



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATO DANIEL RAMALHO CARDOSO

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ST2 NO ESTRESSE
OXIDATIVO HEPÁTICO INDUZIDO PELO CCl₄**

Londrina
2012

RENATO DANIEL RAMALHO CARDOSO

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ST2 NO ESTRESSE
OXIDATIVO HEPÁTICO INDUZIDO PELO CCl₄**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C268p Cardoso, Renato Daniel Ramalho
Participação do receptor ST2 no estresse oxidativo hepático induzido pelo CCL4/
Renato Daniel Ramalho Cardoso. – Londrina, 2012.
60 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental– Teses. 2. Estresse oxidativo– Teses. 3. Citocinas–
Teses. 4. Fígado x Lesões– Teses. I. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação
em Patologia Experimental III. Título.

CDU 616-092

RENATO DANIEL RAMALHO CARDOSO

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ST2 NO ESTRESSE OXIDATIVO
HEPÁTICO INDUZIDO PELO CCL₄**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico a Deus, pela minha vida e saúde.

Aos meus pais, Ricardo e Gisele, que sempre me deram suporte para uma boa vida, uma ótima educação, muito amor e que tanto se sacrificaram por mim.

As minhas irmãs, Géssica e Giovanna, pelo amor, pelo carinho e pelo cuidado.

A minha namorada Sandy, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e por todo bem que ela me faz.

Aos meus familiares em geral, que sempre me apoiaram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr., pela confiança, pelo apoio e suporte para o meu crescimento e amadurecimento científico e acadêmico.

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini pela colaboração na minha dissertação e apoio laboratorial.

A minha amiga e mentora intelectual Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier, que me ensinou, auxiliou e me ajudou muito na minha dissertação.

Ao Zui, ao Pedrinho, Prof. Dr. Jair Tonon e Adernaldo pela amizade, pelas “cantorias”, pelos ensinamentos que me servirão tanto pra vida, quanto para fins laboratoriais.

Aos amigos e amigas do laboratório de Inflamação e Dor e do laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cabral e a Profa. Vânia Terra pelo estágio em docência.

E a todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente.

“Que tamanho tem o universo?
O universo tem o tamanho do seu mundo.
Que tamanho tem o meu mundo?
O teu mundo tem o tamanho dos seus sonhos”.

Augusto Cury

CARDOSO, Renato Daniel Ramalho. **PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR ST2 NO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO INDUZIDO PELO CCl₄**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A IL-33 é uma citocina pertencente a família da IL-1 que se liga com o receptor específico ST2 ativando as MAP quinases e o NF-κB. Dependendo do ambiente em que é produzida, a IL-33 pode estimular diretamente ou indiretamente células Th1, Th2, Th17 e NK-T, sugerindo o caráter pleiotrópico dessa molécula. Estudos recentes sugerem que a superexpressão do receptor ST2 reduz a lesão hepática induzida em modelo de isquemia e reperfusão e que o tratamento com o CCl₄ aumenta a expressão de IL-33 e ST2. Este trabalho tem como objetivo investigar a participação e os mecanismos envolvidos na ativação da IL-33 via receptor ST2 na letalidade e lesão hepática induzido pela administração de CCl₄ com ênfase no estresse oxidativo em camundongos. Foram utilizados camundongos Balb/c (WT) e ST2/KO para a realizar a avaliação da letalidade do CCl₄ através da sobrevivência e para avaliação do estresse oxidativo, como o TRAP, a mensuração dos níveis de peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas e a avaliação da atividade da catalase e da superóxido dismutase. Os resultados demonstraram que os camundongos ST2/KO após 6 horas de terem recebido tratamento com o CCl₄ obtiveram menor letalidade, maior capacidade antioxidante total, resultando em menores níveis de proteína carbonilada e menores níveis de peroxidação lipídica quando comparados com os animais WT. Os animais ST2/KO ainda apresentaram baixa atividade da enzima catalase e da superóxido dismutase, menores níveis de GSH e de citocinas pró-inflamatória. Com isso, os resultados sugerem que a ativação do receptor ST2 através da IL-33, está relacionado com a letalidade e lesão hepática induzido pelo CCl₄ em camundongos.

Palavras-chave: IL-33. ST2. Tetracloreto de carbono. Estresse oxidativo.

CARDOSO, Renato Daniel Ramalho. **IL-33/ST2 Mediates CCl₄ induced lethality and liver inflammatory damage in mice**. 2012. 60 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

ABSTRACT

IL-33 signals via ST2 receptor activating MAP kinases and NF-κB. IL-33 is a pleiotropic cytokine that depending on the environment it can stimulate directly or indirectly Th1, TH2, Th17 and innate (NK-T cells) lymphocytes. Recent data suggests that ST2 overexpression reduces warm ischemia/reperfusion-induced liver injury, and that it occurs, is increased expression of IL-33 and ST2 after CCl₄ administration. The aim of this study is investigate the participation and mechanisms triggered by IL-33 via ST2 in the lethality and hepatic injury induced by CCl₄ with emphasis on oxidative stress in mice. We used Balb/c (WT) and ST2/KO to conduct tests that evaluate oxidative stress, such as TRAP, measuring levels of lipid peroxidation, carbonylation of proteins and evaluating the activity of catalase and superoxide dismutase, was also analyzed survival to assess the lethality induced by CCl₄. Was observed reduction in lethality induced by CCl₄ in ST2/KO mice compared to WT. Concerning the mechanisms triggered by IL-33 in CCl₄ intoxication, ST2/KO mice presented higher total antioxidant capacity, resulting in less protein carbonylation and less lipid peroxidation, 6h after CCl₄ administration. Also was detected lower catalase and SOD catalase activity, lower concentration of GSH and lower levels of proinflammatory cytokines. Thus, the results suggest that IL-33 acting via the ST2 is an important cytokine for lethality and hepatic injury induced by CCl₄ in mice by mechanism related to increased oxidative stress. The mechanisms activated by IL-33 are related to oxidative stress, which is important in the context of intoxication with CCl₄, that which known to generate free radicals.

Keywords: ST2. IL-33. Carbon tetrachloride. Oxidative stress.

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
$1O_2^\bullet$	oxigênio singlet
AAPH	2'2- azobis(amidinopropano) diidrocloreto
abs	absorvência
AP-1	proteína ativadora 1
CCl_4	Tetracloroeto de Carbono
CYP2E1	Citrocomo P450 2E1
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
$FeCl_3$	cloreto férrico
g	gramas
GSH	glutathiona reduzida
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSH-Rd	glutathiona redutase
GSSG	glutathiona oxidada
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HO-1	heme oxigenase 1
HO_2^\bullet	radical hidroperoxila
IFN- γ	interferon gama
IL-1 β	interleucina 1-beta
IL-1	interleucina 1
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-18	interleucina 18
IL-33	interleucina 33
IL-8	interleucina 8 (quimiocina)
KCl	cloreto de potássio
L^\bullet	radical de ácido graxo

LO [•]	alcoxil
LOO [•]	peroxil
LPS	lipopolissacarídeo
MDA	malondialdeído
mg	10 ⁻³ gramas
min	minutos
mL	10 ⁻³ litro
mM	10 ⁻³ molar
NaCl	cloreto de sódio
NADP ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NF-κB	fator nuclear kappa-B
nM	10 ⁻⁶ molar
nm	10 ⁻⁹ metros
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
OH [•]	radical hidroxila
pH	potencial hidrogeniônico
QL	quimioluminescência
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	rotações por minuto
seg	segundos
SOD	superóxido dismutase
sST2	receptor solúvel para IL-33
ST2L	receptor de membrana para IL-33
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tri-cloro acético
TRAP	capacidade antioxidante total
T _{ind}	tempo de indução
TLR4	Receptor Toll 4
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
USOD	unidades de SOD
μL	10 ⁻⁶ litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	TETRACLORETO DE CARBONO:	10
1.1.1	Aspectos Gerais:	10
1.1.2	Toxicocinética:	10
1.1.3	Mecanismo de Toxicidade Hepática do CCl₄	11
1.2	RECEPTOR ST2:	11
1.2.1	IL-33\ST2	11
1.2.2	Sinalização da IL-33 via receptor ST2	13
1.2.3	ST2 e Th1	14
1.2.4	ST2 e Th2	14
1.2.5	Participação das citocinas na lesão hepática	15
1.3	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO:	16
1.3.1	Radicais Livres	16
1.3.2	Espécies Reativas de Oxigênio	16
1.3.3	Fontes de origem de Radicais Livres:	18
1.3.4	Sistemas antioxidantes:	19
1.3.5	Estresse Oxidativo:	22
1.4	FÍGADO:	25
1.4.1	Células de Kupffer:	25
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO E REAÇÃO INFLAMATÓRIA:	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVO	30
4	REFERÊNCIAS	31
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 TETRACLORETO DE CARBONO:

1.1.1 Aspectos Gerais:

O Tetracloreto de carbono é um composto orgânico com a fórmula química CCl_4 . Foi muito utilizado na química sintética como agente extintor, líquido para limpeza, agente pesticida e como agente refrigerante. Trata-se de um líquido incolor com um cheiro adocicado e característico (ROSSBERG *et al.*, 2007).

