos inflamados (Sprent & Surh, 2001, Schwartz, 2003).

A biologia das células T do fígado é diferente daquela de qualquer outro órgão, pois a apresentação de antígenos neste local se dá por diferentes mecanismos. As células de Kupffer constituem um sistema de captura de antígenos e o fígado é patrulhado por células APCs profissionais (as DCs imaturas). Estas últimas são

encontradas nos espaços portais, mas perdem a expressão característica de CD11c (Prickett *et al*, 1988). Sabe-se que a apresentação de antígenos por estas células pode induzir a um mecanismo de imunidade, pela produção de IL-12, ou de tolerância, pela produção de IL-10, que é prevalente no fígado normal, levando à indução de tolerância por células T reguladoras (Tregs). A ativação dos linfócitos T pelas células dendríticas residentes pode gerar imunidade que ajuda a resolver o quadro de algumas infecções virais no fígado. É o caso, por exemplo, da hepatite A em humanos e da hepatite em camundongos imunocompetentes (Wang *et al*, 1995, Homberger & Zhang, 1997). Entretanto, muitas infecções do fígado são persistentes, mesmo com o desenvolvimento de uma resposta imunológica. Incluem-se nestes casos, três doenças de grande relevância epidemiológica: a malária, a hepatite B e a hepatite C, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento de tolerância (Good, 1995, Rehmann *et al*, 1996, Spengler *et al*, 1996, Crispe, 2003). Além das DCs e das células de Kupffer, os antígenos que alcançam os sinusóides encontram as células endoteliais do sinusóide hepático (LSEC, do inglês: *Liver Sinusoidal Endothelial Cell*). As LSECs de camundongo expressam moléculas que promovem a captura do antígeno, incluindo receptores de manose, e receptores de limpeza (*scavenger*), além de moléculas que auxiliam na apresentação do antígeno, como CD40, CD80 e CD86 (Lohse *et al*, 1996). Sendo assim, estas células estão aptas a apresentarem antígenos tanto para células CD4⁺ quanto para CD8⁺, mas mesmo expressando moléculas coestimuladoras, o maior resultado desta interação é a tolerância. Em contraste, as LSECs humanas expressam constitutivamente o CD40, mas o CD80 e o CD86 somente em situações de inflamação (Knolle *et al*, 1999, Leifeld *et al*, 1999, Limmer *et al*, 2000).

As subpopulações de células T residentes no fígado são proporcionalmente diferentes das células T sangüneas, dos linfonodos e baço. A taxa de CD4/CD8 para as células T hepáticas é reversa (1/3.5 no fígado versus 2/1 no sangue). Ambas apresentam um fenótipo ativado, com expressão de CD25 e CD69 (Pruvot *et al*, 1995). Um subtipo de linfócitos do fígado humano normal expressa os marcadores CD2 e CD7, concomitantemente com a expressão das proteínas do gene de ativação de recombinação do RNA mensageiro-1 (RAG1, do inglês: *recombination activating proteins*), RAG 2 e *preT α*, indicando que o fígado deve ser um órgão de desenvolvimento de linfócitos (Collins *et al*, 1996).

Após a apresentação do antígeno, durante os estágios iniciais de ativação, os linfócitos T passam a expressar um grande número de moléculas de superfície e liberam fatores solúveis. Uma destas moléculas é o CD38, uma glicoproteína transmembranar que aumenta o influxo de cálcio intracelular, estando envolvida nos processos de proliferação e citotoxicidade (Lund *et al*, 1998, Messele *et al*, 2000). Outras proteínas importantes expressas pelos linfócitos T ativados são as moléculas de adesão celular, mediadoras das interações entre os linfócitos, células endoteliais e a matriz extracelular, sendo sua expressão modulada pelo contato célula-célula e pela produção de fatores solúveis (Masopust *et al*, 2004). Dentre as moléculas de adesão expressas em linfócitos durante os processos migratórios, estão as integrinas, que compartilham a molécula CD29 como sua subunidade β comum (Woods & Shimizu, 2001). Uma outra molécula de adesão amplamente distribuída nos tecidos é o CD44 cujo ligante é o ácido hialurônico, a interação do CD44 com o ácido hialurônico leva à fixação e o rolamento dos linfócitos no endotélio, permitindo o extravasamento das células T aos sítios inflamados (Isacke & Yarwood, 2002). Linfócitos T citotóxicos sob ativação expressam altos níveis de moléculas CD44, as quais induzem eficiente lise celular TCR independente e não restrita ao MHC. A citotoxicidade mediada por CD44 pode desempenhar um importante papel na proteção contra infecções virais e câncer. Contudo, também pode ser relacionado ao dano tecidual não específico (Rafi-Janajreh *et al*, 1998). Em relação às hepatites virais, a inflamação do tecido hepático é acompanhada pelo aumento da expressão destas proteínas na superfície dos hepatócitos, incluindo as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), moléculas de adesão vascular 1 (VCAM-1), MHC-II, moléculas co-estimuladoras e Fas. Estes processos promovem uma mudança no tráfego destas células para o fígado, resultando na quebra na tolerância hepática (Volpes *et al*, 1990, Hiramatsu *et al*, 1994, Garcia-Monzon *et al*, 1995).

Após a chegada de células ativadas ao fígado, as populações de linfócitos teciduais mudam. Em humanos, dados recolhidos de biópsias desenham um quadro a respeito do que ocorre com as populações de linfócitos durante as hepatites. Existe um aumento no número de células T CD8 ativadas (Kakumu *et al*, 1990) e no número de células T CD4 relativas ao numero de CD8 (Pham *et al*, 1994). Durante a infecção com HCV, as células T CD8⁺ são ativadas (expressam CD45 RO) e se localizam principalmente nos sinusóides, enquanto que as células CD4⁺ virgens (expressam

CD45 RA), estão localizadas nos tratos portais (Fiore *et al*, 1997). O número de linfócitos T que expressam o TCR $\gamma\delta$ é também aumentado durante as hepatites (Tseng *et al*, 2001).

Assim como os linfócitos T, os linfócitos B intrahepáticos desempenham importantes papéis. Por exemplo, durante a infecção crônica pelo HCV se formam no fígado folículos linfóides, com centros germinativos, e esta parece ser uma via intra-hepática de perturbação na maturação e expansão de células B. Estes distúrbios se traduzem em expressões extrahepáticas da infecção por HCV, como a crioglobulinemia e o linfoma de células B (De Vita *et al*, 1997, Murakami *et al*, 1999, Racanelli *et al*, 2001, Sansonno *et al*, 2004). Na cirrose biliar primária, as células B hepáticas estão aumentadas em relação ao fígado normal, além disto o fígado apresenta mais células ativadas do que o sangue periférico, particularmente quanto à produção de auto-anticorpos (Moritoki *et al*, 2006).

A abundância de células NKT, CD8⁺ e CD4⁺ no fígado durante os quadros de hepatite é mais condizente com os processos inflamatórios em outros locais do organismo. A figura 5 representa um resumo geral dos mecanismos de migração das células NK, NKT e linfócitos para o fígado durante as hepatites virais (Crispe, 2003).

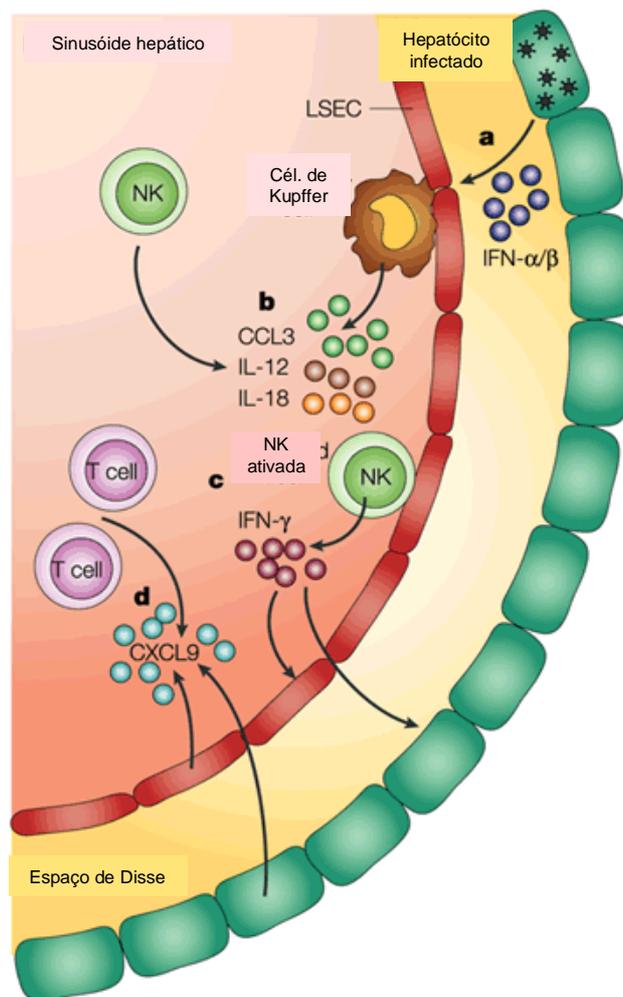


Fig. 5 - A cascata das citocinas/quimocinas por meio da qual células NK recrutam células T

a) Muitos tipos celulares, incluindo hepatócitos, sintetizam interferons do tipo I em resposta à infecção viral; **b)** As células de Kupffer respondem ao IFN- α e IFN- β pela produção de CCL3 (MIP-1 α), que recruta células NK; **c)** As células NK, também ativadas pelos outros produtos das células de Kupffer interleucina-12 (IL-12) e, talvez, IL-18, produzem IFN- γ , que estimulam as células do tecido, incluindo hepatócitos e células endoteliais sinusoidais (LSECs), a produzirem CXCL9 (Santucci *et al*); **d)** CXCL9 recruta células T. (Adaptado de Crispe, 2003).

1.6.5- Mecanismos de morte celular na falência hepática aguda

1.6.5.1 - Necrose e Apoptose

A necrose celular envolve a depleção de adenosina trifosfato (ATP), com resultante edema celular e lise, levando à inflamação secundária. A apoptose é manifestada pelo condensado nuclear e citoplasmático sem desequilíbrio da integridade membranar ou de conteúdos intracelulares. Consequentemente, a inflamação secundária não é uma característica da apoptose.

Dependendo do sítio de ativação do processo de morte celular, a apoptose pode ser iniciada por meio de duas vias: a dos receptores de morte ou via extrínseca; e a mitocondrial ou intrínseca. A via extrínseca é iniciada após a ligação de moléculas ligantes aos correspondentes receptores. Mais proeminente entre as citocinas que induzem apoptose hepatocelular são os membros da superfamília de ligantes do $\text{TNF}\alpha$. Estas citocinas exercem uma função fisiológica através de seus receptores específicos, denominados CD95 (Apo-1/Fas receptor), TNF receptor tipo 1 (TNF-R1, p55/65) (Bai & Odin, 2003). A via intrínseca pode ocorrer pela transição da permeabilidade da membrana mitocondrial, pela abertura de poros na membrana da mitocôndria com liberação de proteínas pró-apoptóticas, dentre elas o citocromo C (Ding & Yin, 2004).

A apoptose pode ser induzida por células como Linfócitos T citotóxicos CD8^+ , além de linfócitos NK que, ativados por citocinas como o $\text{TNF}\alpha$, ativam a cascata da apoptose pela liberação citotoxinas, tais como a perforina (proteína que forma poros transmembrana), e as granzimas que penetram por esses poros. Granzimas clivam proteínas intracelulares, levando à ativação das nucleases e de outras enzimas que iniciam a apoptose. Células T citotóxicas ativadas expressam a molécula de superfície ligante Fas (Fas L). A molécula FasL atuará em células alvo que expressem o receptor Fas (FasR). No fígado, a expressão de FasR é aumentada pelas citocinas inflamatórias como o $\text{TNF}\alpha$ e o interferon γ ($\text{IFN-}\gamma$). O papel do sistema Fas-FasL vem sendo amplamente discutido na hepatite fulminante (Tanaka *et al*, 1997, Ryo *et al*, 2000, Rivero *et al*, 2002).

As proteínas da família Bcl-2 são importantes reguladoras da apoptose, enquanto Bid, Bak e Bax são pró-apoptóticas, Bcl-x(L), Bcl-2 e Bcl-w possuem ação anti-apoptótica. No fígado, hepatócitos expressam níveis mais baixos de bcl-x constitutivos (Tzung *et al*, 1997).

1.6.5.1a-Vias TNF- α e TNFR1

A apoptose de hepatócitos induzida pelo TNF- α é implicada em uma ampla variedade de doenças do fígado, incluindo a hepatite viral, hepatite alcoólica, lesão hepática por isquemia/reperfusão e hepatite fulminante. A ação agonística específica do TNF- α nas células hepáticas ocorre em dois receptores de membrana: p55 (TNFR1) [do inglês, type 1 tumor necrosis factor receptor] e p75 (TNFR2) [do inglês, type 2 tumor necrosis factor receptor], que também é encontrado na forma solúvel, após clivagem de seu domínio extracelular. Os efeitos apoptóticos são mediados apenas pelo TNFR1, que nas células hepáticas é predominante, sendo altamente expresso nos hepatócitos. Em contraste o TNFR2 pode potencializar os efeitos do TNFR1 na promoção da morte celular e inflamação (Bai & Odin, 2003).

O TNFR1, após a ligação por seu ligante específico, recruta o domínio de morte associado com proteínas adaptadoras TNFR-R (TRADD), resultando não só na ativação das caspases, como também do NF- κ B e Jun-N-terminal kinase (JNK). O TNF- α induz a morte celular por ativação da cascata das caspases, sendo que após a clivagem proteolítica da caspase 8, esta ativa a caspase 3. A ativação da cascata das caspases leva à apoptose celular, pela degradação do DNA nuclear. O dano oxidativo mitocondrial também pode ativar caspase 3 pela via intínseca, após a liberação de citocromo C e o fator indutor de apoptose (AIF) no citosol (Bradham *et al*, 1998, Scaffidi *et al*, 1998, Bai & Odin, 2003) (Fig. 6).

1.6.5.1b-Via receptor Fas/ Fas-ligante

O Fas ligante (FasL) é uma proteína de membrana, pertencente à superfamília de receptores do TNF que medeia respostas celulares pela ligação específica a seu receptor Fas (FasR), levando à apoptose. Várias células expressam o Fas, enquanto que FasL é expresso predominantemente em células T ativadas. Fas e FasL estão envolvidos na modulação das respostas imunológicas, assim como, na citotoxicidade mediada por células T. O deficiente funcionamento do sistema Fas, tem como consequências distúrbios linfoproliferativos e pode acelerar doenças autoimunes, enquanto que sua exacerbação, pode causar lesão tecidual (Nagata & Golstein, 1995) .

O Fas é constitutivamente expresso sobre os hepatócitos, sendo essas células muito sensíveis à apoptose induzida pelo Fas ligante. Esta forma de expressão de Fas nos hepatócitos pode se explicada pela sua constante exposição a moléculas tóxicas, levando ao risco constante de danos ao DNA, o que poderia levar a mutação e carcinogênese, sendo assim necessário um mecanismo de rápida indução apoptose dos hepatócitos mutantes (Crispe, 2003).

A importância da apoptose mediada pelo sistema Fas-FasL na indução da falência hepática, foi demonstrada em modelo murino, pela administração de anticorpos anti-Fas via peritônio de camundongos, causando lesões graves no fígado (Nagata, 1996). Em humanos, comparando casos de hepatite fulminante, hepatite aguda benigna e indivíduos saudáveis, demonstrou-se que, em casos de hepatite fulminante, uma maior quantidade de moléculas Fas está presente em hepatócitos, infiltrados inflamatórios intra-hepáticos e também no sangue periférico. Um nível elevado de Fas solúvel ligante (sFasL) também é encontrado na forma fulminante, sendo significativamente proporcional ao aumento no tempo de protrombina (Ryo *et al*, 2000) . Rivero e colaboradores descreveram a importância da apoptose mediada pelo sistema Fas na hepatite fulminante induzida pelo vírus da hepatite B, quando nenhuma mutação genômica específica viral foi encontrada (Rivero *et al*, 2002) .

1.6.5.1c-Estresse Oxidativo intracelular

Um radical livre é um átomo ou molécula que contém um elétron não pareado em seu orbital externo. Estes radicais são altamente reativos e podem conseqüentemente causar efeitos danosos em estruturas celulares. Normalmente, pelo mecanismo de respiração celular, sobram moléculas de O_2^- (superóxido), que é uma espécie reativa de oxigênio (ROS), estas moléculas tentam agrupar-se com outras moléculas que lhes possam trazer a estabilidade eletrônica. Estes radicais altamente reativos ligam-se onde podem, provocando danos em diversas estruturas celulares. O organismo, por meio de enzimas anti-oxidantes, como a superóxido-desmutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH), consegue eliminar o acúmulo de radicais livres. No entanto, distúrbios metabólicos, como o desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e anti-oxidantes, principalmente gerados pelos metabólitos de drogas, levam a um aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os principais radicais livres intracelulares são radicais hidroxila (OH^-), as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O dano mitocondrial desempenha um papel importante na morte dos hepatócitos como conseqüência da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial. A abertura de poros na membrana da mitocôndria leva à liberação de citocromo c e AIF (do inglês: *apoptosis-inducing factor*) no citosol induzindo apoptose. A toxicidade aguda de algumas drogas em cultura primária de hepatócitos de rato foi associada ao estresse oxidativo. Em pacientes com hepatite alcoólica, baixos níveis de anti-oxidantes foram associados com estresse oxidativo (Hussain & Frazier, 2002, Masalkar & Abhang, 2005) (Fig. 6).

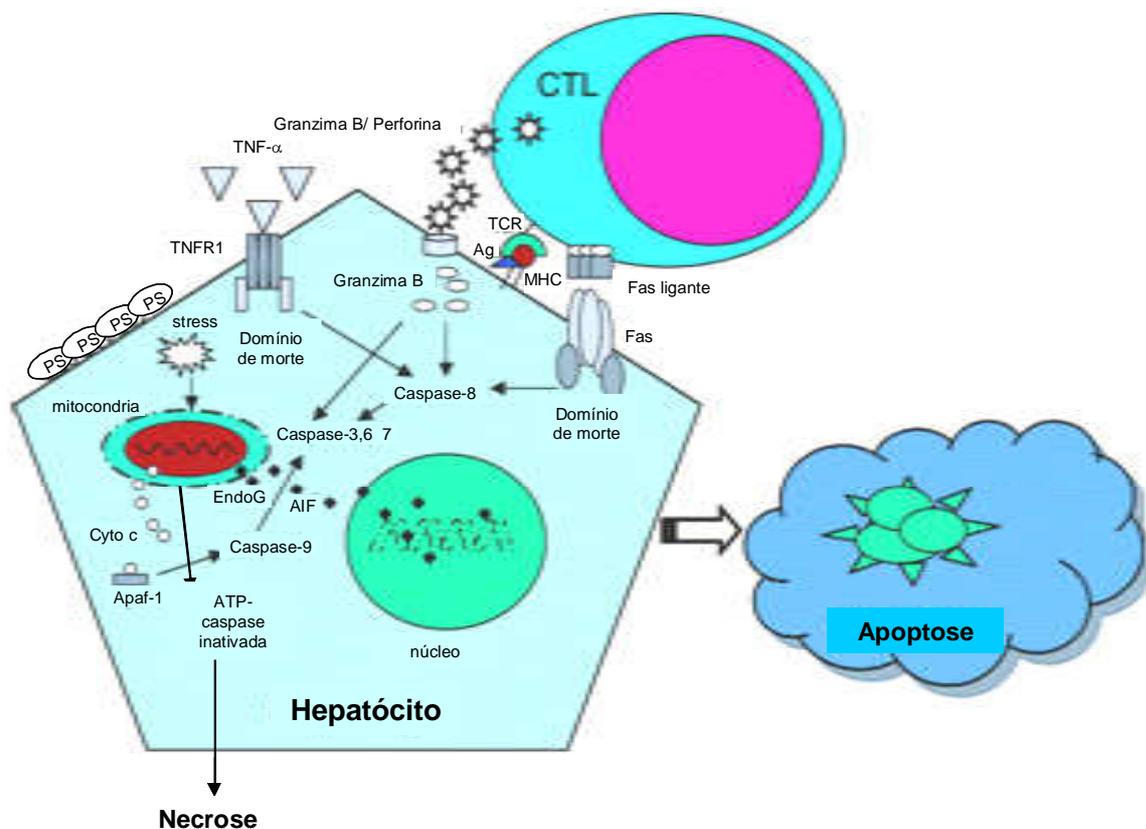


Fig. 6 - Mecanismos intrínsecos e extrínsecos de morte celular em hepatócitos.

As vias extrínsecas de apoptose dos hepatócitos podem ser ativadas por meio receptores de morte, pertencentes à superfamília de receptores TNF (TNFR1 e FasR), presentes nas superfícies celulares, ativando a cascata das caspases via caspase 8. A via extrínseca, também pode ser ativada por citotoxinas (perforinas/granzimas), as quais podem ser liberadas por células natural killer e linfócitos T citotóxicos. A via intrínseca pode ocorrer pelo estresse oxidativo, alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial, com liberação de fatores pró-apoptóticos como Endo G, AIF, os quais clivam diretamente DNA nuclear. A via intrínseca pode ainda ser ativada pela liberação de citocromo c, também decorrente da perda da integridade da membrana mitocondrial, citocromo c então ativa a cascata apoptótica via caspase 9. O estresse oxidativo pode levar à exaustão dos estoques de ATP, o que induz inibição de caspases e morte por necrose (Adaptado de Bai & Odin 2003).

1.6.5.1d- Papel do óxido nítrico

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, sintetizado via oxidação de L-arginina pela família de enzimas óxido nítrico sintases (Arias *et al*) . São descritas principalmente três isoformas da NOS. As isoformas constitutivas da NOS são a neuronal (nNOS - tipo 1) e a endotelial (eNOS - tipo 3), que produzem baixas quantidades de NO e dependem da concentração de cálcio intracelular, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos como relaxamento vascular, neurotransmissão e regulação da atividade plaquetária. A isoforma inflamatória ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é envolvida com a síntese de altos níveis de NO, e tem sua produção induzida por citocinas como IFN- γ e TNF- α durante a resposta Th1 (Nussler & Billiar, 1993, Nathan & Xie, 1994, Vitek *et al*, 2006). Citocinas como a IL-4, IL-10 e TGF- β demonstram atividade inibitória sobre a expressão da iNOS (Hausmann *et al*, 1994, Beishuizen *et al*, 1998). A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa decorrente de uma infecção ou dano tecidual. Diversas condições patológicas como endotoxemia, choque hemorrágico, isquemia/reperfusão e infecções, têm sido relacionadas com a alta produção de NO pela enzima iNOS (Hon *et al*, 2002) (fig. 7).

As três principais isoformas de NOS (nNOS, eNOS e iNOS) são expressas no fígado, sendo que a iNOS e eNOS são consideradas as mais importantes. A forma neuronal é descrita mais restritamente na inervação terminal encontrada em grandes vasos sanguíneos. Acredita-se que sob condições fisiológicas, apenas a forma constitutiva (eNOS) esteja presente no fígado, sendo responsável por produzir baixos níveis de NO. Estes baixos níveis de NO, têm sido associados com a função protetora, pela regulação da perfusão hepática, prevenção da adesão plaquetária e da trombose. A iNOS tem sido encontrada em quase todas as células hepáticas, sendo principalmente descrita em células de Kupffer ativadas, hepatócitos e células de Ito (Li & Billiar, 1999).

O óxido nítrico (NO) vem também sendo relacionado por desempenhar um importante papel nos processos patológicos hepáticos. No microambiente hepático, o óxido nítrico tem importante participação no estresse oxidativo, o que é associado à alta produção deste gás, levando à sua reação com o ânion superóxido (O_2^-) e à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) um potente agente oxidante, o qual induz à degradação de

diversos componentes intracelulares e produção de nitrotirosina, produto da nitração de proteínas (fig. 8). Desta forma, diversos trabalhos apontam que, dependendo da sua quantidade, esta molécula pode apresentar funções pró-oxidantes e anti-oxidantes durante processos inflamatórios no fígado (Aktan, 2004, Minin *et al*, 2005). Em diversas doenças do fígado, o papel da iNOS, associado com a alta produção de NO, vem sendo elucidado. Pacientes com cirrose biliar primária e hepatite auto-imune mostraram uma elevada expressão intra-hepática de iNOS, além do acúmulo de nitrotirosina, relacionados com a gravidade do dano histológico em ambas as doenças, o que foi sugerido ser consistente com a nitração das proteínas hepatocelulares mediada por NO (Sanz-Cameno *et al*, 2002). Em biópsias hepáticas de primatas não humanos com hepatite A experimental, a expressão da iNOS associada a lesões histológicas também foi encontrada por nosso grupo (Pinto *et al*, 2000). Além disto, elevados níveis de óxido nítrico foram encontrados no soro de pacientes com hepatite B aguda (Koulentaki *et al*, 2004).

Em estudos anteriores, diferentes níveis de regulação das isoformas de NOS foram descritas em condições fisiológicas e na falência hepática fulminante, sugerindo-se que, enquanto eNOS parece estar envolvida na regulação fisiológica da perfusão hepática, a intensa expressão de iNOS pode contribuir para o processo inflamatório. A iNOS também foi amplamente detectada em camundongos tratados com sílica subseqüentemente infectados com o vírus do herpes (Leifeld *et al*, 2002, Irie & Shiga, 2005).

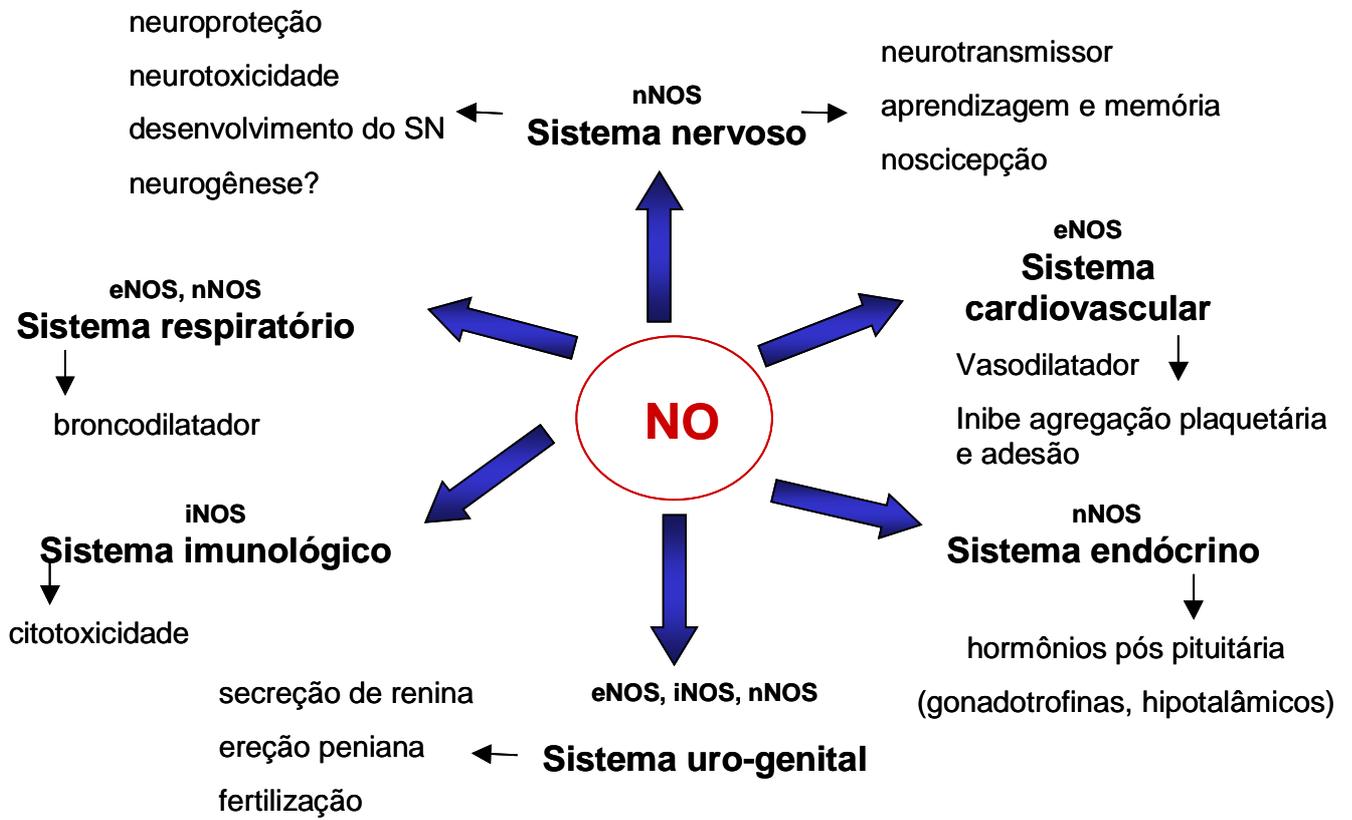
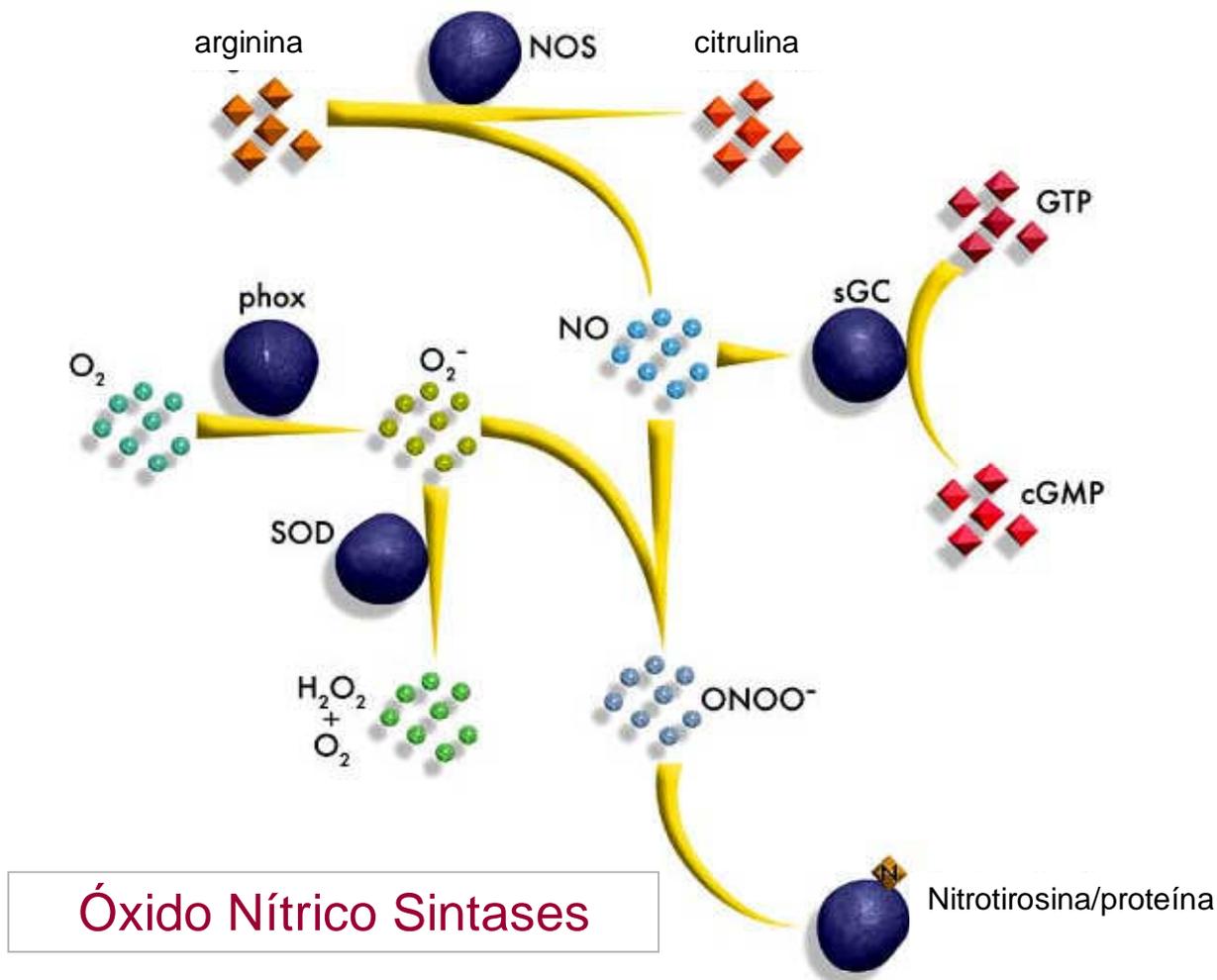


Fig. 7 - Representação esquemática das funções do óxido nítrico (NO).