Segundo Recknagel (1989), o CCl_4 é um composto altamente tóxico que pode ser absorvido principalmente pela via pulmonar; via oral e via cutânea. Quando o CCl_4 é inalado, cerca de 30-40% fica acumulado temporariamente no tecido adiposo.

De acordo com o Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Porto- Portugal (2008), a hepatotoxicidade é o efeito preliminar resultante da exposição ao tetracloreto de carbono independentemente da via de absorção em seres humanos e animais. Danos no fígado são detectáveis em nível clínico por evidência de perda de consistência do órgão, alterações bioquímicas e alterações histológicas.

1.1.2 Toxicocinética:

A exposição a concentrações elevadas de CCl_4 tanto crônica ou aguda culmina na intoxicação pelo mesmo, podendo ocasionar danos irreversíveis em muitos órgãos e posteriormente levando a letalidade (LIU *et al.*, 1993).

Ao ingerir água ou alimentos contaminados com CCl_4 , aproximadamente 85-91% é absorvido, sendo distribuído em pouco tempo para os rins, fígado, medula óssea, cérebro, pulmões e músculo esquelético. Estudos em animais mostraram que de 34-75% do composto é excretado no ar expirado, 20-62% excretado nas fezes, e somente uma pequena quantidade é excretada na urina. Os estudos em animais também sugerem a necessidade de semanas para eliminar os resíduos de composto do organismo, especialmente daquele que se acumulou no tecido adiposo do corpo (MASUDA, 2006).

1.1.3 Mecanismo de Toxicidade Hepática do CCl₄:

A bioativação do CCl₄ faz-se por desalogenação redutiva dependente do citocromo P-450, e a enzima CYP2E1 é responsável pela metabolização do CCl₄. Estudos em camundongos deficientes para CYP2E1 (*cyp2e1^{-/-}*) demonstraram que a toxicidade hepática do CCl₄ nos camundongos é dependente de CYP2E1 (ROOD, 2001).

Muitos dados experimentais indicam que a primeira etapa da metabolização envolve a clivagem de uma ligação cloro - carbono no CCl₄ para gerar o íon cloreto e o radical triclorometil, que reage com oxigênio formando o triclorometilperoxil (KUMAR *et al.*, 2009).

Segundo Connor (1986), os radicais triclorometil e triclorometilperoxil formados são altamente reativos e podem submeter-se a diversas reações, como a ligação direta aos lipídeos de membrana, ligação a proteínas microssomais e ligação com outros compostos formando clorofórmio, hexacloroetano e monóxido de carbono. A peroxidação microssomal hepática danifica funções celulares, pois, desintegra a função das membranas, atua na desagregação poliribossomal, depressão da síntese de proteínas gerando deficiência na formação de lipoproteínas levando a um acúmulo de triglicérides no fígado e conseqüentemente esteatose, ruptura da membrana da célula e morte eventual do hepatócito (MURIEL, 1997).

Ao serem estabelecidas todas essas transformações, são notáveis os danos persistentes decorridos no fígado pela evidência, da perda da consistência do órgão, inchaço, alterações bioquímicas (perda de atividade enzimática e títulos elevados de enzimas hepáticas em nível sanguíneo) e alterações histológicas.

1.2 RECEPTOR ST2:

1.2.1 IL-33\ST2

A IL-33 é produzida como um propeptídeo de 30kDa (pró-IL-33), e assim como a IL-1 β e a IL-18 é clivada pela caspase-1 para que a forma madura seja gerada (IL-33 com 18kDa)(SCHIMTZ *et al.*, 2005). Todavia, estudos mais recentes demonstram que a caspase-1 também pode ser responsável pela degradação da IL-33 e essa ativação pode ocorrer de maneira dependente da

calpaína ou mesmo de maneira independente das caspases-1 e -8 ou calpaína (OHNO *et al.*, 2009).

Interessantemente, a pró-IL-33 é descrita como uma propeptídeo nuclear que exibe uma localização subcelular semelhante à forma precursora da IL-1 α (BAEKKEVOLD *et al.*, 2003). Assim como a IL-1 α , a pró-IL-33 nuclear parece exercer seu papel biológico independente da clivagem pela caspase-1 e independe da ligação com seu receptor de superfície celular (CARRIERE *et al.*, 2007).

Possivelmente, a IL-33 atua como a proteína de alta mobilidade HMGB-1, que está envolvida na regulação da transcrição, que é liberada por células necróticas funcionando como uma alarmina, secretada por macrófagos ativados durante a inflamação e atua como um citocina pró-inflamatória (CARRIERE *et al.*, 2007).

A IL-33 é expressa em diferentes tecidos como estômago, pulmão, medula espinal, cérebro, pele e tipos celulares como células dendríticas e macrófagos em situações basais em roedores e após estímulos com TNF- α e IL-1 β em humanos (SCHMITZ *et al.*, 2005).

Evidências recentes mostram que a IL-33 participa na maturação de mastócitos (ALLAKHVERDI *et al.*, 2007), bem como na sobrevivência, adesão e produção de citocinas por mastócitos (LIKURA *et al.*, 2007). Ainda regula a produção de citocinas por esplenócitos em modelo de asma em camundongos (HAYAKAWA *et al.*, 2007).

O gene *st2* codifica duas proteínas, uma forma que é ligada a membrana, denominada ST2L e uma forma solúvel, denominado sST2 (MORITZ *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1998; LIEW *et al.*, 2005).

O ST2L é proposto como um marcador de linfócitos Th2, que seriam ST2⁺ e ST2⁻, assim como outras moléculas de superfície utilizadas para definir subpopulações de linfócitos (XU *et al.*, 1998; COYLE *et al.*, 1999; TOWNSEND *et al.*, 2000).

A liberação de citocinas do padrão Th2 (IL-4 e IL-5) é inibida tanto pelo tratamento com anticorpo anti-ST2 como em animais deficientes para ST2. Os níveis de IL-10 e NO não foram alterados, sugerindo então, uma modulação direta ou aumento da atividade microbicida pelo aumento de NO (XU *et al.*, 1998; COYLE *et al.*, 1999; TOWNSEND *et al.*, 2000).

O receptor ST2L também é altamente expresso em mastócitos (MORITZ *et al.*, 1998) e também foi descrita sua expressão em células mesenquimais e epiteliais (BERGERS *et al.*, 1994; SANADA *et al.*, 2007) bem como fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos na estimulação da hipertrofia cardíaca.

A outra forma encontrada denominada de sST2 (solúvel) é obtida através do processamento de mRNA diferencial. O sST2 é idêntico a região extracelular do ST2L, exceto por 9 aminoácidos adicionais que estão presentes na parte terminal da molécula (sST2). O sST2 atua como um receptor antagônico para IL-33 (HAYAKAWA *et al.*, 2007).

A estimulação com LPS, TNF- α ou IL-1 em fibroblastos, macrófagos e monócitos induzem a expressão do mRNA de sST2 (CARRIERE *et al.*, 2007). O receptor sST2 atua na regulação da resposta inflamatória pela inibição da produção de citocinas como TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-12 e o tratamento de macrófagos com sST2 inibe a liberação de citocinas via receptor Toll-like 4 (IL-6, IL-12 e TNF- α) induzido por LPS (SWEET *et al.*, 2001).

As concentrações elevadas de sST2 são encontradas em pacientes com distúrbio nas quais se sobressai uma resposta Th2 anormal (lúpus eritematoso sistêmico e asma) ou em condições inflamatórias que são independentes de uma resposta Th2 (trauma e choque séptico) (TRAJKOVIC *et al.*, 2004; BRUNNER *et al.*, 2004).

Uma terceira variante de ST2 é encontrado em humanos, ST2V (possui uma cauda hidrofóbica em vez de terceiro domínio Ig em relação as outras formas) (AREND *et al.*, 2008).

1.2.2 Sinalização da IL-33 via receptor ST2

Para que a IL-33 module seu efeito biológico, necessita-se que a mesma se ligue com seu receptor específico seguido do co-receptor (IL-1RAcP), somente assim ocorrerá a sinalização intracelular (MEISEL *et al.*, 2001; BRINT *et al.*, 2002).

Diversos estudos tanto *in vitro* como *in vivo* identificam a IL-1RAcP como o co-receptor envolvido na via sinalizadora na qual a IL-33 medeia e atua (CHACKERIAN *et al.*, 2007; ALI *et al.*, 2007), não somente para IL-33, mas também para toda a família da IL-1.

A IL-33 é o agonista do receptor ST2, pois sua ligação ao ST2L induz a transdução de sinal pelo recrutamento de diferentes moléculas como MyD88, IRAK, IRAK4 e TRAF6, o que resulta na ativação de MAP quinases (p38, JNK e ERK) e NF κ B e consequente produção de citocinas (SCHIMTZ *et al.*, 2005). Não existem outros agonistas do receptor ST2L descritos até o momento.

1.2.3 ST2 e Th1

Sugere-se que a IL-33 atuando em seus receptores ST2L medeia a inflamação em modelo de artrite reumatóide e assim, o tratamento com sST2 sequestraria a IL-33 impedindo sua atividade pró-inflamatória. Corroborando com essa hipótese, Carriere *et al.*, (2007), detectaram a expressão de RNA mensageiro para IL-33 em amostras de tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. Dessa forma, existem evidências de que a IL-33 possa também mediar respostas Th1. Verri *et al.*, (2008) demonstraram a participação da IL-33 na dor em um modelo de artrite induzida por antígeno, corroborando com essas evidências, Smithgall *et al.*, (2008) demonstraram que o tratamento com IL-33 ativa células NKT, induzindo as mesmas a produzirem principalmente elevados níveis de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e TNF- α).

1.2.4 ST2 e Th2

A injeção de IL-33 em camundongos induz a expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 que leva a alteração patológica grave do pulmão e trato digestivo, sugerindo que a IL-33 via seu receptor ST2L medeia a produção de citocinas Th2 (CHACKERIAN *et al.*, 2007; SCHIMTZ *et al.*, 2005) e age como quimioatraente para células Th2 tanto *in vitro* como *in vivo* (KOMAI-KOMA *et al.*, 2007).

A IL-33 também promove sobrevivência e adesão de mastócitos e induz os mesmos a secretarem várias citocinas e quimiocina em humanos (LIKURA *et al.*, 2007; ALLAKHVERDI *et al.*, 2007). Os efeitos da IL-33 em mastócitos humanos e murinos ocorre sem induzir degranulação dos mesmos. Além da promoção de resposta Th2, observa-se que a IL-33 é uma potencial indutora de resposta inflamatória via ativação de mastócitos pela produção de uma série de mediadores (MOULIN *et al.*, 2007).

1.2.5 Participação das citocinas na lesão hepática

O fígado é um órgão de crucial importância para o organismo pelas inúmeras funções que o mesmo exerce, mas infelizmente está suscetível à lesões. A doença gordurosa do fígado ou esteatose é uma doença muito comum, que leva ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, e pode ocorrer por diversos fatores, como no uso exacerbado de algumas substâncias como álcool, drogas terapêuticas e até mesmo por alguns microorganismos.

Foi observado recentemente que a IL-33 é expressa constitutivamente no núcleo de células endoteliais em pequenos e grandes vasos sanguíneos de vários tecidos, incluindo o fígado humano (MOUSSION *et al.*, 2008)

Estudos recentes indicam que moléculas endógenas como hormônios e citocinas estão ligados ao desenvolvimento da esteatose, fibrose e morte celular (necrose) no fígado (DIEHL, 2000; JAESCHKE, 2004). A citocina TNF- α tem sido encontrada em altas concentrações em amostras clínicas de fígado e sangue de algumas doenças hepáticas como no caso da esteatose e necrose (YAMANO *et al.*, 2000).

Além do TNF- α , outras citocinas como a IL-18, IL-12 e IFN- γ são importantes para o desenvolvimento de lesão hepática (TANAKA *et al.*, 1996; TSUTSUI *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 1997).

Em modelo de fibrose hepática induzido pelo CCl₄ em ratos, demonstrou-se que a injeção da proteína de fusão ST2-FC aumenta a secreção de citocinas Th2 e aumenta o desenvolvimento de fibrose hepática (WYNN, 2004).

Alguns estudos sugerem que a progressão da fibrose hepática crônica é mediada por citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 (SANADA *et al.*, 2007; WYNN, 2004) bem como a síntese de colágeno (SUGIMOTO *et al.*, 2005) via IL-33 que é produzida principalmente por células endoteliais e células estreladas do fígado.

A IL-33 também induz a produção de IFN- γ por células NK, sugerindo sua participação na resposta imunológica inata (BOURGEOIS *et al.*, 2009). Assim, a IL-33 é uma citocina pleiotrópica e que induz a produção de citocinas como TNF- α e IFN- γ em diferentes condições. Considerando a importância do TNF- α e IFN- γ para a lesão hepática (esteatose e necrose) e que essas citocinas são induzidas pela IL-33, é possível que a IL-33 tenha um papel importante no

desenvolvimento de lesão hepática. Apesar de ser incerta, acredita-se que haja envolvimento da IL-33 na fibrose devido ao seu caráter pleiotrópico.

1.3 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO:

1.3.1 Radicais Livres

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica com um elétron desemparelhado. Este desemparelhamento confere a alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

São formados em reações de óxido-redução, podendo oxidar ou reduzir o elétron solitário, tendenciando a procurar o seu equilíbrio e, por isso, muitas vezes pode se ligar a moléculas biológicas eletronicamente estabilizadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

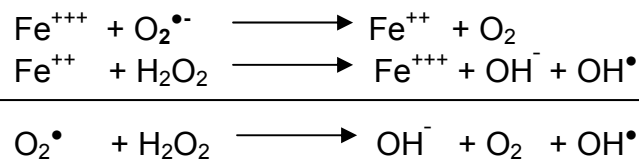
1.3.2 Espécies Reativas de Oxigênio

Os radicais livres na sua maioria são derivados do metabolismo do oxigênio e são encontrados em todos os sistemas biológicos. As espécies reativas do oxigênio (ERO) são:

- a) **Ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$):** gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como: xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . É permeável a membranas e produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos em um processo chamado “*burst* respiratório”, importante na eliminação de microorganismos patogênicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).
- b) **Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2):** intermediário formado pela reação de desmutação de $O_2^{\bullet-}$ catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), pela redução de 2 elétrons na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases *in vivo*. É um fraco

agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzido, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

- c) **Radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$):** É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma serie de biomoléculas, causando modificação no DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). O radical hidroxil pode ser formado também através de reações na presença de metais de transição (como o Fe^{++}) com o peróxido de hidrogênio, via reação de Fenton-Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989):



Mesmo com espectro limitado de ação, o radical hidroxil também causa danos a proteínas e inativação enzimática e peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- d) **Radical Hidroperoxila (HO_2^\bullet):** Representa a forma protonada do radical superóxido. Existem evidências de que o radical hidroperoxila é mais reativo que o superóxido por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Sua formação ocorre durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio (VASCONCELOS *et al.*, 2007).
- e) **Oxigênio Singlet ($^1\text{O}_2^\bullet$):** É a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O $^1\text{O}_2^\bullet$ tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Reage com um grande numero de moléculas biológicas, incluindo lipídeos de

membrana, iniciando processos de peroxidação (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