Sistema cárdio-vascular (CVS); NO sintase neuronal (nNOS); NO sintase endotelial (eNOS); NO sintase induzida (iNOS) (Thippeswamy, T et al, 2006).



Óxido Nítrico Sintases

Fig. 8 - Representação esquemática da síntese de óxido nítrico (NO).

A oxidação do aminoácido L-arginina leva à formação de L-citrulina e NO. A reação do excesso de óxido nítrico com o ânion superóxido (O_2^-), produto da cadeia respiratória, leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie altamente reativa. O produto da reação do peroxinitrito com as proteínas gera nitrotirosina. Dentro dos componentes antioxidantes enzimáticos, a superóxido desmutase (SOD) desempenha um papel importante, catalizando a conversão do excesso de ânions superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, protegendo assim, a célula, contra os efeitos tóxicos do metabolismo do oxigênio. (extraído de www.upstate.com)

2.JUSTIFICATIVA

Estudos sobre falência hepática fulminante têm sido realizados por pesquisadores em diferentes países, todavia, uma identificação mais conclusiva, descrevendo os mecanismos imunopatológicos ou características etiológicas específicas que poderiam levar a uma doença hepática auto-limitada ou à sua forma grave ainda faz-se necessária, visto que os resultados obtidos ainda não são totalmente esclarecedores. Embora a incidência de casos fulminantes de hepatite seja baixa, suas conseqüências são graves, observando-se uma alta taxa de mortalidade, sendo cerca de 80% em indivíduos que não são submetidos ao transplante hepático. Devem-se considerar além disso, os gastos com as medidas de suporte clínico, e que o transplante hepático, representa um procedimento de alta complexidade, tendo um alto custo anual para o sistema de saúde brasileiro (cerca de US\$ 22.000 de acordo com a Portaria GM nº 92 e Portaria GM nº 1.117, ambas de 2001).

No Brasil, embora se tenha conhecimento de casos fulminantes de hepatite ocorrendo anualmente, poucos dados estão disponíveis sobre sua incidência. Além disso, a escassez de publicações a respeito do tema em nossas pesquisas, demonstra que pouco interesse tem sido dado no conhecimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença. Portanto, a descrição de novos biomarcadores, assim como dos mecanismos imunológicos específicos e fatores de risco envolvidos na FHF são medidas que podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle, como no campo da imunofarmacologia, com a implementação de novas terapêuticas e também na definição do prognóstico desta grave doença.

2.1-Objetivos gerais:

- Identificar os aspectos imunopatológicos da falência hepática fulminante, analisando comparativamente os níveis de expressão de marcadores de inflamação no sangue e no tecido, com as amostras dos controles, buscando descrever os principais mecanismos de determinam o quadro fulminante de hepatite.

2.2-Objetivos específicos:

- Detectar por imunofluorescência o padrão de citocinas teciduais, fenótipos celulares e marcadores de estresse oxidativo, seguida de avaliação quantitativa, utilizando amostras de fígado de pacientes com falência hepática fulminante, casos de hepatite crônica e fígados controle;
- Detectar por tecnologia multiplex de micro-esferas fluorescentes (Luminex™) níveis plasmáticos de citocinas nos períodos pré e pós-transplante e amostras de controles saudáveis;
- Detectar por citometria de fluxo, marcadores de ativação e moléculas de adesão em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), comparando as médias percentuais de expressão nos períodos pré e pós-transplante e amostras de controles saudáveis;
- Relacionar o nível de expressão de antígenos plasmáticos e teciduais nas formas fulminantes de hepatite aos parâmetros clínicos e bioquímicos característicos da disfunção hepática, buscando detectar os marcadores de maior gravidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP- FIOCRUZ)

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (protocolo 222/03) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRJ (protocolo 216/03). Na época em que o projeto foi submetido aos referidos comitês de ética, ainda não havia comitê de ética no Hospital Geral de Bonsucesso, desta forma, o projeto foi submetido à apreciação do diretor deste hospital, que assinou termo de responsabilidade, concordando que a Instituição participasse da pesquisa (anexo1).

3.2-Inclusão dos Indivíduos na Pesquisa pelo Termo de Consentimento

A inclusão dos indivíduos no estudo foi feita após o enquadramento dos seguintes grupos: controles, hepatite aguda grave e hepatite fulminante. Nos casos prospectivos, os indivíduos foram recrutados durante os primeiros 36 meses da pesquisa, sendo convidados por meio de um termo de consentimento, autorizando o emprego do material biológico (Anexo 2). Nos casos fulminantes de hepatite, devido à alteração no quadro neurológico e demais alterações clínicas, que impossibilitaram a assinatura termo de consentimento pelo próprio paciente, foram fornecidas as devidas informações ao seu responsável direto, ao qual foi entregue o termo de consentimento. Os casos progressivos de FHF ocorreram entre os anos de 2000 e 2004, sendo incluídos após a aprovação pelos referidos Comitês de Ética em Pesquisa. Os critérios de exclusão foram tempo de evolução (com base nos critérios de O' Grady et al, 1993), presença de marcadores de cronicidade (nos casos de etiologia viral) e evidência histológica de doença hepática crônica.

3.3-Instituições envolvidas

❖ Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

- Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico - IOCLaboratório de Imunologia Viral - IOC
- Laboratório de Imagem - IOC

❖ Hospital Geral de Bonsucesso - MS

- Serviço de Transplante Hepático
- Serviço de Anatomia Patológica

❖ Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ

- Serviço de Anatomia Patológica

3.4-Obtenção das amostras biológicas de casos progressos

Nos serviços de anatomia patológica dos 2 hospitais envolvidos no estudo, foram selecionados casos progressos de hepatite fulminante. Foram obtidas amostras de tecido hepático estocadas em blocos de parafina. Ao todo, foram incluídas 17 amostras de fígado em parafina.

3.5- Obtenção das amostras biológicas no estudo prospectivo

Todas as amostras foram coletadas entre 2004 e 2006. A seleção foi feita a partir do acompanhamento de novos casos clínicos de hepatite aguda com evolução fulminante, ou mesmo casos de hepatite aguda grave, independente do agente causal envolvido. Foram incluídos 16 de pacientes com falência hepática fulminante (FHF), sendo então coletadas amostras de sangue de todos eles. Como nem todos os pacientes com FHF foram transplantados, foram coletadas 14 amostras de fígado daqueles que foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Foram também incluídos 4 casos de pacientes com hepatite aguda grave, dos quais foram coletadas apenas amostras de sangue, já que estes não tinham critérios para o transplante hepático por apresentarem quadro clínico de menor gravidade e, portanto, não indicativo para o

procedimento (Classificação de acordo com os critérios de O'Grady do King's College – adotada pela portaria 541/02- MS).

As amostras de fígado foram coletadas durante os procedimentos de transplante. Imediatamente após a retirada do explante hepático (ainda dentro do centro cirúrgico), foram feitos cortes de aproximadamente 5 cm do tecido, os quais foram colocados em criotubos e estocados em gelo seco para que pudessem ser transportadas até o laboratório. Parte dos cortes foi colocada em criotubos contendo paraformaldeído 10%. Logo após, as amostras de fígado mantidas no gelo seco, foram estocadas em nitrogênio líquido. As amostras fixadas em paraformaldeído 10% foram posteriormente incluídas em parafina.

3.6- Amostras de fígado de doadores saudáveis

Amostras de fígado de 5 doadores saudáveis foram obtidas de indivíduos submetidos ao transplante hepático na modalidade de transplante intervivos, os quais doaram parte do fígado para pacientes portadores de hepatite crônica com falência hepática terminal. Durante o procedimento de transplante, um pequeno fragmento do tecido foi cortado da região do lobo hepático que estava sendo retirado para a doação, sendo esta retirada realizada antes da fase de isquemia. Foi mantido o mesmo procedimento de estocagem utilizado para as amostras de fígado do pacientes.

3.7- Amostras de fígado de Casos de Hepatite Crônica

Amostras de fígado de 6 pacientes infectados cronicamente pelo vírus da hepatite C, também foram utilizadas para estudo comparativo. Estas amostras, coletadas por meio de biópsias com agulha, faziam parte de um outro estudo utilizado por nosso grupo e estavam estocadas em blocos de parafina.

3.8- Preparo dos cortes histológicos

Foram feitos cortes de 3 a 5 μm , utilizando micrótomo convencional para blocos parafinados, ou criostato, para as amostras de fígado congeladas. Para análise de marcadores de fenótipos celulares no tecido hepático, os cortes foram fixados em paraformaldeído 2%. Para a obtenção de citocinas e outros mediadores inflamatórios presentes no fígado, os cortes foram fixados em acetona a 4 ° C.

3.9-Preparo das amostras de sangue

Logo após a coleta do sangue, foi feita a separação do plasma por centrifugação, que foi congelado à – 70° C. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas utilizando gradiente de Ficoll- Histopaque (Sigma Chemical Co-EUA). Posteriormente, aproximadamente 1×10^7 PBMCs/mL viáveis (após exclusão por contagem em azul de Trypan 2%) foram congeladas em DMSO 10% em soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen-EUA) e inicialmente estocadas à – 70° C por 24 horas em câmara de congelamento e, logo após, transferidas para o nitrogênio líquido até o uso.

3.10-Obtenção dos dados clínicos e bioquímicos

Paralelamente à coleta das amostras biológicas, foram coletados dados junto ao histórico médico do paciente que ajudaram a esclarecer a etiologia, assim como resultados de provas bioquímicas de função hepática. Os dados coletados dos prontuários dos pacientes foram valores de transaminases (ALT e AST), bilirrubina, gama-Glutamiltransferase (γ GT), fosfatase alcalina, tempo de atividade da protrombina (TAP), INR (*International Normalized Ratio*), valores percentuais e absolutos de leucócitos, além do grau de encefalopatia, e demais dados clínicos dos períodos pré e pós-transplante.

3.11-Determinação dos casos de hepatite aguda de etiologia viral

Para confirmação do diagnóstico nos casos de etiologia viral, amostras de soro foram submetidas a pesquisa de marcadores específicos de hepatite aguda por teste de ELISA. Foram pesquisados anti-HAV IgM (Abbot, USA), anti-HBC IgM (Bio Kit, Spain), HBsAg (Dia Sorin, Italian) e anti-HCV (Dia Sorin Italian).

3.12- Caracterização histológica da hepatite fulminante

As amostras de tecido hepático parafinado foram analisadas histologicamente pelo microscópio óptico, visando à identificação de alterações morfológicas compatíveis com o quadro falência hepática fulminante. A análise foi feita utilizando-se lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) e Giemsa. Esse tipo de análise foi feita pelo grupo de patologistas, colaboradores da pesquisa.

3.13- Imunofluorescência para detecção de citoninas e iNOS

Caracterização por imunofluorescência de marcadores de fenótipos celulares e citocinas do infiltrado inflamatório.

Etapas da marcação por imunofluorescência em cortes histológicos do fígado em blocos de parafina:

- ❖ Desparafinização em xilol (*overnight*), seguida de nova etapa de etapa de desparafinização em xilol aquecido (65°C por 20 min);
- ❖ Re-hidratação dos cortes em diferentes concentrações de álcool por 1 min.cada (100%/ 75%/ 50%) e água destilada;
- ❖ Recuperação antigênica em forno de microondas à temperatura de 92°C por 10 minutos, em presença de tampão citrato (na concentração 0,1 M (pH 6,0));
- ❖ Digestão enzimática com tripsina diluída (50 µ l por lâmina até cobrir os cortes); Deixado por 1 min. à temperatura ambiente. Depois disso, as lâminas foram lavadas em água destilada ou PBS 1X;
- ❖ 1º Bloqueio (soro normal de cabra) – 1: 200 em PBS - Incubar por 1 h em câmara úmida à 37°C - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ 2º Bloqueio (Solução de bloqueio) – Incubar por 1 h em câmara úmida à 37° - lavagem em PBS 1X ;

- ❖ Incubação com anticorpo primário diluído em PBS (diluição de acordo com o fabricante) – overnight à 4° C - lavagem em PBS 1X;
- ❖ Incubação com anticorpo secundário diluído em PBS (diluição de acordo com o fabricante) – 1: 30 min. em câmara úmida - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ Os cortes foram contracolorados com azul de Evans 1:20.000 em PBS por 1 minuto e montados em SlowFade AntiFade Kit (Invitrogen®);

Etapas da marcação por imunofluorescência em cortes de fígados congelados:

- ❖ 1º Bloqueio (soro normal de cabra) – 1: 200 em PBS - Incubar por 1 h em câmara úmida à 37°C - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ 2º Bloqueio (Solução de bloqueio) – Incubar por 1 h em câmara úmida à 37° - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ Coloração com *chromotrope 2R*
- ❖ 1º Bloqueio (soro normal de cabra) – 1: 200 em PBS - Incubar por 1 h em câmara úmida à 37°C - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ 2º Bloqueio (Solução de bloqueio) – Incubar por 1 h em câmara úmida à 37° - lavagem em PBS 1X ;
- ❖ Os cortes foram contracolorados com azul de Evans 1:20.000 por 1 minuto e montados em SlowFade AntiFade Kit (Invitrogen®);

As lâminas imunomarcadas foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss), empregando-se laser de diferentes comprimentos de onda, Ar488 e filtro BP505-550nm.

ANTICORPOS:

- Primários marcados: anti-iNOS-FITC (BD – transduction);
- Primários não marcados: anti-CD68 (Dako); anti-nitrotirosina (Alpha diagnostic, US), anti-Bcl-x (Novocastra, UK.), anti-Hbs (*in house*);
- Secundários: Alexa 488 (*chicken anti-mouse* - molecular probes), Alexa 647 (*chicken anti-mouse* - molecular probes) e Alexa 647 (*rabbit anti-mouse* - molecular probes).