- f) **Ozônio (O₃):** produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

1.3.3 Fontes de origem de Radicais Livres:

Existem vários sistemas geradores de radicais livres, e fatores de ordem intrínseca e extrínseca. É notável que tais sistemas aumentam demasiadamente a produção de radicais livres no organismo (FREEMAN e CRAPO, 1982). As fontes intracelulares de radicais incluem:

- a) **Cadeia Respiratória Mitocondrial:** É considerado o início da cadeia de formação de radicais livres (DAS *et al.*, 1990). Uma das principais fontes de O₂^{•-}, é o escape de elétrons que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial das células aeróbias. Sabe-se que cerca de 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias geram O₂^{•-} (BOVERIS e CHANCE, 1972).
- b) **Fagocitose:** Os neutrófilos e os macrófagos são células que quando ativadas participam diretamente do processo inflamatório, desenvolvendo uma resposta imune contra antígenos, conseqüentemente, respondendo contra microorganismos, especialmente através da fagocitose, destruindo os microorganismos fagocitados, mediante ação de moléculas microbicidas produzidas endógenamente (ABBAS *et al.*, 2007). Tais células, quando ativadas convertem o oxigênio molecular em ERO, os quais são altamente reativos, e atuam diretamente na oxidação de algumas moléculas, as quais destroem os microorganismos e algumas outras células, podendo causar lesões estruturais locais (NAOUM, 2001). A produção de O₂^{•-} pelos neutrófilos e macrófagos ocorre através da redução univalente do O₂ na presença da NADPH, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase (“*burst*”

respiratório”) (FREEMAN e CRAPO, 1982). Além das ERO, os macrófagos produzem espécies reativas de nitrogênio (ERN), principalmente o óxido nítrico, pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Quando produzido, o NO pode se combinar com o peróxido de hidrogênio gerado no “burst respiratório”, para produzir radicais peroxinitrito que também atuam na eliminação de microorganismos (ABBAS *et al.*, 2007).

- c) **Sistema Xantina Oxidase:** Ocorre em qualquer situação que envolva isquemia e reperfusão, bem como no infarto do miocárdio, no qual há um aumento de xantina oxidase, que em contato com o oxigênio proveniente da reperfusão produz grande quantidade de íons superóxido desencadeando a formação de outros radicais livres (NAOUM, 2001).
- d) **Reações de Desintoxicações:** São reações que modificam bioquimicamente algumas drogas em compostos químicos através de grupos enzimáticos como as oxidases, redutases e hidrolases do citocromo P-450, porém, algumas vezes esses novos compostos formados são altamente reativos. (NAOUM, 2001).
- e) **Reações Ionizantes, Fotólise e Termólise:** Reações nas quais alteram o metabolismo celular, levando a formação de radicais livres (NAOUM, 2001).
- f) **Peroxissomas:** Potentes fontes de H₂O₂ celular por concentrar grande número de oxidases (MASTERS, 1977).

1.3.4 Sistemas antioxidantes:

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias que atuam diretamente em diferentes níveis de proteção nos organismos, principalmente pelo mecanismo de defesa contra os radicais livres impedindo a formação dos mesmos. Podem ser classificados como antioxidantes preventivos (glutathione peroxidase, catalase, SOD e carotenoides), antioxidantes sequestradores (vitamina C e E, ácido úrico e bilirrubinas) e antioxidantes de reparo (fosfolipases, proteases e transferases). Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados

pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos (proteínas), a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1995).

Muitos organismos de diferentes espécies possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, que reagem com os radicais livres protegendo as células e tecidos do estresse oxidativo e contra possíveis danos tissulares. O desempenho dos sistemas antioxidantes depende diretamente de alguns fatores, como dos tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais e principalmente da quantidade de radicais formados juntamente com uma possível depleção dos sistemas antioxidantes (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1995).

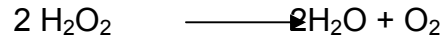
Segundo Naoum (2001), o controle no combate aos radicais livres é realizado por diferentes sistemas, como: 1- controle enzimático dos radicais em nível intracelular (SOD, CAT e GSH-Px); 2- controle hidrofóbico específico para evitar a peroxidação lipídica da membrana celular; 3- controle por protetores hidrofílicos que atuam contra produtos intermediários de radicais com características hidrofílicas; 4- controle por protetores estruturais que são constituídos por moléculas de colesterol que penetram na área hidrofóbica da membrana plasmática e se envolve com os fosfolipídeos, formando uma barreira entre o radical livre e a cadeia carbonada do ácido graxo.

1.3.4.1 Sistemas Antioxidantes Enzimáticos:

- a) **Superóxido dismutase (SOD):** As principais formas de superóxido dismutases encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol na forma dimérica e a MnSOD localizada na mitocôndria (VASCONCELOS *et al.*, 2007). É a primeira defesa contra o radical superóxido a qual catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 na presença de próton H^+ (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989).
- b) **Catalase (CAT):** encontrada principalmente nos hepatócitos e eritrócitos, mais precisamente nos peroxissomas, mitocôndrias e tecido cardíaco, é a principal enzima responsável pela

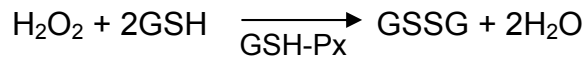
desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete) (VASCONCELOS *et al.*,2007).

É uma hemoproteína plasmática que catalisa a seguinte reação:

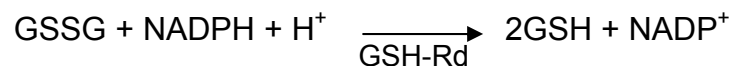


c) Sistema glutathiona peroxidase / glutathiona redutase (GSH-Px/GSH-Rd)

- A glutathiona peroxidase (GSH-Px), responsável pela detoxificação do H_2O_2 , possui menos especificidade para o substrato, sendo capaz de reduzir também hidroperóxidos a álcool. Nas duas reações catalisadas pela GSH-Px, a glutathiona reduzida (GSH) funciona como agente redutor, ou seja, doador de elétrons:



A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento tiol-SH, presente na cisteína (MATSUBARA e MACHADO,1991 *apud* OLIVEIRA, V.D.R.B., 1998). Quando a GSH é oxidada pela reação da GSH-Px, ocorre interligação de duas moléculas do tripeptídeo por uma ponte dissulfeto, dando origem à glutathiona oxidada (GSSG). A depleção dos níveis de GSH pode prejudicar as defesas celulares contra a ação tóxica dos radicais livres. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSG alta. Para isso, a GSSG formada é reduzida novamente a GSH, na presença de NADPH, pela ação da enzima glutathiona redutase (GSH-Rd) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989):



A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente de NADPH e, portanto, também depende da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd (MATSUBARA e MACHADO,1991 *apud* OLIVEIRA, V.D.R.B., 1998).

1.3.4.2 Sistemas Antioxidantes Não-Enzimáticos

Segundo Vasconcelos *et al.* (2007), a glutathiona exerce funções essenciais na célula, destacando-se pela função como cofator de enzimas como a GPx, desintoxicação de xenobióticos e de ERO. Outra molécula antioxidante não-enzimática é a coenzima Q, que possui papel central na cadeia respiratória mitocondrial, na cadeia de transporte de elétrons, participa na regulação da permeabilidade, diminui a oxidação de proteínas da membrana, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial. E a transferrina e a ceuroplasma que são potentes catalisadores de reações de auto-oxidação e decompõe peróxidos lipídicos a radicais peroxila e alcoxila.

O mesmo autor relata as propriedades antioxidantes de moléculas que são encontradas em uma dieta balanceada, como a vitamina E, composto antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas e a vitamina C que atua sobre as ERO e as ERN.

1.3.5 Estresse Oxidativo:

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta diretamente na indução de danos celulares pelos radicais livres denomina-se estresse oxidativo (SIES, 1993). A ocorrência de um estresse oxidativo é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas (ANDERSON, 1996).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (AMES *et al.*, 1993). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN *et al.*, 1998).

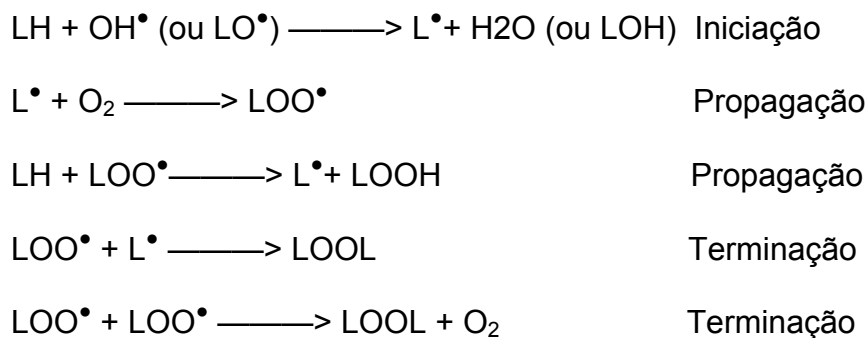
1.3.5.1 Peroxidação Lipídica:

As membranas biológicas são os componentes celulares mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, culminando em danos no DNA e morte celular precoce (MELLO *et al.*, 1983).

A peroxidação lipídica traz consequências homeostáticas severas para as membranas atacadas, que são refletidas, principalmente, na perda de sua integridade podendo resultar no rompimento estrutural ou celular (HALLIWELL e GUTERIDGE, 1989). Ocorre, assim, a liberação de enzimas hidrolíticas e a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), potencializando o dano celular iniciado por radicais livres (RHODEN *et al.*, 1998; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

É importante relatar que nem sempre os processos de lipoperoxidação são patogênicos. Por exemplo, a cicloxigenase produz a partir do ácido araquidônico, a prostaglandina H_2 que servirá de substrato para diferentes sintases para produção de prostaglandina E_2 , I_2 entre outras. A enzima cicloxigenase possui 2 sítios catalíticos, um cicloxigenase e outro peroxidase. O primeiro atua sobre o lipídeo ácido araquidônico formando a prostaglandina G_2 , que por sua vez sofre lipoperoxidação, formando a prostaglandina H_2 . As prostaglandinas possuem papéis fisiológicos e fisiopatológicos (KUMAR *et al.*, 2009).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídeo (GARDES-ALBERT *et al.*, 1991):



A reação acima inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet (radical alcóxila), com consequente formação do L^\bullet (radical

lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^\bullet (radical peroxila), que por sua vez, sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios. A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada propagação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro. O radical hidroxila ($^\bullet OH$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação (GUTTERIDGE, 1988).

Os radicais livres possuem meia-vida muito curta devido à sua alta reatividade. Assim, logo que produzidos, reagem no local ou próximo à fonte de sua geração. Desta forma, a produção de radicais livres, em geral, é mensurada por métodos indiretos, como medidas de vários produtos finais que resultam da interação dos mesmos com componentes da célula, como lipídeos, proteínas e DNA (HOLLEY e CHEESEMAN, 1996), pela alteração da capacidade antioxidante (REPETTO *et al.*, 1996) ou pela atividade de enzimas antioxidantes.

1.3.5.2 Carbonilação de Proteínas:

Enzimas e proteínas estruturais podem ser atacadas ao interagirem com radicais livres, por consequência, tais proteínas sofrem modificações oxidativas provenientes de algumas reações. Ao sofrer essas modificações oxidativas grupos carbonílicos (aldeídos e cetonas) são introduzidos em suas respectivas estruturas, fazendo com que as mesmas percam suas funções características (LEVINE *et al.*, 1994). Portanto quando tais grupos carbonílicos são detectados por alguns métodos, evidenciam eficientemente que em dada amostra ocorreu à oxidação de alguns grupos protéicos, sugerindo a ocorrência de processos de estresse oxidativo. (REZNICK *et al.*, 1992).

1.4 FÍGADO:

1.4.1 Células de Kupffer:

As células de Kupffer são encontradas na região periportal e nos espaços entre as células endoteliais adjacentes dos sinusóides hepáticos ou em sua superfície, formato estrelado irregular e projetam pseudópodes e microvilos para a luz dos sinusóides.

Possuem o citoplasma rico em organelas e vesículas fagocíticas, que podem conter fragmentos celulares proveniente de fagocitose e destruição de eritrócitos. Embora todos os macrófagos sejam derivados de células troncos da medula óssea, as células de Kupffer também podem propagar-se nos sinusóides hepáticos. No fígado murino, as células de Kupffer representam, em número, cerca de 15% do total (VRBA & MODRIANSKÝ, 2002).

As funções primárias das células de Kupffer são a fagocitose, processamento e digestão de material ingerido, apresentação de antígenos e secreção de produtos biologicamente ativos. Para estes fins, contêm receptores em sua superfície e sítios de ligação no citossol para ligantes específicos de partículas fagocitáveis e para muitas outras substâncias solúveis (ABBAS, 2007).

Macrófagos completamente ativos são caracterizados pela intensa secreção de proteinases e de TNF- α . A capacidade de apresentação de antígenos é diminuída se comparada aos macrófagos sensibilizados. As células de Kupffer ativadas produzem muitas classes de substâncias biologicamente ativas que atuam na destruição e remoção de bactérias, leveduras, parasitas, endotoxinas e células tumorais, na defesa contra vírus, na modulação das respostas imune e inflamatória, no remodelamento tecidual e da matriz, no controle das funções hepáticas, no metabolismo do ferro e da bilirrubina e na regulação da hematopoiese (VRBA & MODRIANSKÝ, 2002).

Existem cada vez mais evidências de que os macrófagos residentes (células de Kupffer) e os monócitos e neutrófilos recrutados podem causar danos ao fígado em vários processos patológicos, entre eles: isquemia-reperfusão, sepse, hepatite alcoólica, traumas remotos e choque hemorrágico. Além da sua capacidade de formação de ERO e de secreção de proteases, também liberam citocinas pró-

inflamatórias (por exemplo, o TNF- α) que podem induzir a formação de ERO nos hepatócitos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Uma das hipóteses de lesão celular mediada por estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. Entretanto, a oxidação lipídica que ocorre durante um processo inflamatório não é suficiente para causar lesão celular direta. Para destruir hepatócitos seletivamente pela oxidação lipídica, uma combinação de estresse oxidativo, mobilização de ferro e depleção de antioxidantes intracelulares seria necessária (NAOUM, 2001). Obviamente, outros fatores como a apoptose induzida pelo TNF- α também são importantes.

As ERO podem ainda induzir lesão e morte celular indiretamente, aumentando a expressão de genes pró-inflamatórios. Entre eles, as citocinas (TNF- α , IL-1), quimiocinas (IL-8) e moléculas de adesão celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A modulação e ativação de NF- κ B e da AP-1 parecem ser moduladas pelas ERO. Entretanto, o efeito do estresse oxidativo na ativação desses genes transcricionais é célula-específico e o mecanismo molecular pelo qual se modula esse processo é ainda controverso. Por exemplo no fígado, a produção de TNF- α pelas células de Kupffer é altamente sensível ao estado redox celular. Evidências indicam que a transcrição do gene do TNF- α nas células de Kupffer é aumentada pelo estresse oxidativo.

Os hepatócitos, com seus potentes sistemas antioxidantes, são menos susceptíveis ao estresse oxidativo que células não-parenquimatosas. Todavia, o TNF- α aumenta a formação de ERO de oxigênio em hepatócitos. A utilização de antioxidantes em modelos submetidos a estresse oxidativo, diminuiu a ativação do NF- κ B, a formação de citocinas e quimiocinas mediadas por TNF- α e a transcrição do gene da HO-1 em hepatócitos (JAESCHKE, 2000).

Estudos mais recentes têm reforçado a noção de que o fígado é um órgão bastante afetado pelas citocinas circulantes. De fato, a administração de TNF- α em camundongos leva a um quadro de falência hepática (NAGAKI *et al.*, 2000).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E REAÇÃO INFLAMATÓRIA:

Quando agente estranho invade o organismo, como bactérias, as células residentes são ativadas por receptores que reconhecem diferentes padrões estruturais relacionados aos patógenos, dentre os quais se destacam os receptores do tipo toll (TLR) e outros. No caso de bactérias gram-negativas, os receptores TLR4 são os responsáveis pelo reconhecimento do lipopolissacarídeo presente nessas bactérias. Os receptores TLR apresentam moléculas adaptadoras intracelulares (MyD88, MAL) que proporcionarão a ativação de quinases como a IRAK e TRAF, resultando, por exemplo, na fosforilação do I κ B. O I κ B é uma molécula que mantém inativado o fator de transcrição NF- κ B. Quando ativado, o NF- κ B pode migrar para o núcleo e regular a transcrição de genes para diferentes moléculas pró-inflamatórias como cicloxigenase-2, interleucinas e quimiocinas.