4-RESULTADOS

4.1- Resultados Gerais

4.1.1-. Caracterização dos casos de Hepatite Fulminante e Hepatite Aguda Grave incluídos no estudo entre 2000 e 2006

A tabela 2 mostra os dados gerais, dados clínicos e bioquímicos dos pacientes envolvidos no estudo, incluindo os casos progressivos e prospectivos. Foram ao todo 37 pacientes incluídos (33 com FHF e 4 com hepatite aguda grave). Os casos de falência hepática fulminante foram associados a diferentes etiologias: 2 ao HAV, 5 ao HBV, 10 a medicamentos, 3 a auto-imunidade, 1 a distúrbios metabólicos (doença de Wilson) e 12 de etiologia desconhecida (criptogênica). Dentre os casos de hepatite aguda grave, 1 foi associado ao HAV, 1 a co-infecção HAV/HBV, 1 a autoimunidade e 1 a medicamento (paracetamol). Dos pacientes com FHF, 3 apresentaram grau de encefalopatia I, 9 grau II, 6 grau III e 15 apresentaram encefalopatia grau IV.

A figura 9 representa a evolução dos parâmetros bioquímicos de pacientes com FHF nos períodos pré/pós-transplante. Classicamente, pode-se observar uma significativa elevação das transaminases (ALT e AST) acima de 1500 U/L e aumento do TAP (< 40%). No caso representado, o valor percentual do TAP foi inferior a 10 %. Níveis de fosfatase alcalina e bilirrubina total também foram bastante elevados. Após o transplante, observou-se uma significativa redução nos níveis dessas enzimas, além da redução do TAP (>50%).

A figura 10 representa o aspecto macroscópico dos explantes hepáticos de pacientes envolvidos no estudo. Em alguns casos, provavelmente devido ao maior tempo de evolução da doença, podem ser observados nódulos sugerindo regeneração hepática (A), áreas de extensa isquemia podem ser observadas em B e C. Extensiva necrose pode ser observada em A, B, C e D.

4.1.2- Expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em amostras de fígado de pacientes com FHF

Na análise por imunofluorescência da presença da iNOS em cortes de fígado, pode-se observar uma forte expressão da enzima no tecido hepático de pacientes com FHF, não observada nas amostras de fígado controle. A detecção da expressão da iNOS, ocorreu em amostras de fígado de pacientes com FHF de diferentes etiologias, dentre elas vírus da hepatite B (HBV), autoimunidade e medicamentos (Fig. 11-13).

Em amostras de fígado de pacientes com FHF pelo HBV, pode ser observada uma expressão mais intensa de iNOS, em áreas de necrose e em algumas células do infiltrado inflamatório hepático, juntamente com a detecção do antígeno de superfície do vírus (HBsAg) (Fig. 11 B, C e D). Nas amostras de fígado de casos de FHF induzidos por autoimunidade (Fig. 12 B) e pelo vírus da hepatite A (Fig. 12 C), a presença da enzima foi detectada em hepatócitos (Fig. 12 B) e em áreas de necrose parenquimal (Fig. 12 C). Pode-se também observar a presença da iNOS, em amostras de fígado de pacientes com FHF induzida por medicamentos juntamente com a presença de eosinófilos no tecido hepático, nestes casos, utilizando-se coloração com cromotrope 2R (Fig. 13 C e D). Nas amostras de fígado controle, não foi detectada a presença de marcação para iNOS (Fig. 11 A, 12 A e 13 A e B), confirmando que a expressão de iNOS é indutível e só aparece durante estados patológicos.

4.1.3- Elevado número de células CD68⁺ presentes no infiltrado inflamatório hepático juntamente com a expressão da iNOS nas amostras de fígado de pacientes com FHF

Em amostras de fígado de pacientes com FHF de diferentes etiologias, também foi possível observar um grande número de células CD68⁺ em comparação com as amostras de fígado controle (Fig. 14 A e D). Esse elevado número de células CD68 positivas, foi acompanhado da detecção de iNOS (Fig. 14 B, C, E e F).

4.1.4. - Marcadores de estresse nitrosativo na FHF

A presença de nitrotirosina em áreas de necrose parenquimal pode ser observada nas amostras de fígado de pacientes com FHF (Fig. 15 B e C), que não foi detectada em amostras de fígado controle (Fig. 15A)

4.1.5. - Presença da proteína anti-apoptótica (Bclx) em amostras de fígado de pacientes com FHF

A presença de Bcl-x foi observada em áreas de necrose parenquimal nas amostras de fígado de pacientes com FHF (Fig. 16 B e C), que não foi detectada em amostras de fígado controle (Fig. 16 A). A presença da Bcl-x também foi detectada em co-marcação com a enzima iNOS (Fig 16 C).

Tabela - 2. Casos de Hepatite Fulminante e Hepatite Aguda Grave incluídos no estudo entre 2000 e 2006

Caso	Idade	Sexo	Etiologia	Clínica	EH (Grau)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TAP (%)	BT (mg/dL)	Evolução
1	3	F	HAV	HF	IV	1709	2638	50	17.6	Óbito
2	5	F	HAV	HF	IV	326	331	9	17	Alta pós Tx.
3	23	F	HAV	HAG	NO	16	93	36	37.9	Óbito
4	59	F	HBV	HF	II	2855	2140	87.4	20.71	Alta pós Tx
5	26	M	HBV	HF	III	631	1291	30.7	22.6	Óbito
6	24	M	HBV	HF	II	964	762	25	45	Óbito ñ Transp.
7	49	F	HBV	HF	IV	775	1003	15.3	21.4	Óbito pós Tx. por sepse
8	67	M	HBV	HF	IV	1950	338	SD	10.5	Óbito - Não Transplant.
9	49	M	Co-inf. HAV/HBV	HAG	NO	3240	2610	SD	18.4	Alta/ Sem Critérios p Tx
10	14	F	Auto-imune	HF	II	223	359	16	14	Alta pós- Tx.
11	51	F	Auto-imune	HAG	NO	593	839	56	39.9	Alta / S. critérios p. Tx.
12	42	F	Auto-imune	HF	III	205	290	20.3	40.6	Alta pós- Tx.
13	14	F	Auto-imune	HF	III	1393	1773	SD	28.8	Óbito pós Tx. por sepse
14	22	F	D. de Wilson	HF	II	381	567	25	18.4	Alta pós-Tx.
15	6	M	Fenobarbital	HF	IV	292	357	9	17.8	Alta pós Tx
16	48	F	∞ Metildopa	HF	IV	572	3038	49	16.8	Óbito pós Tx.
17	18	M	Cloreto de Etila	HF	IV	736	329	5	21.7	Alta pós Tx
18	11	F	RMP/ IZN	HF	I	1842	1662	23	26.9	Alta pós Tx.
19	26	F	Propiltiouracil	HF	IV	401	419	26	17.7	Óbito pós-Tx.
20	46	F	Metilmetacrilato	HF	I	1135	1181	15.4	36.8	Alta pós Tx
21	27	F	RMP	HF	IV	2667	9255	4.8	3.5	Óbito durante o Tx.
22	44	F	Kava-Kava	HF	I	1087	879	19	24.0	Alta pós Tx.
23	38	F	∞ Metildopa	HF	IV	948	1108	12	20.3	Alta pós Tx
24	47	F	Paracetamol	HAG	NO	774	554	23	23.7	Alta / S. critérios p. Tx.
25	41	F	Fluoxetina	HF	II	2742	6886	8	15.2	Óbito pós-Tx por Sepse
26	44	F	Criptogênica	HF	II	117	120	37	9,3	Alta pós- Tx.
27	26	M	Criptogênica	HF	IV	810	458	20	40	Óbito
28	12	F	Criptogênica	HF	IV	986	2448	11	18.1	Óbito pós Tx.
29	19	M	Criptogênica	HF	IV	1308	581	4.5	33	Óbito durante Tx.
30	26	F	Criptogênica	HF	IV	662	662	3	25.5	Óbito pós- Tx.
31	24	M	Criptogênica	HF	III	364	93	8	66.5	Óbito
32	32	F	Criptogênica	HF	IV	1033	642	19	43.7	Óbito sem Tx.
33	20	F	Criptogênica	HF	II	314	562	40	29.7	Alta pós-Tx.
34	52	F	Criptogênica	HF	III	283	410	11	21.1	Alta pós- Tx.
35	9	F	Criptogênica	HF	II	1806	1490	10	SD	Óbito pós-Tx.
36	6	F	Criptogênica	HF	III	880	1452	23	22.2	Alta pós-Tx.
37	20	F	Criptogênica	HF	II	122	412	6	63	Óbito pós Tx.

EH: Encefalopatia Hepática; ALT: Alalina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; BT: Bilirrubina Total; TAP: Tempo de Atividade da Protrombina; HF: Hepatite Fulminante; HAG: Hepatite Aguda Grave; Tx: Transplante hepático; RMP: Rifampicina; IZN: Isoniazida; NO: Não observada; SD: Sem dados.

Valores de referência: { ALT: 30-65 U/L
AST: 15-37 U/L
BT: 0.1-1.0 mg/dL
TAP: 10.5 a 14.3 seg. de 70 a 100%

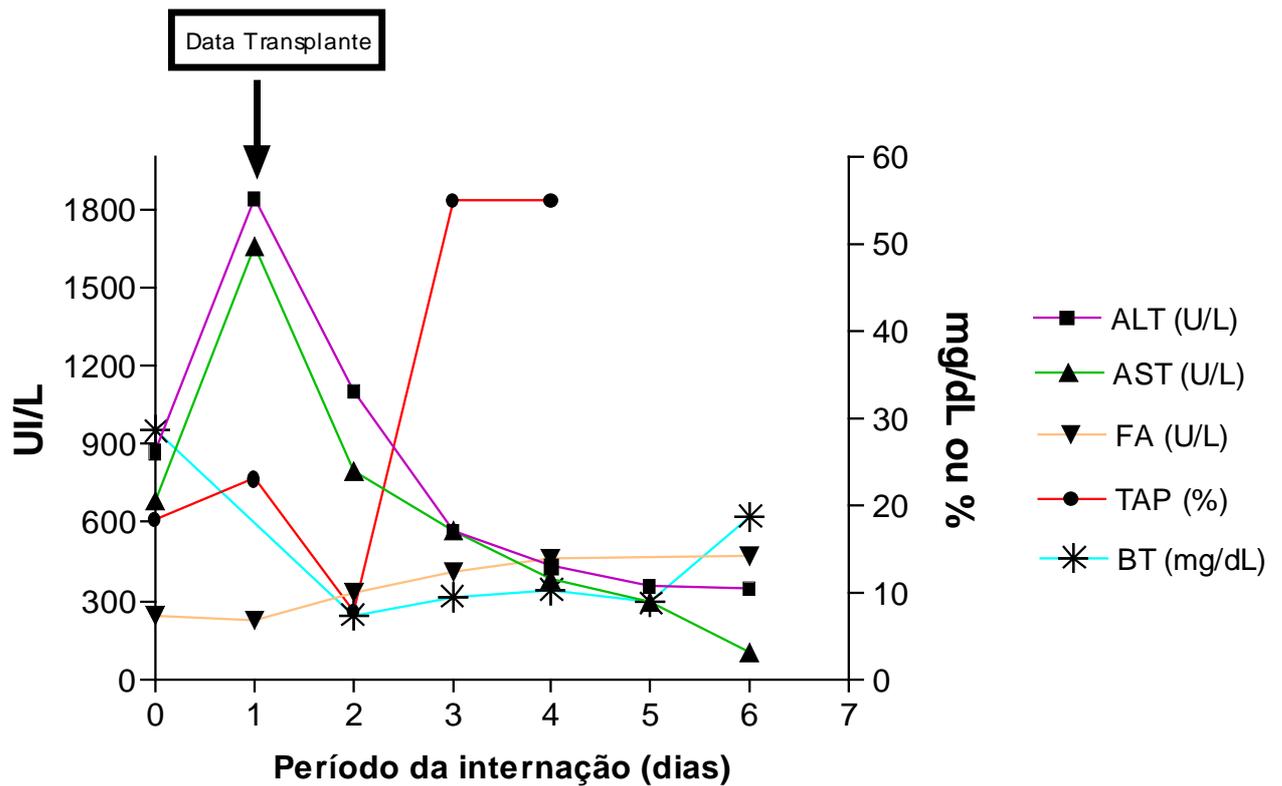


Fig. 9- Gráfico representativo da evolução dos parâmetros bioquímicos de um paciente com FHF pré/pós transplante. Elevação expressiva das transaminases (ALT, AST) > 1000 U/L e aumento do Tempo de Atividade da Protrombina (TAP) < 40%, são alterações características desta síndrome. Após transplante hepático, pode-se observar a normalização dos níveis de transaminases e do TAP.

4.2-Manuscrito 1

Eosinophils Involved in Fulminant Hepatic Failure Are Associated with High IL-6
Expression and Absence of IL-5 in Liver and Peripheral Blood

4.3-Manuscrito 2

Activated Lymphocytes and High IFN- γ , IL-8, IL-10 AND MCP-1 Levels are Associated with Fulminant Hepatic Failure in Human Patients

5-DISSCUSSÃO

Poucas síndromes clínicas são tão dramáticas quanto a falência hepática fulminante, sendo que a iminência de uma falência total do fígado ainda se torna mais crítica pelas dificuldades encontradas na captação de um órgão compatível, o que eleva as taxas de mortalidade para 80% dos casos, as quais são associadas principalmente com a falência múltipla dos órgãos (O'Grady *et al*, 1989).

A dificuldade de se conseguir amostras clínicas, já que a síndrome é de ocorrência rara, fez com que se aumentasse a procura por modelos experimentais de hepatite fulminante que melhor representassem a forma humana da doença, o que culminou em vários achados imunopatológicos utilizando tais modelos (Newsome *et al*, 2000, Chang *et al*, 2003), contudo, estes apresentam limitações. Diante das dificuldades de obtenção de um número estatisticamente adequado de amostras, consideramos justificado o trabalho com amostras clínicas heterogêneas, sem considerar os diferentes agentes causais. Com base nos estudos anteriores, que sugeriram o envolvimento de diferentes mecanismos de lesão mediados por imunidade inata e adaptativa, o processo inflamatório que leva à FHF envolve uma complexa trama que converge para algumas poucas vias comuns de destruição do parênquima hepático, entre eles destacam-se por exemplo citocinas inflamatórias como IFN- γ (Leifeld *et al*, 2002). Com os resultados obtidos em nosso estudo, podemos sugerir que os mecanismos inatos de imunidade são os principais envolvidos na lesão hepática dando início ao quadro de FHF, enquanto que a resposta imunológica adaptativa desempenha um papel complementar.

5.1- Papel da óxido nítrico sintase e das células de Kupffer na FHF

Muito tem sido discutido sobre o papel do óxido nítrico em processos, tanto fisiológicos, quanto fisiopatológicos. No sistema imunológico, altas concentrações de NO são descritas por induzir apoptose como resultado da formação de peroxinitrito (ONOO⁻) (Brown & Borutaite, 2002).

No presente estudo foi observada uma marcante presença da enzima iNOS, tanto em amostras de fígado emblocadas em parafina, quanto em amostras congeladas, bem como a fraca ou ausente presença nas amostras de fígado controle, sugerindo sua contribuição no processo inflamatório na FHF. Apesar de seu papel protetor ter sido sugerido, este estaria relacionado à produção de baixas quantidades

de óxido nítrico, enquanto que diversos estudos, apontaram a enzima iNOS desempenhando importantes funções na inflamação em diversas doenças hepáticas (Bourdi *et al*, 2002, Leifeld *et al*, 2002). Em nosso estudo, foi observada a presença de iNOS em amostras de fígado de pacientes com diferentes etiologias, onde o estresse oxidativo pôde estar envolvido no processo de lesão hepática, tanto em casos de FHF induzidos por medicamentos, quanto por infecções virais e autoimunidade.

O papel da iNOS na lesão histológica do fígado foi demonstrado anteriormente por nosso grupo, trabalho que envolveu a infecção experimental com o vírus da hepatite A, em modelo de primata não humano, onde se relacionou a expressão da enzima no citoplasma de células de Kupffer com a lesão hepática decorrente de hepatite aguda (Pinto *et al*, 2000). No entanto, neste estudo prévio, a expressão da enzima foi levemente detectada. No presente estudo, observamos uma forte expressão da enzima nos fígados acometidos, sugerindo a existência de uma relação direta entre a alta expressão de iNOS com a extensão da lesão. Nossos resultados concordam com estudos anteriores, os quais comparam casos de FHF, hepatite crônica e controles, concluindo que existe uma significativa elevação da expressão intra-hepática da enzima iNOS em casos de FHF quando comparado às outras formas de hepatite (Leifeld *et al*, 2002). Isto reforça a hipótese de que baixos níveis de iNOS desempenhem também um papel hepatoprotetor, enquanto que níveis mais altos são envolvidos com a lesão. Esta expressão diferenciada da enzima pode ser o ponto que distingue a fisiopatologia das outras formas de apresentação da doença.

Uma das conseqüências do estresse oxidativo nos tecidos necróticos é a nitração de resíduos de tirosina. A formação de nitrotirosina é mediada pelo peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio formada à partir da reação rápida do óxido nítrico com o ânion superóxido (O_2^-), e sendo assim, é um dos marcadores mais usados para medir a extensão na lesão tecidual causada pelo NO (Hinson *et al*, 2004). A presença de nitrotirosina já foi associada a elevados níveis plasmáticos do RNA do vírus da hepatite C e com a extensão da lesão hepática em diversas outras doenças do fígado, como a esteatohepatite não alcóolica, a lesão medicamentosa por acetaminofeno e a resposta autoimune induzida por tricloroetano (Mihm *et al*, 1997, Hinson *et al*, 1998, Kojima *et al*, 2007, Wang *et al*, 2007). Em concordância com estes estudos, observamos a presença de nitrotirosina em diversos tipos celulares presentes no fígado dos pacientes, enfatizando o papel do estresse oxidativo na falência hepática

fulminante. A identificação de células apoptóticas em cortes congelados de fígado foi tentada pela técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTPnick-end labeling*), contudo a grande quantidade de marcações inespecíficas decorrentes da presença de grandes áreas de necrose e exudato, limitou a identificação da marcação específica.

Em nosso estudo, observamos a presença de marcação para a proteína anti-apoptótica Bcl-x, que se encontrava na maioria dos campos co-localizada com a enzima iNOS, indicando uma tentativa de compensação ao dano hepático. Resultados semelhantes foram observados em modelo de choque endotóxico seguido de hepatectomia em ratos, mostrando que, após tratamento com fibronectina, havia inibição da ativação de NF- κ B, com conseqüente redução da expressão de iNOS e aumento da expressão de Bcl-x no tecido, prevenindo a lesão hepática no choque endotóxico. (Kwon *et al*, 2007).

No fígado, além dos hepatócitos e das células estreladas, sabe-se que as células de Kupffer são hábeis em expressar altos níveis de iNOS após estímulo apropriado, com padrões moleculares associados a microorganismos (como por exemplo o LPS) e citocinas (como TNF- α e IL-1 β) (Muriel, 2000). Nossos resultados demonstraram uma co-localização da expressão de iNOS com as células CD68⁺, indicando a ativação destas células e sua participação no processo de lesão. Takagi e colaboradores demonstraram que durante a endotoxemia em ratos, as células de Kupffer são as primeiras a expressarem iNOS, duas horas após a injeção de LPS, e que o processo então se espalha para os hepatócitos. (Takagi *et al*, 2007). A expressão de iNOS pelas células de Kupffer também já foi demonstrada em outro estudo envolvendo pacientes com FHF e doenças hepáticas crônicas (Leifeld *et al*, 2002). Além da iNOS, as células de Kupffer ativadas são capazes de produzir uma enorme gama de mediadores, dentre eles a quimiocina MIP-1 α (Ma *et al*, 2006) e as citocinas IL-18 e IL-12 (Tsutsui *et al*, 2003). No presente estudo, fomos capazes de demonstrar no plasma de pacientes com FHF, elevados níveis de MIP-1 α e MCP-1. A secreção destas quimiocinas no plasma e no tecido já foi demonstrada em modelos de lesão hepática induzida por Con A, e na lesão hepática por isquemia/reperfusão, tendo sido sugeridas células de Kupffer como principais produtoras (Leifeld *et al*, 2003, Okamoto *et al*, 2005, Ma *et al*, 2006). Estas quimiocinas poderiam ser as responsáveis pela

quimiotaxia de algumas células da imunidade inata como os eosinófilos e as células NK (Crispe, 2003), como demonstrado pela presença destas células nos infiltrados inflamatórios estudados em nosso trabalho. Funcionalmente, estas células possuem um papel importante determinação da lesão, o que será discutido mais adiante. Por outro lado, as citocinas IL-12 e IL-18 classicamente conhecidas por serem as maiores indutoras das respostas Th1, poderiam estar também envolvidas na ativação de células NK, NKT e linfócitos T que migram para o tecido hepático, como já foi demonstrado nas hepatites por malária, induzida por Con A e pela *Pseudomonas aeruginosa*, dentre outras (Seki *et al*, 2000, Tsutsui *et al*, 2003, Muhlen *et al*, 2004).

Estudos anteriores demonstraram experimentalmente que as células de Kupffer também são as maiores produtoras de IL-10 durante a peritonite séptica, diminuindo a produção de IL-12 e IFN- γ , e aumentando a susceptibilidade à septicemia (Emmanuilidis *et al*, 2001). Cabe ressaltar que na lesão hepática induzida por acetaminofeno, camundongos *knockout* (KO) para IL-10 morriam de falência hepática, sendo o aumento da susceptibilidade à lesão relacionado com a elevada produção de iNOS na ausência de IL-10 (Bourdi *et al*, 2002). No entanto, encontramos níveis plasmáticos elevados de IL-10 nos pacientes envolvidos no presente estudo, sendo estes níveis também significativamente maiores naqueles que evoluíram para o óbito. Isto sugere que na falência hepática humana, exista uma forte tentativa de regulação da resposta inflamatória, que no entanto, devido ao significativo grau de necroinflamação, esta esteja fortemente desequilibrada, o que reforça a hipótese do papel citotóxico exercido pelas células de Kupffer, granulócitos e células NK. Em estudos anteriores de FHF humana, níveis elevados de IL-10, associados com o pior prognóstico também foram detectados (Nagaki *et al*, 2000). Em outras doenças como no dengue, a gravidade também foi associada com altos níveis de IL-10, juntamente com IFN- γ e TNF- α (Azeredo *et al*, 2001).

A participação de granulócitos no processo necroinflamatório é reforçada pelos elevados níveis plasmáticos da IL-8 (quimiocina fortemente quimiotóxica para granulócitos). Neste trabalho, sua presença foi significativamente elevada no plasma de pacientes com FHF que também evoluíram para o óbito. Outros estudos também relacionam níveis aumentados de IL-8 com reduzida sobrevivência e disfunção hepática (Tilg *et al*, 1992, Hill *et al*, 1993, Sheron *et al*, 1993, Huang *et al*, 1996, Shimoda *et al*,

1998). Além disso, aqui também pudemos associar a alta expressão de iNOS à presença de granulócitos, os quais têm sido descritos por migrarem para o tecido hepático, sendo importantes fontes de espécies reativas de oxigênio, atuando marcadamente na lesão hepática por isquemia-reperfusão (Montalvo-Jave *et al*, 2007). Assim, podemos considerar que exista um comportamento sinérgico entre tipos diferentes de células inflamatórias na lesão hepática da FHF.

5.2- Papel de eosinófilos na falência hepática fulminante

O sistema imunológico inato desempenha um papel crucial na inflamação hepática, tanto aguda quanto crônica (Szabo *et al*, 2007). Em nosso estudo, a inesperada eosinofilia e o aumento da contagem destas células no infiltrado inflamatório hepático, quando comparado às amostras de fígado de pacientes com hepatite C crônica e fígado de doadores saudáveis, sugerem um envolvimento atípico deste granulócito na resposta necro-inflamatória hepática. Apesar de diversos estudos já considerarem que eosinófilos não estão apenas envolvidos em processos alérgicos e infecções parasitárias, mas também como importantes células efetoras em diversos processos inflamatórios como na rejeição de enxertos (Nagral *et al*, 2001) e doenças gastrointestinais (Keshavarzian *et al*, 1985). Muito pouco se conhece sobre o papel desta célula na lesão hepática. A primeira descrição de necrose hepática com presença de eosinófilos foi em um surto de hepatite pelo vírus delta (HDV) na Venezuela (hepatite da Serra de Nevada da Santa Marta). Necrose eosinofílica semelhante, foi também encontrada na disfunção aguda do fígado por carbamazepina e à terapia com sertralina e donepezil (Ljunggren *et al*, 1985, Buitrago *et al*, 1986, Robbie *et al*, 1988, Verrico *et al*, 2000).

Em nosso estudo, a observação de que a maioria dos indivíduos com falência hepática fulminante apresentava um aumento significativo do número absoluto de eosinófilos no sangue periférico ($>350 \text{ cel/mm}^3$) (12/16–75%), acompanhado de infiltrados eosinofílicos hepáticos, reforça a hipótese do envolvimento de eosinófilos no processo inflamatório da falência hepática fulminante. De modo surpreendente, a análise morfológica (*Forward Scatter Vs Side Scatter*) nos *contour plots* de citometria de fluxo, sinaliza para uma típica população de granulócitos, não esperado em análise de PBMC. Este fato pode ser explicado pela marcante presença destes

polimorfonucleares, principalmente eosinófilos, no sangue periférico dos pacientes incluídos neste estudo. A evidência de colocalização entre IL-6/eosinófilos em áreas necróticas do parênquima sugere a participação desta citocina na lesão hepática. Nossos resultados sugerem ainda que eosinófilos infiltrados no fígado atuem por meio de estocagem e rápida liberação da IL-6. Este mecanismo de estocagem de citocinas pelos eosinófilos já foi descrito em estudos, relacionados à asma atópica (Lacy *et al*, 1998).

Apesar da IL-6 ter sido sugerida como uma citocina hepatoprotetora via ativação de proteínas anti-apoptóticas, sendo envolvida na regeneração hepática, alguns estudos a relacionaram a processos fisiopatológicos como na fibrose do fígado (Kershenovich Stalnikowitz & Weissbrod, 2003). Os elevados níveis de IL-6 encontrados no sangue periférico dos nossos pacientes com FHF, permitem especular que este perfil de sua produção nesta síndrome, reflita uma falha no controle do processo inflamatório, induzindo uma maior destruição dos hepatócitos ao invés da regeneração. O aumento dos níveis séricos de IL-6 também foram anteriormente relacionados à inflamação do fígado com evolução fulminante e com a falência múltipla de órgãos como consequência da falência hepática (Sekiyama *et al*, 1994, Hughes *et al*, 1998, Minghini *et al*, 1998).

Em nosso estudo, apesar de encontrarmos aumento de eosinófilos, não foi possível relacionar a eosinofilia com algum tipo de etiologia observada em indivíduos com falência hepática fulminante, pois o pequeno número de pacientes envolvidos no trabalho não permitiu esta análise. Estudos anteriores observaram presença de eosinofilia apenas em pacientes com doença hepática induzida por drogas, mas não em casos de doença hepática induzida por outros agentes como vírus (Pham *et al*, 2001). Nossos resultados sugerem que eosinófilos estejam envolvidos no processo inflamatório durante a FHF por diferentes etiologias, incluindo vírus, respostas auto-imunes e em causas indeterminadas. Em outras doenças do fígado como a colangite esclerosante primária (PSC) e a cirrose biliar primária, os eosinófilos têm sido sugeridos como células efetoras no mecanismo de lesão parenquimal (Watanabe *et al*, 1995, Nagano *et al*, 1999).

Nas amostras de sangue coletadas após o transplante hepático, foi observada uma redução significativa no número de eosinófilos, fato este que reforça a participação deste tipo de célula no processo inflamatório agudo da FHF. Considerando

que os protocolos de imunossupressão, compostos de tacrolimus (FK506) 0.2 mg/kg/dia, prednisona 0.15 mg/kg/dia e uso de anticorpo monoclonal contra IL-2 (basiliximab), têm um papel específico de inibição de linfócitos T. Nestes casos, pode-se sugerir que esta redução no número de eosinófilos do sangue pós-transplante, não esteja relacionada aos protocolos de imunossupressão utilizados, mas sim à eliminação do estímulo, presentes no tecido hepático explantado. Além disso, recentemente outros autores descreveram eosinofilia com o desenvolvimento de atopias e outras doenças alérgicas como alergia alimentar e enterocolite eosinofílica durante as terapias imunossupressoras pós-transplantes com o uso do tacrolimus (Granot *et al*, 2006, Saeed *et al*, 2006). Durante nossa pesquisa, não foi observado nenhum episódio de sintomas de alergia após o transplante de fígado nos casos estudados. Este fato comprova que, se realmente existe uma tendência a manifestações alérgicas com a participação de eosinófilos pelo uso destes imunossupressores, não houve influencia no aparecimento destas manifestações no período pós-transplante nesses pacientes. Estas observações reforçam a hipótese de que o fígado de pacientes com FHF exerceria uma intensa participação na ativação de eosinófilos com repercussão sistêmica, e que após a retirada do órgão, o estímulo deixaria de ocorrer.

Poderia-se especular que os baixos níveis de IL-5 no plasma caracterizariam o fim de uma cinética de expressão desta citocina, sendo que no momento da falência do órgão, seus níveis plasmáticos já estariam reduzidos, fato pouco provável por se tratar de uma doença hiperaguda. Por outro lado, também pode ser sugerido que o recrutamento destes granulócitos para o foco inflamatório tenha ocorrido por uma via independente da IL-5, provavelmente com a participação de MIP-1 α , considerando-se que níveis significativamente aumentados desta quimiocina foram encontrados no período pré-transplante. Como já citado, níveis aumentados desta quimiocina são bem descritos em modelos experimentais de lesão hepática (Okamoto *et al*, 2005, Ma *et al*, 2006). Contudo, níveis elevados de MIP-1 α presentes simultaneamente com eosinófilos no fígado, foram descritos apenas em modelo murino de resposta a antígeno de *Schistosoma* (El-Ahwany *et al*, 2000). Esta associação também foi descrita em modelos experimentais de infecção pulmonar por paramixovírus, onde a eosinofilia pulmonar ocorreu sem que a IL-5 fosse detectada. Ainda nestes estudos, a resposta eosinofílica também ocorreu sem alteração da expressão de eotaxina e RANTES. (Domachowske

et al, 2000, Domachowske *et al*, 2000). No presente estudo, não foi possível estudar a presença da eotaxina no plasma ou no fígado dos pacientes.

A fraca expressão de IL-5 no parênquima hepático, não co-localizada com eosinófilos também sugere que a ativação autócrina dos eosinófilos, mediada por essa citocina, não tenha papel na FHF. Em reforço às nossas observações, outro estudo em humanos detectou aumento do número de eosinófilos infiltrados no fígado em hepatite induzida por drogas, com ausência de IL-5 (Pham *et al*, 2001). Assim, apesar de estudos anteriores utilizando modelos murinos, terem sugerido a participação da IL-5 na lesão hepática mediada por eosinófilos (Tsuda *et al*, 2001, Louis *et al*, 2002), nossos resultados, nos permitem formular uma hipótese alternativa para a doença humana, onde a IL-5 não desempenhe um papel importante na ativação de eosinófilos. À semelhança das especulações propostas anteriormente por Lamkhieued *et al*, em nosso modelo também haveria uma população de eosinófilos, expressando diferentes perfis de citocinas e desempenhando papéis específicos em diferentes processos inflamatórios (Lamkhieued *et al*, 1996). Ainda, o MIP-1 α teria uma função de destaque nestes mecanismos.