Além da indução de moléculas pró-inflamatórias, ocorre a ativação e liberação de, por exemplo, citocinas pré-formadas como IL-1 β e TNF- α , que ativam as células endoteliais que passam a expressar moléculas de adesão da família das selectinas (ABBAS *et al.*, 2007).

As selectinas promovem o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio vascular e a interação entre selectinas e os respectivos carboidratos presentes na membrana dos leucócitos induz a ativação das integrinas de maneira dependente de MAP quinases. Já as integrinas proporcionam a adesão firme ao endotélio e transmigração, dos leucócitos do meio intravascular para o foco inflamatório extra-vascular (ABBAS *et al.*, 2007).

No foco inflamatório, os macrófagos teciduais e neutrófilos recrutados, participam de maneira relevante nos processos inflamatórios, destacando-se pelas funções fagocíticas e consequente destruição do agente agressor. Estudos demonstram que quando células fagocíticas realizam a fagocitose, estimulam os seus respectivos metabolismos, tal estimulação culmina em um aumento do consumo de oxigênio (“*burst* respiratório”). Este processo ocorre devido à ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase, o qual oxida o NADPH proveniente da via das pentose-fosfato em NADP⁺ para que ocorra a redução do oxigênio em radical superóxido (O₂^{•-}) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Durante a inflamação, neutrófilos e macrófagos infiltram os tecidos e produzem o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes compostos são produzidos para atacar os microorganismos, porém, dependendo da intensidade do processo inflamatório também podem causar lesões celular e molecular aos tecidos do hospedeiro (TOSHIAKI e TAKETO, 1991).

2 JUSTIFICATIVA

Nos modelos de lesão hepática por intoxicação com o CCl_4 existe o envolvimento de radicais livres e algumas citocinas que intensificam a resposta inflamatória e lesiva, estudos evidenciam que a interação entre a IL-33 e o receptor ST2 possui participação na lesão hepática e que a inibição do receptor ST2 diminui a intensidade da resposta inflamatória.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da IL-33 via o receptor ST2 na letalidade e lesão hepática induzidas pelo CCl₄ em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a sobrevivência de camundongos com deficiência no receptor ST2 intoxicados com CCl₄, analisar a produção de citocinas envolvidas nesse modelo hepático, avaliar o estresse oxidativo e a capacidade antioxidante total.

4 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; POBER, J. S. **Imunologia Celular**. Editora Revinter, 2012.
- AEBI, H. **Catalase in vitro: Methods in Enzymology**. p. 121-126. 1984.
- AGAR, N. S. et al. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense. **J. Clin. Invest.** p. 319–321, 1986.
- ALI et al., IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. V.104, p.18660–18665, 2007.
- ALLAKHVERDI, Z.; SMITH, D. E.; COMEAU, M. R. The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. **J Immunol**, v.179, p. 2051–2054, 2007.
- AMATUCCI, A. et al. Recombinant ST2 boost hepatic Th2 response in vivo. **J Leukoc Biol**. v. 82, p.124-132, 2007.
- AMES, B. N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. USA: **Proc Natl Acad Sci**, p. 7915-22, 1993.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat Res**, 1996.
- AREND et al. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**. V. 223, p.20–38, 2008.
- BAEKVOLD E. S. et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. **Am J Pathol**. V.163, p.69–79, 2003.
- BERGERS et al., M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. **Embo J**. v.13, p.1176–1188, 1994.
- BEUTLER, E. Superoxide Dismutase. In: **Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods**. Philadelphia: Grune & Stratton, p. 83-85, 1984.
- BIANCHI, M .L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free Radicals and ten main dietary antioxidants. **Nut.**, 12: 110-18, 1999.

- BISWAS, T. et al. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. **Molec. and Cel. Biochem.** 146: 99-105, 1995.
- BOURGEOIS, E. et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. **European Journal Immunology**, 2009.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. Journal**, p. 707-716, 1972.
- BRINT EK, et al. Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. **J Biol Chem.** V.277, p.49205–49211, 2002.
- BRINT, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. **Natur Immunol**, p. 373–379, 2004.
- BRUNNER M, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. **Intensive Care Med.** V.30, p.1468–1473, 2004.
- BURT, A. D. Steatosis and steatohepatitis. **Current Diagnostic Pathology.** v.7, p.141-147, 2001.
- CARRIERE, V. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. USA: **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.104, p. 282-287, 2007.
- CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or o-phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. **Free Rad. Res .Commun.**, 10(4-5): 245-58, 1990.
- CHACKERIAN, A. A. et al. **Immunol.** v. 179, p.2551–2555, 2007.
- COHEN, G.; DEMBIEC, D.; MARCUS, J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. **Anal Biochemistry**, v.34, p. 30-8, 1970.
- CONNOR, H. D. et al. The formation of a novel free radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and in vivo. **J Biol Chem**, 1986.
- COYLE, A. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. **J Exp Med**, v.190, p. 895–902, 1999.
- DAS, D. K.; ESSMAN, W. E. Oxygen radicals systemic events and disease processes. **Kargers Publ.**, p. 196, 1990.

DIEHL, A.M. Cytokine regulation on liver injury and repair. **Immunol. Rev.**, p. 160–171, 2000.

FAGUNDES, C. T. et al. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. **J. Leukoc Biol.**, v. 81, p. 492-499, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, 1997.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease. **Lab. Invest.**, 47: p. 412-423, 1982.

GACTHER, T.; WERENSKIOLD, A. K.; KLEMENZ, R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. **J Biol Chem**, 271: p. 124–129, 1996.

GARDÈS, A. M.; JORE, D., FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In Membrane lipid oxidation. 1th ed. Santa Clara: **CRC Press**, p. 2-30, 1991.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In Oxygen radicals and tissue injury. **Proceedings of a Brook Lodge Symposium**; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, p. 9-19, 1988.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molec. aspects of medic.**, v.8, p.89-193, 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch. of Biochem. and Biophys.**, v.280, p.1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, p. 22-58, 1989.

HAYAKAWA, H.; KUME, A.; TOMINAGA, S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. **J Biol Chem**, v. 282, p. 26369–26380, 2007.

HOLLEY, A. E.; CHEESEMAN, K. H. Measuring free radical reactions in vivo. **Br Med Bull.** Jul, 49(3): p. 494-505, 1993.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, p. 718 – 724 , 2000.

KOMAI-KOMA et al. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. **Eur J Immunol.** v.37, p.2779–2786, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS A. K.; FAUSTO N.; ASTER J. **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.** Elsevier 8th edition, 2009.

LEUNG, B. P. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. **J Immunol**, v.173, n.01, p.145–150, 2004.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev Brás Nutr Clin.** v.18, p.87-94, 2003.

LEVINE, R. L. et al. “Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins”, **Methods of Enzimology.** London: Lester Packer, p. 346-365, 1994.

LIEW, F. Y. Negative regulation of toll-like receptormediated immune responses. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.6, p.446–458, 2005.

LIKURA, M. et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. **Lab Invest**, v. 87, n.10, p. 971–978, 2007.

LIU, K. X. et al. Decrease in the hepatic clearance of hepatocyte growth factor in carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Hepatology**, v.4, p. 651–60, 1993.

MARVIE, P. et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. **J. Cell Mol Med.** 2009.

MASTERS, C.; HOLMES, R. Peroxisomes: New aspects of cell physiology and biochemistry. **Physiol. Rev.**, v. 57, p.816, 1977.

MASUDA, Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v.10, p. 885–899, 2006.

MATSUBARA, L. S.; MACHADO, P. E. A. Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. Brazilian: **J. Med. Biol. Res.**, v.4, p.449-454, 1991.

MATSUI, K. et al. Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type1 T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from kupffer cells. **J Immunol**, p. 97–106, 1997.