5.2-Papel de linfócitos na falência hepática fulminante

Células NK ativadas podem responder rapidamente a diversos estímulos e suas ações citotóxicas podem ser mediadas por diferentes mecanismos, dentre eles a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) via CD16 (Fc γ RIII)(Cooper *et al*, 2001). Após estimulação *in vitro* e *in vivo*, células NK adquirem novos marcadores de superfície não expressos em células em repouso. Estas moléculas têm um papel determinante na migração celular bem como na sua proliferação (Lima *et al*, 2002). Com base nos resultados obtidos em nosso estudo, o aumento da frequência de células NK (CD56⁺) expressando marcadores de ativação precoce (CD69⁺, CD16⁺ CD38⁺ e HLADR⁺) sugere seu envolvimento no processo de migração/inflamação e lesão do parênquima hepático na FHF. Em estudos anteriores, a presença destas moléculas como marcadores de ativação em diferentes doenças hepáticas, reforça a nossa hipótese. O receptor CD69 foi descrito como marcador de células ativadas em linhagens hematopoiéticas, podendo estar envolvido na patogênese de doenças como

na inflamação crônica do fígado (Marzio *et al*, 1999) e na lesão hepática após isquemia/reperfusão (Shimamura *et al*, 2005).

A presença de um aumentado número de moléculas de adesão (CD29⁺ e CD44⁺) em células NK, sugere a migração destas células para o fígado. O envolvimento da expressão destas moléculas em leucócitos, seguido de lesão hepática, também foi demonstrado em estudos experimentais como na hepatite induzida por concacavalina A (Chen *et al*, 2001) ou por enterotoxina estafilocócica B (McKallip *et al*, 2005).

Nós também sugerimos que o aumento da população CD56⁺CD16⁺ além da alta expressão de CD38, podem ser envolvidos com atividade citotóxica mediada pelas células NK (Sconocchia *et al*, 1999).

Nossos resultados apontam ainda para um papel da célula *natural killer T* (NKT), visto que o aumento de células CD56⁺CD3⁺ foi observado no sangue periférico de pacientes em comparação com amostras de sangue de indivíduos considerados saudáveis. Em concordância com nossos resultados, a relação das células NK e células NKT com a lesão hepática já foi descrita em casos de pacientes com FHF induzida por drogas, além de um estudo experimental de isquemia/reperfusão, este último descrevendo uma expansão de células com fenótipo NKT no fígado de camundongos após camplamento vascular, seguido de reperfusão (Kimura *et al*, 1999). As células NKT têm uma participação relevante na lesão hepática induzida por Con A em camundongos, sendo que animais *Knockouts* para a molécula de CD1d se tornam protegidos da falência do órgão (Takeda *et al*, 2000). Considerando que células NK são importantes produtoras de IFN- γ , em nosso grupo estudado, os altos níveis de IFN- γ observados no plasma e no tecido hepático podem sugerir a associação da NK com a produção desta citocina na FHF. Como já descrito, nos processos de lesão hepática, células do sistema imunológico inato interagem umas com as outras e afetam as células da imunidade adaptativa. Células NKT produzindo IFN- γ podem então agravar a lesão hepática causada pelas células NK (Trobonjaca *et al*, 2002).

Embora não tenha sido detectada uma significativa alteração quantitativa na taxa CD4/CD8 entre os pacientes com FHF e controles saudáveis, na análise de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), observamos que pacientes com falência hepática fulminante apresentaram um número significativamente aumentado de linfócitos T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, expressando marcadores de ativação (CD38) e

moléculas de adesão (CD29⁺ e CD44⁺). Com isto, pode-se especular que a resposta imunológica adaptativa também desempenhe seu papel nos estágios mais tardios da doença hepática fulminante, no entanto, não seriam as principais responsáveis pelo alto grau de lesão hepática induzindo FHF. Neste caso, linfócitos T atuariam secundariamente, pelas vias clássicas de morte celular, porém em uma etapa onde o nível de lesão já estaria causando os sintomas da doença. Nossa hipótese de participação de células T na FHF pode ser reforçada por estudos anteriores, os quais demonstraram o envolvimento de linfócitos T CD8⁺ na FHF, indicando-se que sua capacidade de produção de IFN- γ está aumentada nestes indivíduos (Kimura *et al*, 1999). Em nossos pacientes, os altos níveis de IFN- γ , observados no plasma e no tecido hepático, também podem estar relacionados com a presença das células T, principalmente as CD8⁺, que estariam contribuindo para estes elevados níveis. A citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos (CTL) também foi demonstrada em camundongos transgênicos HbsAg positivos, quando se sugeriu que a resposta envolveria inúmeros mediadores inflamatórios que amplificariam o efeito citopático do CTL. Entre estes mediadores estariam as citocinas pró-inflamatórias, principalmente, o IFN- γ (Ando *et al*, 1993).

Assim, pode-se especular que tanto células NK, quanto linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão envolvidos potencialmente com a alta produção de IFN- γ . Com relação às células T CD4⁺, pode-se destacar que este trabalho foi o primeiro a descrever sua ativação na FHF. Nos processos inflamatórios do fígado, a célula T CD4⁺ vem sendo descrita como célula T reguladora (CD4⁺ CD25⁺). Deste modo, em doenças como a hepatite C com evolução crônica, alguns estudos sugerem que células T CD4⁺ CD25⁺ e a alta produção de IL-10 poderiam estar relacionadas com a modulação da atividade inflamatória, levando à falta de controle da replicação viral (Cabrera *et al*, 2004). Como já comentado, os altos níveis de IL-10 podem estar relacionados com uma tentativa mal sucedida de imunomodulação da resposta inflamatória exacerbada. Até o momento, nosso grupo ainda não foi capaz de comprovar se essa falta de modulação inflamatória seria provocada pela baixa atividade de células com fenótipo regulatório (CD4⁺CD25⁺). Por outro lado, é possível especular que na FHF também existam células T CD4⁺ contribuindo para a elevada produção de IL-10, desempenhando papel imunomodulador sem sucesso, situação extremamente oposta ao que ocorreria na

forma crônica da doença. Outros estudos abordando o perfil de citocinas na lesão hepática confirmam nossos resultados indicando a existência de um desequilíbrio entre os grupos de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-12) e antiinflamatórias como IL-10, o que poderia estar relacionado com a exacerbação da inflamação, levando a extensas lesões hepáticas. Modelos que proponham o bloqueio de citocinas próinflamatórias (IL-12 e IFN- γ) ou a adição de IL-10 poderiam ser estratégias promissoras na redução do dano hepático grave na hepatite fulminante humana (Leifeld *et al*, 2002). No entanto, com base nos resultados obtidos em nosso estudo, o aumento de IL-10 apenas, não é capaz de estabelecer controle da resposta inflamatória na FHF.

A observação de IL-8 e MCP-1 significativamente aumentadas no plasma dos pacientes com FHF sugere que estas quimiocinas estejam também envolvidas na migração dos linfócitos para o fígado. A exposição de hepatócitos a estímulos como estresse oxidativo, etanol e IL-1 β e TNF- α resulta na produção de IL-8 (Rowell *et al*, 1997). Aumentados níveis circulantes de IL-8 vem também sendo demonstrados em pacientes com diferentes formas de doença hepática aguda, como na hepatite alcoólica, hepatite viral crônica ou na doença aguda de enxerto versus hospedeiro (Tilg *et al*, 1992, Hill *et al*, 1993, Sheron *et al*, 1993, Shimoda *et al*, 1998). Outros estudos também mencionaram a produção de MCP-1 em muitas células como hepatócitos e células de Kupffer e seu envolvimento em modelos de lesão hepática por isquemia/reperfusão. Em reforço ao que foi observado neste estudo, o MCP-1 já foi descrito como sendo ativo em células NK, estando envolvido no recrutamento destas células para o fígado em modelos de hepatocarcinoma (Sozzani *et al*, 1995, Tsuchiyama *et al*, 2007).

Nós sugerimos que independentemente da etiologia, possa haver um envolvimento de diversos fenótipos de linfócitos como NK, NKT, CD4⁺ e CD8⁺. Considerando que na toxicidade idiossincrática, metabólitos de algumas drogas podem se ligar a macromoléculas, se tornar imunogênicas e ativar a resposta imune mediada por células TCD4⁺, podemos especular que a apresentação de proteínas ligadas a drogas ou uma associação entre a droga e proteínas MHC de hepatócitos poderia estar envolvida na ativação do sistema imunológico especificamente nos casos de etiologia medicamentosa (Castell, 1998). Assim, na resposta inflamatória hepática, diferentes agentes indutores de inflamação poderiam desencadear repostas inflamatórias que

compartilham os mesmos mecanismos e, que no caso da FHF, a gravidade provem principalmente da associação entre células inflamatórias inatas e citocinas altamente expressas.

6- CONCLUSÕES:

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que:

1- No processo inflamatório que leva à extensa lesão tecidual na FHF, é notória a existência de vias e mecanismos que provavelmente são compartilhados entre as diferentes etiologias, com uma grande participação da imunidade inata;

2- A forte expressão da iNOS, observada em hepatócitos e células de Kupffer na FHF, está associada com a exacerbada resposta inflamatória. A extensa lesão hepática, pode estar associada com alta produção de NO, que atuaria desequilibrando os mecanismos de proteção hepática;

3- O estresse oxidativo/nitrosativo celular está presente na hepatite fulminante e seu efeito pode ser comprovado pela nitração de resíduos de tirosina (nitrotirosina) presentes em proteínas teciduais;

4- Os eosinófilos têm uma participação marcante na lesão hepática, possivelmente pela rápida liberação do conteúdo citotóxico de seus grânulos, além da produção de IL-6, que pode atuar desregulando a resposta inflamatória;

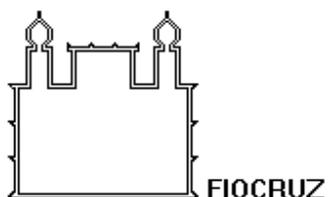
5- As células NK desempenham um papel importante na lesão dos hepatócitos. Estas células poderiam estar atuando tanto por seus mecanismos clássicos de morte celular, como pela via FasL, visto que hepatócitos são bastante suscetíveis a morte celular por este mecanismo, ou pela liberação de citotoxinas;

6- As características fenotípicas de ativação e migração das células T CD4⁺ e CD8⁺ sugerem seu papel no agravamento da lesão hepática durante processo inflamatório;

7- Na FHF, o extenso processo inflamatório mediado pelos mecanismos descritos anteriormente, não é adequadamente equilibrado pelos mecanismos clássicos de regulação da resposta inflamatória, como pela produção IL-10.

7-PERSPECTIVAS:

A identificação dos mecanismos imunológicos, assim como de biomarcadores específicos que poderiam prever a evolução para um quadro de falência hepática aguda, contribuirá para que sejam estabelecidas estratégias terapêuticas de controle, reduzindo a elevada taxa de mortalidade observada nesta síndrome. Por outro lado, isso promoverá uma redução nos custos anuais com os transplantes. Sendo assim, novas pesquisas serão realizadas por nosso grupo, visando obter mais informações à respeito dos aspectos imunopatológicos envolvidos na FHF.



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO**

ANEXO 2 : TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1

Instituição; Centro de Referência Nacional para Hepatites Virais/Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz -Fiocruz

Projeto de Pesquisa: Estudo imunopatológico de hepatites agudas e fulminantes.

Pesquisadores: Ms. Damião Carlos M. Santos / Dr Marcelo Alves Pinto

Eu ----- e/ou meu responsável ----- fomos convidados a participar de um estudo que irá avaliar a presença de alguns componentes do sistema imunológico presentes no sangue e no tecido hepático que estariam relacionados ao quadro de hepatite fulminante. Estamos sendo informados de que existem diversos tipos de hepatite, sendo que a hepatite fulminante é uma forma rara da doença, na qual os sintomas são mais intensos e com conseqüências mais graves.

Sabemos que o objetivo deste trabalho será investigar as causas da hepatite fulminante, ou seja, o porquê do desenvolvimento desta forma mais grave de hepatite. Para isso, precisamos consentir que amostras do tecido hepático (explante) que sejam retiradas após o transplante do fígado, caso isto venha a ocorrer, e/ou parte do sangue que já seria coletada para exames de rotina, sejam utilizados para a pesquisa. Esse material será levado para os laboratórios de desenvolvimento tecnológico e de imunologia viral do Instituto Oswaldo Cruz, para se pesquisar a presença de componentes específicos do sistema imunológico. Estamos sendo informados de que podemos não ter benefício direto dos resultados desta pesquisa, mas que este trabalho poderá esclarecer problemas relacionados à forma fulminante de hepatite, buscando mecanismos eficazes de tratamento no futuro. Recebemos também informações de que as amostras que estão sendo fornecidas deverão ser armazenadas para que possam ser adequadamente utilizadas no decorrer da pesquisa e que as mesmas poderiam ainda ser utilizadas para pesquisas futuras. Recebemos as orientações de que temos a liberdade de participar ou não da pesquisa, sem que haja qualquer prejuízo em relação tratamento no caso de não aceitarmos participar.

Declaramos ter recebido informações a respeito deste estudo e autorizamos o autor do projeto, a utilizar uma amostra do material para realização de exames para esta forma de hepatite. Os resultados desta pesquisa nos serão fornecidos de maneira confidencial, e serão utilizados para publicação científica com sigilo da nossa identidade.

Caso tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato com os pesquisadores relacionados acima : **Pavilhão Rocha Lima 5º andar, fone 2598 4555, 22706397, 96693729.**

Assinatura do paciente -----

RG -----

Assinatura do responsável -----

RG -----

Assinatura do pesquisador responsável

Data: -----

8-BIBLIOGRAFIA

Ader F, Chatellier D, Le Berre R, Morand P, Fourrier F. Fulminant Epstein-Barr virus (EBV) hepatitis in a young immunocompetent subject. *Med Mal Infect* 2006;36(7):396-8.

Ahboucha S, Butterworth RF. The neurosteroid system: Implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2007.

Aihaiti X, Hayamizu K, Oishi K, Yoshimitsu M, Itamoto T, Asahara T. Facilitation of survival in a rat fulminant hepatic failure model by combination therapy using recombinant G-CSF and tacrolimus. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26(4):226-34.

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75(6):639-53.

- Alberti A, Chemello L, Benvegna L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:17-24.
- Amar PJ, Schiff ER. Acetaminophen safety and hepatotoxicity--where do we go from here? *Expert Opin Drug Saf* 2007;6(4):341-55.
- Ando K, Moriyama T, Guidotti LG, Wirth S, Schreiber RD, Schlicht HJ, et al. Mechanisms of class I restricted immunopathology. A transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *J Exp Med* 1993;178(5):1541-54.
- Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, et al. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 2003;3:29.
- Av SP. Hepatic encephalopathy: pathophysiology and advances in therapy. *Trop Gastroenterol* 2007;28(1):4-10.
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 2001;204(4):494-507.
- Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmun Rev* 2003;2(1):36-42.
- Balkwill F, Pitha PM. Interferons and cytokines on a grand scale. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(1):91-5.
- Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol* 2007;149(2):217-25.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195(5):603-16.
- Beishuizen A, Vermes I, Haanen C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Adv Clin Chem* 1998;33:55-131.
- Bernuau J, Rueff B, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis* 1986;6(2):97-106.
- Bianco E, Stroffolini T, Spada E, Szklo A, Marzolini F, Ragni P, et al. Case fatality rate of acute viral hepatitis in Italy: 1995-2000. An update. *Dig Liver Dis* 2003;35(6):404-8.
- Blei AT. The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 2005;47(1-2):71-7.

- Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, et al. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* 2002;35(2):289-98.
- Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):G387-92.
- Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998;18(11):6353-64.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002;33(11):1440-50.
- Buitrago B, Hadler SC, Popper H, Thung SN, Gerber MA, Purcell RH, et al. Epidemiologic aspects of Santa Marta hepatitis over a 40-year period. *Hepatology* 1986;6(6):1292-6.
- Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40(5):1062-71.
- Campbell EM, Kunkel SL, Strieter RM, Lukacs NW. Temporal role of chemokines in a murine model of cockroach allergen-induced airway hyperreactivity and eosinophilia. *J Immunol* 1998;161(12):7047-53.
- Carvalho AT, Elia CC, de Souza HS, Elias PR, Pontes EL, Lukashok HP, et al. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(2):120-5.
- Castell JV. Allergic hepatitis: a drug-mediated organ-specific immune reaction. *Clin Exp Allergy* 1998;28 Suppl 4:13-9.
- Chang B, Nishikawa M, Sato E, Inoue M. Mice lacking inducible nitric oxide synthase show strong resistance to anti-Fas antibody-induced fulminant hepatitis. *Arch Biochem Biophys* 2003;411(1):63-72.
- Chauveau E, Martin J, Saliba F, Nicolas X, Richecoeur M, Klotz F. [Fatal fulminating hepatitis due to Herpes simplex virus type 2 in a young immunocompetent female]. *Med Trop (Mars)* 1999;59(1):58-60.
- Chen D, McKallip RJ, Zeytun A, Do Y, Lombard C, Robertson JL, et al. CD44-deficient mice exhibit enhanced hepatitis after concanavalin A injection: evidence for involvement of CD44 in activation-induced cell death. *J Immunol* 2001;166(10):5889-97.

- Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1. *J Immunol* 1997;159(5):2240-9.
- Ciocca M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 2000;18 Suppl 1:S71-4.
- Clemmesen JO, Larsen FS, Kondrup J, Hansen BA, Ott P. Cerebral herniation in patients with acute liver failure is correlated with arterial ammonia concentration. *Hepatology* 1999;29(3):648-53.
- Collins C, Norris S, McEntee G, Traynor O, Bruno L, von Boehmer H, et al. RAG1, RAG2 and pre-T cell receptor alpha chain expression by adult human hepatic T cells: evidence for extrathymic T cell maturation. *Eur J Immunol* 1996;26(12):3114-8.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633-40.
- Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):51-62.
- de Groen PC, Kephart GM, Gleich GJ, Ludwig J. The eosinophil as an effector cell of the immune response during hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1994;20(3):654-62.
- De Vita S, Sacco C, Sansonno D, Gloghini A, Dammacco F, Crovatto M, et al. Characterization of overt B-cell lymphomas in patients with hepatitis C virus infection. *Blood* 1997;90(2):776-82.
- De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000;119(6):1720-30.
- Detry O, De Roover A, Honore P, Meurisse M. Brain edema and intracranial hypertension in fulminant hepatic failure: pathophysiology and management. *World J Gastroenterol* 2006;12(46):7405-12.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87(6):2095-147.
- Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin Nephrol* 2007;27(1):98-114.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8(4):445-54.
- Domachowske JB, Bonville CA, Dyer KD, Easton AJ, Rosenberg HF. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1alpha are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell Immunol* 2000;200(2):98-104.

- Domachowske JB, Bonville CA, Gao JL, Murphy PM, Easton AJ, Rosenberg HF. The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 alpha and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection. *J Immunol* 2000;165(5):2677-82.
- Drewe J, Beglinger C, Kissel T. The absorption site of cyclosporin in the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol* 1992;33(1):39-43.
- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 2000;46(12):2050-68.
- Durand F, Belghiti J, Handra-Luca A, Francoz C, Sauvanet A, Marcellin P, et al. Auxiliary liver transplantation for fulminant hepatitis B: results from a series of six patients with special emphasis on regeneration and recurrence of hepatitis B. *Liver Transpl* 2002;8(8):701-7.
- El-Ahwany EG, Hanallah SB, Zada S, El Ghorab NM, Badir B, Badawy A, et al. Immunolocalization of macrophage adhesion molecule-1 and macrophage inflammatory protein-1 in schistosomal soluble egg antigen-induced granulomatous hyporesponsiveness. *Int J Parasitol* 2000;30(7):837-42.
- Emmanuilidis K, Weighardt H, Maier S, Gerauer K, Fleischmann T, Zheng XX, et al. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J Immunol* 2001;167(7):3919-27.
- Escorsell A, Mas A, de la Mata M. Acute liver failure in Spain: Analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007.
- Eum HA, Park SW, Lee SM. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide* 2007.
- Fiore G, Galetta V, Piazzolla G, Angarano I, Jirillo E, Schiraldi O, et al. CD45RA and CD45RO isoform expression on intrahepatic T-lymphocytes in chronic hepatitis C. *Microbios* 1997;92(371):73-82.
- Flisiak R, Jaroszewicz J, Lapinski TW, Flisiak I, Prokopowiczi D. Effect of pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin treatment on plasma transforming growth factor-beta1, metalloproteinase-1, and tissue metalloproteinase inhibitor-1 in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005;11(43):6833-8.
- Fonseca JC. [Hepatitis D]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(2):181-90.
- Fontana RJ. Acute liver failure. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15(3):270-7.
- Fox IJ, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004;4 Suppl 6:7-13.

- Franchini M, Manzato F, Salvagno GL, Lippi G. Potential role of recombinant activated factor VII for the treatment of severe bleeding associated with disseminated intravascular coagulation: a systematic review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18(7):589-93.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275(4):2247-50.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, et al. Analysis of the genotype-determining region of hepatitis A viral RNA in relation to disease severities. *Hepatol Res* 2003;25(2):124-134.
- Garcia-Monzon C, Sanchez-Madrid F, Garcia-Buey L, Garcia-Arroyo A, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R. Vascular adhesion molecule expression in viral chronic hepatitis: evidence of neoangiogenesis in portal tracts. *Gastroenterology* 1995;108(1):231-41.
- Gimson AE, O'Grady J, Ede RJ, Portmann B, Williams R. Late onset hepatic failure: clinical, serological and histological features. *Hepatology* 1986;6(2):288-94.
- Goldstein MJ, Salame E, Kapur S, Kinkhabwala M, LaPointe-Rudow D, Harren NPP, et al. Analysis of failure in living donor liver transplantation: differential outcomes in children and adults. *World J Surg* 2003;27(3):356-64.
- Gonzalez-Asequinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, et al. alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(15):8461-6.
- Good MF. Development of immunity to malaria may not be an entirely active process. *Parasite Immunol* 1995;17(2):55-9.
- Gorham JD. Transforming growth factor-beta1, Th1 responses, and autoimmune liver disease. *Transfusion* 2005;45(2 Suppl):51S-59S.
- Granot E, Yakobovich E, Bardenstein R. Tacrolimus immunosuppression - an association with asymptomatic eosinophilia and elevated total and specific IgE levels. *Pediatr Transplant* 2006;10(6):690-3.
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10(1):76-99.
- Guebre-Xabier M, Yang S, Lin HZ, Schwenk R, Krzych U, Diehl AM. Altered hepatic lymphocyte subpopulations in obesity-related murine fatty livers: potential mechanism for sensitization to liver damage. *Hepatology* 2000;31(3):633-40.
- Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994;58(8):951-2.

- Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2005;17(1):29-35.
- Hausmann EH, Hao SY, Pace JL, Parmely MJ. Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Infect Immun* 1994;62(9):3625-32.
- Hill DB, Marsano LS, McClain CJ. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1993;18(3):576-80.
- Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 1998;11(6):604-7.
- Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metab Rev* 2004;36(3-4):805-22.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19(6):1354-9.
- Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiaramonte M, Hesse M, Davis EM, et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *Faseb J* 2001;15(13):2545-7.
- Homberger FR, Zhang L. Characterization of mRNAs 4 and 5 of enterotropic mouse hepatitis virus. *Lab Anim Sci* 1997;47(1):86-90.
- Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:275-95.
- Hong F, Kim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene* 2002;21(1):32-43.
- Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004;77(10):1481-6.
- Huang CD, Wang CH, Liu CY, Lin SM, Chou CL, Liu WT, et al. Eosinophils from asthmatics release IL-5 in an autocrine fashion to prevent apoptosis through upregulation of Bcl-2 expression. *J Asthma* 2005;42(5):395-403.
- Huang YS, Chan CY, Wu JC, Pai CH, Chao Y, Lee SD. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol* 1996;24(4):377-84.

- Hughes RD, Nicolaou N, Langley PG, Ellis AJ, Wendon JA, Williams R. Plasma cytokine levels and coagulation and complement activation during use of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Artif Organs* 1998;22(10):854-8.
- Hussain SM, Frazier JM. Cellular toxicity of hydrazine in primary rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2002;69(2):424-32.
- Hussain Z, Das BC, Husain SA, Polipalli SK, Ahmed T, Begum N, et al. Virological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles. *World J Gastroenterol* 2006;12(29):4683-8.
- Irie H, Shiga J. Pathogenesis of herpes simplex hepatitis in macrophage-depleted mice: possible involvement of tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase in massive apoptosis. *Anat Sci Int* 2005;80(4):199-211.
- Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(7):718-21.
- Iskit AB, Guc O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(10):953-7.
- Jalan R, Olde Damink SW, Hayes PC, Deutz NE, Lee A. Pathogenesis of intracranial hypertension in acute liver failure: inflammation, ammonia and cerebral blood flow. *J Hepatol* 2004;41(4):613-20.
- Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, Gupta RK, et al. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(5):676-82.
- Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192(7):921-30.
- Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Ishikawa T, Murase K, Kusakabe A, et al. Comparisons of peripheral blood and hepatic lymphocyte subpopulations and interferon production in chronic viral hepatitis. *J Clin Lab Immunol* 1990;33(1):1-6.
- Kamal SM, Turner B, He Q, Rasenack J, Bianchi L, Al Tawil A, et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. *Hepatology* 2006;43(4):771-9.
- Kanda D, Takagi H, Hashimoto Y, Yamazaki Y, Matsui M, Kosone T, et al. Severe manifestation of acute hepatitis A recently found in Gunma, Japan. *J Gastroenterol* 2002;37(7):517-22.
- Karre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 2002;55(3):221-8.

- Kershenovich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol* 2003;2(4):159-63.
- Keshavarzian A, Saverymuttu SH, Tai PC, Thompson M, Barter S, Spry CJ, et al. Activated eosinophils in familial eosinophilic gastroenteritis. *Gastroenterology* 1985;88(4):1041-9.
- Kimura K, Ando K, Tomita E, Ohnishi H, Ishikawa T, Kakumu S, et al. Elevated intracellular IFN-gamma levels in circulating CD8+ lymphocytes in patients with fulminant hepatitis. *J Hepatol* 1999;31(4):579-83.
- Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 1999;162(3):1401-7.
- Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Fukui H, Morimoto H, Tamagawa Y. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31(1 Suppl):S61-6.
- Koulentaki M, Notas G, Petinaki E, Valatas V, Mouzas IA, Castanas E, et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines in acute hepatitis B. *Eur J Intern Med* 2004;15(1):35-38.
- Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem* 2001;276(28):26605-13.
- Kremer M, Hines IN, Milton RJ, Wheeler MD. Favored T helper 1 response in a mouse model of hepatosteatosis is associated with enhanced T cell-mediated hepatitis. *Hepatology* 2006;44(1):216-27.
- Kwon AH, Qiu Z, Tsuji K, Miyaso T, Okumura T. Fibronectin prevents endotoxin shock after partial hepatectomy in rats via inhibition of nuclear factor-kappaB and apoptosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232(7):895-903.
- Lacy P, Levi-Schaffer F, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez J, et al. Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood* 1998;91(7):2508-16.
- Lamkhioued B, Gounni AS, Aldebert D, Delaporte E, Prin L, Capron A, et al. Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann N Y Acad Sci* 1996;796:203-8.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225-74.
- Larsen FS, Gottstein J, Blei AT. Cerebral hyperemia and nitric oxide synthase in rats with ammonia-induced brain edema. *J Hepatol* 2001;34(4):548-54.

- Larsen FS. Optimal management of patients with fulminant hepatic failure: targeting the brain. *Hepatology* 2004;39(2):299-301.
- Leifeld L, Trautwein C, Dumoulin FL, Manns MP, Sauerbruch T, Spengler U. Enhanced expression of CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40 and their ligands CD28 and CD154 in fulminant hepatic failure. *Am J Pathol* 1999;154(6):1711-20.
- Leifeld L, Cheng S, Ramakers J, Dumoulin FL, Trautwein C, Sauerbruch T, et al. Imbalanced intrahepatic expression of interleukin 12, interferon gamma, and interleukin 10 in fulminant hepatitis B. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):1001-8.
- Leifeld L, Fielenbach M, Dumoulin FL, Speidel N, Sauerbruch T, Spengler U. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 2002;37(5):613-9.
- Leifeld L, Dumoulin FL, Purr I, Janberg K, Trautwein C, Wolff M, et al. Early up-regulation of chemokine expression in fulminant hepatic failure. *J Pathol* 2003;199(3):335-44.
- Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):G1069-73.
- Li Y, Zhang T, Ho C, Orange JS, Douglas SD, Ho WZ. Natural killer cells inhibit hepatitis C virus expression. *J Leukoc Biol* 2004;76(6):1171-9.
- Li Z, Diehl AM. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2003;19(6):565-71.
- Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Justica B, Orfao A. The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood Cells Mol Dis* 2002;28(2):181-90.
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000;6(12):1348-54.
- Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection. *J Immunol* 2000;164(12):6480-6.
- Ljunggren KE, Patarroyo ME, Engle R, Purcell RH, Gerin JL. Viral hepatitis in Colombia: a study of the "hepatitis of the Sierra Nevada de Santa Marta". *Hepatology* 1985;5(2):299-304.
- Lohse AW, Knolle PA, Bilo K, Uhrig A, Waldmann C, Ibe M, et al. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 1996;110(4):1175-81.

- Louis H, Le Moine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, et al. Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* 1997;112(3):935-42.
- Louis H, Le Moine A, Flamand V, Nagy N, Quertinmont E, Paulart F, et al. Critical role of interleukin 5 and eosinophils in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Gastroenterology* 2002;122(7):2001-10.
- Luedde T, Assmus U, Wustefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, et al. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115(4):849-59.
- Lund FE, Cockayne DA, Randall TD, Solvason N, Schuber F, Howard MC. CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev* 1998;161:79-93.
- Ma W, Wang ZR, Shi L, Yuan Y. Expression of macrophage inflammatory protein-1alpha in Kupffer cells following liver ischemia or reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006;12(24):3854-8.
- MacDonald HR. Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol* 2002;14(2):250-4.
- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 2005;121(7):977-90.
- Maher JJ. Cytokines: overview. *Semin Liver Dis* 1999;19(2):109-15.
- Mallone R, Funaro A, Zubiaur M, Baj G, Ausiello CM, Tacchetti C, et al. Signaling through CD38 induces NK cell activation. *Int Immunol* 2001;13(4):397-409.
- Marsh JW, Vehe KL, White HM. Immunosuppressants. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21(3):679-93.
- Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999;21(3):565-82.
- Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 2005;355(1-2):61-5.
- Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol* 2004;16(2):217-25.
- Masubuchi Y, Bourdi M, Reilly TP, Graf ML, George JW, Pohl LR. Role of interleukin-6 in hepatic heat shock protein expression and protection against acetaminophen-induced liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(1):207-12.

- Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Hyodo Y, Hayashi N, Hiroishi K, et al. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol* 1997;159(1):97-106.
- Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous MCP-1 influences systemic cytokine balance in a murine model of acute septic peritonitis. *Exp Mol Pathol* 2000;68(2):77-84.
- Matsumoto G, Omi Y, Lee U, Nishimura T, Shindo J, Penninger JM. Adhesion mediated by LFA-1 is required for efficient IL-12-induced NK and NKT cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2000;30(12):3723-31.
- McIntyre KW, Welsh RM. Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection. *J Exp Med* 1986;164(5):1667-81.
- McKallip RJ, Fisher M, Gunthert U, Szakal AK, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 and its v7 isoform in staphylococcal enterotoxin B-induced toxic shock: CD44 deficiency on hepatic mononuclear cells leads to reduced activation-induced apoptosis that results in increased liver damage. *Infect Immun* 2005;73(1):50-61.
- Messele T, Roos MT, Hamann D, Koot M, Fontanet AL, Miedema F, et al. Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(4):687-92.
- Mihm S, Fayyazi A, Ramadori G. Hepatic expression of inducible nitric oxide synthase transcripts in chronic hepatitis C virus infection: relation to hepatic viral load and liver injury. *Hepatology* 1997;26(2):451-8.
- Minghini A, Britt LD, Hill MA. Interleukin-1 and interleukin-6 mediated skeletal muscle arteriolar vasodilation: in vitro versus in vivo studies. *Shock* 1998;9(3):210-5.
- Minin EA, Buchwalow IB, Wellner M, Palmes D, Spiegel HU, Neumann J, et al. L-Arginine-NO-cGMP signaling following acute liver injury in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2005;57(2):161-71.
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2007.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002;32(5):1205-11.
- Moritoki Y, Lian ZX, Ohsugi Y, Ueno Y, Gershwin ME. B cells and autoimmune liver diseases. *Autoimmun Rev* 2006;5(7):449-57.

- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3(4):331-41.
- Mudter J, Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(8):1016-23.
- Mueller XM. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. *Ann Thorac Surg* 2004;77(1):354-62.
- Muhlen KA, Schumann J, Wittke F, Stenger S, Van Rooijen N, Van Kaer L, et al. NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunol* 2004;172(5):3034-41.
- Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, et al. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1999;104(1):49-57.
- Murakami J, Shimizu Y, Kashii Y, Kato T, Minemura M, Okada K, et al. Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30(1):143-50.
- Muriel P. Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. *J Appl Toxicol* 2000;20(3):189-95.
- Murphy EJ, Davern TJ, Shakil AO, Shick L, Masharani U, Chow H, et al. Troglitazone-induced fulminant hepatic failure. Acute Liver Failure Study Group. *Dig Dis Sci* 2000;45(3):549-53.
- Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000;182(4):1103-8.
- Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, et al. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 1999;19(6):422-7.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267(5203):1449-56.
- Nagata S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Prog Mol Subcell Biol* 1996;16:87-103.
- Nagral A, Quaglia A, Sabin CA, Dhillon AP, Bearcroft CP, Millar A, et al. Blood and graft eosinophils in acute cellular rejection of liver allografts. *Transplant Proc* 2001;33(4):2588-93.
- Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* 1989;57(2):590-5.

- Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32(2):247-55.
- Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269(19):13725-8.
- Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl* 2000;6(1):21-31.
- Nunez-Martinez O, De la Cruz G, De Diego A, Molina J, Rincon D, Santos L, et al. Liver transplantation for fulminant and subfulminant hepatic failure. *Transplant Proc* 2003;35(5):1855-6.
- Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54(2):171-8.
- O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989;97(2):439-45.
- O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet* 1993;342(8866):273-5.
- Okamoto S, Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, Nakamura K. Macrophage inflammatory protein-1alpha plays a crucial role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice. *Hepatol Res* 2005;32(1):38-45.
- Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, Rothery S, Williams TJ, Rankin SM. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med* 1998;188(9):1621-32.
- Pappachan MJ, Mathew S, Aravindan KP, Khader A, Bharghavan PV, Kareem MM, et al. Risk factors for mortality in patients with leptospirosis during an epidemic in northern Kerala. *Natl Med J India* 2004;17(5):240-2.
- Pereira LM, Langlely PG, Hayllar KM, Tredger JM, Williams R. Coagulation factor V and VIII/V ratio as predictors of outcome in paracetamol induced fulminant hepatic failure: relation to other prognostic indicators. *Gut* 1992;33(1):98-102.
- Pham BN, Mosnier JF, Walker F, Njapoum C, Bougy F, Degott C, et al. Flow cytometry CD4+/CD8+ ratio of liver-derived lymphocytes correlates with viral replication in chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1994;97(3):403-10.
- Pham BN, Bemua J, Durand F, Sauvanet A, Degott C, Prin L, et al. Eotaxin expression and eosinophil infiltrate in the liver of patients with drug-induced liver disease. *J Hepatol* 2001;34(4):537-47.

- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431(7007):461-6.
- Pinto MA, Marchevsky RS, Pelajo-Machado M, Santiago MA, Pissurno JW, Franca MS, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in liver and splenic T lymphocyte rise are associated with liver histological damage during experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*. *Exp Toxicol Pathol* 2000;52(1):3-10.
- Platzer C, Docke W, Volk H, Prosch S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol* 2000;105(1):31-8.
- Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988;46(5):754-61.
- Pruvot FR, Navarro F, Janin A, Labalette M, Masy E, Lecomte-Houcke M, et al. Characterization, quantification, and localization of passenger T lymphocytes and NK cells in human liver before transplantation. *Transpl Int* 1995;8(4):273-9.
- Racanelli V, Sansonno D, Piccoli C, D'Amore FP, Tucci FA, Dammacco F. Molecular characterization of B cell clonal expansions in the liver of chronically hepatitis C virus-infected patients. *J Immunol* 2001;167(1):21-9.
- Rafi-Janajreh AQ, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 in CTL and NK cell activity. *Front Biosci* 1998;3:d665-71.
- Rahman T, Hodgson H. Clinical management of acute hepatic failure. *Intensive Care Med* 2001;27(3):467-76.
- Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2(10):1104-8.
- Riese U, Brenner S, Docke WD, Prosch S, Reinke P, Oppert M, et al. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem* 2000;212(1-2):45-50.
- Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, et al. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9(2):107-13.
- Robbie MJ, Scurry JP, Stevenson P. Carbamazepine-induced severe systemic hypersensitivity reaction with eosinophilia. *Drug Intell Clin Pharm* 1988;22(10):783-4.

- Rolando N, Harvey F, Brahm J, Philpott-Howard J, Alexander G, Casewell M, et al. Fungal infection: a common, unrecognised complication of acute liver failure. *J Hepatol* 1991;12(1):1-9.
- Rolando N, Gimson A, Wade J, Philpott-Howard J, Casewell M, Williams R. Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure. *Hepatology* 1993;17(2):196-201.
- Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11(5):613-24.
- Rothenberg ME. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):11-28; quiz 29.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006;24:147-74.
- Rowell DL, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, et al. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am J Physiol* 1997;273(2 Pt 1):G322-32.
- Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, et al. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* 2000;14(7):854-62.
- Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S, et al. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95(8):2047-55.
- Saeed SA, Integlia MJ, Pleskow RG, Calenda KA, Rohrer RJ, Dayal Y, et al. Tacrolimus-associated eosinophilic gastroenterocolitis in pediatric liver transplant recipients: role of potential food allergies in pathogenesis. *Pediatr Transplant* 2006;10(6):730-5.
- Sainokami S, Abe K, Sato A, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K, et al. Initial load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile, and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection. *J Gastroenterol* 2007;42(3):241-9.
- Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J Exp Med* 1998;187(1):1-14.
- Sandler NG, Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wynn TA. Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair. *J Immunol* 2003;171(7):3655-67.

- Sansonno D, Lauletta G, De Re V, Tucci FA, Gatti P, Racanelli V, et al. Intrahepatic B cell clonal expansions and extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2004;34(1):126-36.
- Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, et al. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996;111(3):736-44.
- Sanz-Cameno P, Medina J, Garcia-Buey L, Garcia-Sanchez A, Borque MJ, Martin-Vilchez S, et al. Enhanced intrahepatic inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2002;37(6):723-9.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17(6):1675-87.
- Schiødt FV, Ostapowicz G, Murray N, Satyanarana R, Zaman A, Munoz S, et al. Alpha-fetoprotein and prognosis in acute liver failure. *Liver Transpl* 2006;12(12):1776-81.
- Schmidt LE, Dalhoff K. Alpha-fetoprotein is a predictor of outcome in acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2005;41(1):26-31.
- Schwartz RS. Shattuck lecture: Diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N Engl J Med* 2003;348(11):1017-26.
- Sconocchia G, Titus JA, Mazzoni A, Visintin A, Pericle F, Hicks SW, et al. CD38 triggers cytotoxic responses in activated human natural killer cells. *Blood* 1999;94(11):3864-71.
- Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46.
- Sekiyama KD, Yoshida M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1994;98(1):71-7.
- Serody JS, Cook DN, Kirby SL, Reap E, Shea TC, Frelinger JA. Murine T lymphocytes incapable of producing macrophage inhibitory protein-1 are impaired in causing graft-versus-host disease across a class I but not class II major histocompatibility complex barrier. *Blood* 1999;93(1):43-50.
- Shawcross DL, Davies NA, Mookerjee RP, Hayes PC, Williams R, Lee A, et al. Worsening of cerebral hyperemia by the administration of terlipressin in acute liver failure with severe encephalopathy. *Hepatology* 2004;39(2):471-5.

- Sheron N, Bird G, Koskinas J, Portmann B, Ceska M, Lindley I, et al. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology* 1993;18(1):41-6.
- Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cell Immunol* 2005;234(1):31-8.
- Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, Mori M, Bonkovsky HL, Banner BF, et al. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28(1):108-15.
- Simpson KJ, Henderson NC, Bone-Larson CL, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles. *Clin Sci (Lond)* 2003;104(1):47-63.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42(4):501-10.
- Sozzani S, Locati M, Zhou D, Rieppi M, Luini W, Lamorte G, et al. Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines. *J Leukoc Biol* 1995;57(5):788-94.
- Spengler U, Lechmann M, Irrgang B, Dumoulin FL, Sauerbruch T. Immune responses in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1996;24(2 Suppl):20-5.
- Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001;13(2):248-54.
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis* 2007;27(4):339-50.
- Takagi K, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Okuda K, Watanabe J, Takahashi H, et al. Interleukin-1 is not essential for expression of inducible NOS in hepatocytes induced by lipopolysaccharide in vivo. *Nitric Oxide* 2007;16(4):433-41.
- Takahashi Y, Fukusato T, Kobayashi Y, Akiyama S, Tamatani T, Shiga J, et al. High expression of eosinophil chemoattractant ecalectin/galectin-9 in drug-induced liver injury. *Liver Int* 2006;26(1):106-15.
- Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5498-503.
- Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 1997;158(5):2303-9.

- Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J Clin Invest* 2003;112(7):978-80.
- Teixeira MM. Eosinophil-active chemokines: assessment of in vivo activity. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(1):19-24.
- Teoh N, Leclercq I, Pena AD, Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice: implications for preconditioning. *Hepatology* 2003;37(1):118-28.
- Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90(1):196-203.
- Tilg H, Ceska M, Vogel W, Herold M, Margreiter R, Huber C. Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation. *Transplantation* 1992;53(4):800-3.
- Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343(20):1467-76.
- Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006;26(9):1029-39.
- Toura I, Kawano T, Akutsu Y, Nakayama T, Ochiai T, Taniguchi M. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 1999;163(5):2387-91.
- Toyabe S, Seki S, Iai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, et al. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 1997;159(3):1537-42.
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:317-43.
- Trachana M, Roilides E, Gompakis N, Kanellopoulou K, Mpantouraki M, Kanakoudi-Tsakalidou F. Case report. Hepatic abscesses due to *Aspergillus terreus* in an immunodeficient child. *Mycoses* 2001;44(9-10):415-8.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339(17):1217-27.
- Trautwein C, Rakemann T, Malek NP, Plumpe J, Tiegs G, Manns MP. Concanavalin A-induced liver injury triggers hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1998;101(9):1960-9.
- Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis* 1970;3:282-98.
- Trobonjaca Z, Kroger A, Stober D, Leithauser F, Moller P, Hauser H, et al. Activating immunity in the liver. II. IFN-beta attenuates NK cell-dependent liver injury triggered by liver NKT cell activation. *J Immunol* 2002;168(8):3763-70.

- Tseng CT, Miskovsky E, Houghton M, Klimpel GR. Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 2001;33(5):1312-20.
- Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, et al. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 2007;178(1):574-83.
- Tsuda K, Maeda T, Tominaga A, Watanabe Y, Miyazaki E, Enzan H, et al. Eosinophil-induced liver injury: an experimental model using IL-5 transgenic mice. *J Hepatol* 2001;34(2):270-7.
- Tsutsui H, Adachi K, Seki E, Nakanishi K. Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr Mol Med* 2003;3(6):545-59.
- Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(6):405-17.
- Tzung SP, Fausto N, Hockenbery DM. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol* 1997;150(6):1985-95.
- Ung KA, Remotti H, Olsson R. Eosinophilic hepatic necrosis in hypereosinophilic syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2000;31(4):323-7.
- Vaquero J, Chung C, Blei AT. Brain edema in acute liver failure. A window to the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Ann Hepatol* 2003;2(1):12-22.
- Verrico MM, Nace DA, Towers AL. Fulminant chemical hepatitis possibly associated with donepezil and sertraline therapy. *J Am Geriatr Soc* 2000;48(12):1659-63.
- Vitek MP, Brown C, Xu Q, Dawson H, Mitsuda N, Colton CA. Characterization of NO and cytokine production in immune-activated microglia and peritoneal macrophages derived from a mouse model expressing the human NOS2 gene on a mouse NOS2 knockout background. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(5-6):893-901.
- Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Hepatic expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in viral hepatitis B. *Hepatology* 1990;12(1):148-54.
- Wagner T, Dhedin N, Philippe B, Rivaud E, Vernant JP, Couderc LJ. Acute eosinophilic pneumonia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2006;85(3):202-3.

- Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J* 1997;133(3):335-9.
- Wang G, Cai P, Ansari GA, Khan MF. Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. *Toxicology* 2007;229(3):186-93.
- Wang JH, Redmond HP, Watson RW, Bouchier-Hayes D. Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in induction of hepatocyte necrosis. *Am J Physiol* 1995;269(2 Pt 1):G297-304.
- Watanabe H, Ohira H, Kuroda M, Takagi T, Ishikawa H, Nishimaki T, et al. Primary sclerosing cholangitis with marked eosinophilic infiltration in the liver. *J Gastroenterol* 1995;30(4):524-8.
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(5):361-8.
- Wick MJ, Leithauser F, Reimann J. The hepatic immune system. *Crit Rev Immunol* 2002;22(1):47-103.
- Williams GM, Iatropoulos MJ. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol* 2002;30(1):41-53.
- Woods ML, Shimizu Y. Signaling networks regulating beta1 integrin-mediated adhesion of T lymphocytes to extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 2001;69(6):874-80.
- Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2006;72(9):1090-101.
- Wullaert A, van Loo G, Heyninck K, Beyaert R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr Rev* 2007;28(4):365-86.
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1441-6.
- Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999;30(1):203-8.
- Zhang L, Yi H, Xia XP, Zhao Y. Transforming growth factor-beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. *Autoimmunity* 2006;39(4):269-76.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)