MATSUMOTO, Y. et al. Effect of FR167653, a novel inhibitor of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synthesis on lipopolysaccharide-induced hepatic microvascular dysfunction in mice. **Shock** 17: 411-415, 2002.

MATTEONI, C. A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. Jun, 116(6):1413-9, 1999.

MEISEL C, et al. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD41T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. **J Immunol**. V.166, p.3143–3150, 2001.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell Killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intra cellular iron. **Biochem J**, 218: 273-5, 1983.

MORITZ, D. R. et al. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. **J. Immunol.**, v. 161, n.09, p. 4866-4874, 1998.

MOULIN et al. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. **Cytokine**. v.40, p.216–225, 2007.

MOUSSION C, et al. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel alarmin? **PLoS ONE**. v.3, p. 3331, 2008..

MURIEL, P. Peroxidation of lipids and liver damage. In **Antioxidants, Oxidants, and Free radicals**./Taylor and Francis. Washington: DC, p. 237, 1997.

MURIEL, P.; MOURELLE, M. Prevention by sylimarin of membrane /alterations in acute CCl4 liver damage. **Journal of Applied //Toxicology** 10, p. 275-279, 1990.

NAGAKI, M. et al. Tumor necrosis factor α prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor-kB. **Hepatology** 32: p. 1273-1279, 2000.

NAOUM, P. C. **Radicais livres e danos eritrocitários**. **Laes & Haes**, v. 22, n. 129, p. 150-172, 2001.

OHNO, T. Et al. Caspase-1, Caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. **J. Immunol**. 2009.

ORG, D. C.; SCHAICH, K. M. Iron and iron-derived radicals. In Oxygen radicals and tissue injury. **Proceedings of a Brook Lodge Symposium**; 1987 Apr 27-29. Bethesda (MLD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 20-6, 1988.

POULSEN, H. E. Does vitamin C have a pro-oxidant effect? **Nature**. Sep 17; 395(6699):231-2, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6 ed. Ed.Guanabara Koogan, 2007.

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanism of Carbon-tetrachloride Toxicity. **Pharmacology Therapeutics**, v.43, p.139–154, 1989.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, 255: p. 107-117, 1996.

REZNICK, A. Z. et al. Biochem. Biophys. **Res. Commun.** P.189 - 801, 1992.

RHODEN, E. L. et al. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, vol.13, no.2. ISSN 0102-8650, Apr./May/June 1998.

ROOD, A. S. et al. Stochastic estimates of exposure and cancer risk from carbon tetrachloride released to the air from the Rocky Flats Plant. **Risk Analysis**. V.4, p. 675–695, 2001.

ROSSBERG, M. et al., “Chlorinated Hydrocarbons” in **Ullmann’s Encyclopedia of Chemical Technology**. New York : John Wiley & Sons, 2007.

SANADA, S et al., IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. **J Clin Invest**. v.117, p.1538–1549,2007.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v.23, n.05, p.479–490, 2005.

SERVIÇO DE TOXICOLOGIA. **Poluentes Ambientais, Industriais, e Ocupacionais**. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal, 2008, atualizado em 22 de novembro de 2011.

SIES H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem.**, Jul 5;215(2): p. 213-9, 1993.

SMITHGALL, M. D. et al. IL-33 amplifies both Th1 and Th2 response through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. **Int. Immunol.** v.8, p.1019-30, 2008.

SUGIMOTO, R et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. **Liver Int.** v.25, p.420-8, 2005.

- SWEET, M. J. et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. **J Immunol**, v.166, n.11, p.6633–6639, 2001.
- TANAKA, Y. TAKAHASHI, A. WATANABE, K. et al. A pivotal role of IL-12 in Th-1 dependent mouse liver injury. **Int Immunol**, 8:5 p. 69–76, 1996.
- TOSHIKI, M.; TAKETO, O. Lipid peroxidation of the erythrocyte membrane caused by stimulated polymorphonuclear leukocytes in the presence of ferritin. **Chem. Pharm. Bull.**, v.39, p.1507-1509, 1991.
- TOWNSEND, M. J. et al. T1\ST2- deficient mice demonstrate the importance of T1\ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. **J Exp Med.**, v. 191, n.06, p.1069-1076, 2000.
- TRAJKOVIC et al., T1/ST2 – an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. **Cytokine Growth Factor**. V.15, p.87–95, 2004.
- TSUTSUI, H. et al. IL-18 accounts for both TNF- α -and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. **J Immunol** 1997;159: p. 3961–3967, 1997.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**. V.30, p. 1323-1338, 2007.
- VERRI, W. A. Jr. et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. USA : **Proc. Natl. Acad. Sci.** 105: p.2723-2728, 2008.
- VRBA, J.; MODRIANSKÝ, M. Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment. **Biomed. Papers**, 146(2), p.15–20, 2002.
- WYNN T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. **Nat Rev Immunol**. V.4, p.583-94, 2004.
- XU, D. et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. **J Exp Med**, v.188, n.08, p.1485–1492, 1998.
- XU, D. et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. **J Exp Med**, v.187, n.05, p.787–794, 1998.
- YAMANO, T. et al. Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. **Clin Exp Immunol.**, November; 122(2): p. 227–231, 2000.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Este é um trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor com colaboração do Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres da Universidade Estadual de Londrina, formado pelo artigo científico: **IL-33/ST2 mediates CCl₄ induced lethality and liver oxidative damage in mice.**

As formatações do artigo seguem as normas da revista *Liver International*.

IL-33/ST2 signaling mediates CCl₄ induced lethality and liver inflammatory damage in mice

Renato D. R. Cardoso¹; Victor Fattori¹; Flávia A. Guarnier¹; Rubens Cecchini¹; Rubia Casagrande²; Jose C. Alves-Filho³; Damo Xu⁴; Foo Y. Liew⁴; Fernando Q. Cunha³; Waldiceu A. Verri, Jr¹.

¹Departamento de Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil. ²Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências de Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil, ³Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil, ⁴Division of Immunology, Infection and Inflammation, University of Glasgow, 120, University Place, Glasgow G12 8TA, UK.

Running title: Role of IL-33/ST2 in liver inflammatory damage

Corresponding author: Waldiceu A. Verri Jr, PhD

Waldiceu A. Verri Jr, Fax: +55 43 3371 4387, Tel: +55 43 3371 4979. E-mail:

waverri@uel.br or waldiceujr@yahoo.com.br. Departamento de Ciências Patológicas -

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil.

ABSTRACT

Background: IL-33 signals via ST2 receptor activating intracellular signaling and cytokine production. It is a pleiotropic cytokine that is involved in innate and adaptive inflammation. It has been shown that carbon tetrachloride (CCl₄) induces IL-33 and ST2 expression in the liver. **Aim:** Herein it was investigated the role of IL-33/ST2 in the lethality and hepatic injury induced by CCl₄ with emphasis on oxidative stress and cytokine production in mice. **Methods:** Balb/c (WT) and ST2 deficient (^{-/-}) mice received CCl₄ or vehicle followed by evaluation of lethality ratio and oxidative stress and cytokine production in the liver. **Results:** CCl₄-induced 100% lethality in WT mice within 18h. ST2^{-/-} presented extended survival with maximal 70% lethality. Corroborating a role for IL-33/ST2 in CCl₄ model, CCl₄ induced significant production of IL-33 and ST2 compared to vehicle group. This increased survival of ST2^{-/-} mice was accompanied by reduced TNF α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ and IL-5 production, reduced protein carbonylation and lipid peroxidation, and increased total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity. **Conclusion:** CCl₄-induced lethality and liver injury depends on IL-33/ST2 activation, which triggers cytokine production and oxidative stress. Further studies might determine the importance of targeting IL-33/ST2 signaling in other models of liver injury and liver diseases.

Keywords: IL-33, ST2, carbon tetrachloride, hepatitis, oxidative stress.

INTRODUCTION

The interleukin 1 (IL-1) family of cytokines includes 11 members classified systematically as IL-1F1 to IL-1F11 (1). IL-33 is the latest member of the family and is also known as IL-1F11 (1,2). IL-33 is structurally related to IL-1 β and IL-18 and was found to have strong biological relevance in immune and inflammatory reactions (2). Furthermore, the conversion of pro-IL-1 β and pro-IL-18 to active forms depends on caspase-1 processing. On the other hand, pro-IL-33 processing is not consensus (3).

IL-33 was initially described as a Th2 cytokine because its injection induces IL-5 and IL-13 production by polarised Th2 cells (2). Nevertheless, it is clear now that it is rather a pleiotropic cytokine that mediates Th1, Th2 and Th17 responses (2,4,5). IL-33 signals via a heterodimeric receptor constituted by a α -chain ST2 and a β -chain IL-1RAcP (6,7) and triggers the activation of NF κ B, MAP kinases p38, ERK1/2, JNK1/2 in mast cells (2) and T cells (8). There are two isoforms of the ST2 protein encoded by the *st2* gene and resultant alternative gene splicing: ST2L, a transmembrane form, and soluble ST2 (sST2) (9) a secreted form which can serve as a decoy receptor for IL-33 (2,10) ST2RL is preferentially expressed on a subset of Th2 cells but not Th1 cells (11,12) and can profoundly modulate innate and adaptive immunity (3,13). ST2 is also expressed on mast cells, macrophages and fibroblasts (2). Soluble ST2 is a potent inhibitor of collagen-induced arthritis (CIA) in mice (10), suggesting that IL-33– ST2 signalling is a key pathway in the context of rheumatoid arthritis (RA). ST2 deficiency results in reduced TNF α , IL-1 β , IL-12 and IFN- γ production (4,10). IL-33 can also induce IFN- γ production by Th1 lymphocytes, invariant natural killer-like T (NKT) and natural killer (NK) cells (14).

It has been shown that ST2 deficient mice developed more severe concavalin A-induced hepatitis with higher number of mononuclear cells and macrophages in the liver, circulating cytokine (TNF α and IFN- γ) levels and reduced number of regulatory T cells

(Tregs). Additionally, treatment of wild type mice with IL-33 attenuated the liver injury and milder infiltration of mononuclear cells, increase in total number of liver Tregs. Therefore, in concavalin A-induced hepatitis, IL-33 treatment has beneficial effects as well as disrupting IL-33/ST2 signaling has detrimental effects (15). In the concavalin A and carbon tetrachloride (CCl₄) models of hepatitis, there is elevation of IL-33 mRNA expression, which depends on NKTcells stimulation of hepatocytes to produce IL-33 (16) suggesting that in both models it could be observed the same outcome. In fact, the treatment with ST2-Fc booted CCl₄-induced hepatic fibrosis with increased Th2 cytokine production also indicating that targeting IL-33/ST2 signaling has detrimental effects (17).

The hepatic toxicity induced by CCl₄ depends on the cleavage of bond chore-carbon to generate the trichloromethyl radical and chloride ion, which reacts with oxygen to form the trichloromethylperoxil that interact with liver cell inducing tissue lesions (18). This biotransformation is catalyzed by cytochrome P-450, specifically CYP2E1 (18). The trichloromethyl radical and chloride ion are highly reactive and can undergo various reactions, such as connecting directly to membrane lipids, protein binding and microsomal binding with other compounds to form chloroform and carbon monoxide (19). The liver microssomal peroxidation causes damages cellular functions, because the function of the membrane disintegrates, acts in polyribosome breakdown, depression of protein synthesis resulting in deficiency of lipoproteins formation leading to an accumulation of triglycerides in the liver steatosis and consequently disruption of the cell membrane and eventual death of the hepatocyte (20).

Considering the evidence mentioned above, this study aimed to confirm whether disrupting IL-33/ST2 signaling has a detrimental role in hepatitis induced by CCl₄

intoxication and the mechanisms triggered by IL-33/ST2 signaling focusing on cytokine production and oxidative stress in the liver.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals: The experiments were performed in Balb/c (WT) and ST2 deficient (^{-/-}) male mice of 20-25g from the Animal Facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo. Mice were maintained in the Animal Facility of the Departamento de Ciências Patológicas of Universidade Estadual de Londrina for at least 72h before experiments in light/dark cycle (12/12 h) with water and food *ad libitum* in a 25°C temperature-controlled room. Animals care and handling procedures were performed with the approval of the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina, process number 8127/2009.

Carbon Tetrachloride (CCl₄) model: Mice received intraperitoneal (i.p.) injection of 100 µL of CCl₄ solution diluted in corn oil (1:3) or vehicle per 10g of body weight (21). **Survival:** Survival was evaluated during 48 hours at 6 hours intervals. **Tissue preparation:** Animals were euthanized after 6 hours of administration with CCl₄ or vehicle, and the abdominal and thoracic cavities was opening, the superior vena cava was cannulated and the liver was perfused with cold KCl solution (1.15%) to remove blood. The right liver lobe was removed, fragmented and stored in -86°C freezer. Samples was homogenized in a proportion of 200 mg of liver tissue in 10 ml of Potassium phosphate monobasic buffer (10 mM), centrifuged at 2600 rpm for 10 minutes at 4°C and centrifuged again at 11000 rpm for 15 minutes at 4°C and used to oxidative stress analyses and immunological evaluations.

Determination of cytokine levels: Cytokine levels were measured in liver homogenates 6h after i.p. injection of vehicle or CCl₄. ST2, IL-33, TNF α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ and IL-5 levels were determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems or eBioscience). The results are expressed as pg/100 mg of tissue.

Measurement of Reduced Glutathione: The total reduced glutathione (GSH) content was measured using the method described by Sedlak and Lindsey (22). Briefly, in this reaction we used TRIS-HCl 0.4M pH 8.9, EDTA 0.02M, GSH standard, and DTNB for the standard curve, and to measure GSH levels in the liver samples the same reagents, except GSH standard, were used.

Catalase activity: Liver catalase activity was determined as described by Aebi (23). In quartz cuvettes containing 1.5 mL of Tris buffer 1M HCl and 0.2 mL of deionized water, and hydrogen peroxide, enzyme kinetics was spectrophotometrically followed at 240 nm. The reaction started with addition of 0.1 mL of hydrogen peroxide, and catalase absorption velocity was calculated by the difference in absorbance at 60 and 180 seconds. Results were expressed as absorption velocity in one mL of tissue homogenate per mg of total protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity: Superoxide-dismutase activity in liver samples was determined by the inhibition of pyrogallol as described by Beutler (24). Enzyme kinetics was spectrophotometrically at 420 nm and the oxidation was accompanied by yellow color formation. The auto-oxidation of pyrogallol was used as control, a unit of the enzyme (U) is defined as the amount of the enzyme that inhibits the reaction by 50%. The results were expressed as U per mg of total protein.

Measurement of the total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP):

Total antioxidant capacity was evaluated by chemiluminescence (CL) as previously described by Repetto et al. (25). The reaction containing 20 μM 2-azo-bis-(2-amidinopropane), 200 μM luminol, 0.7 μM trolox or 70 μL of tissue supernatant. The total quenching time of the samples were compared with trolox quenching, and the results were expressed in μM trolox.

Carbonyl protein content: The quantification of carbonyl protein was adapted from Reznick & Packer (26). In brief, 0.5 mL of homogenate supernatant was added in glass tubes, then 2 mL of 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution prepared in 2.5 N HCl was added to each tube, and the reaction mixtures were incubated in ice during an hour, and mixed with vortex every 15 min. Next, the samples were washed with 2.5 mL of 20% TCA (trichloroacetic acid, w/v) and centrifuged for 10 min to collect the protein precipitates. Samples were washed again using 10% TCA, and protein pellets were dispersed mechanically. Finally, the pellets were washed 3 times with 2 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1, v/v) to remove free DNPH and lipid contaminants. The final precipitates were dissolved in 2 mL of 0.6 M guanidine hydrochloride, and any insoluble materials were removed by additional centrifugation. The spectrophotometric reading was performed at the range 355-390 nm and the peak was considered to calculate the carbonyl content. Samples containing DNPH were read versus samples treated with only 2.5 M HCl. The formula used to calculate carbonyl contents was: $C = \text{Abs (355-390nm)} \times 45.45 \text{ nmol/mL (absorption coefficient)}$. The results were expressed in nmol per mg of total protein.

Measurement of tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence: The experiment was conducted in 2-mL luminescence tubes containing total liver homogenate (20 mg/mL), 30 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (with 120 mM KCl, pH 7.4), and 3 mM tert-butyl

hydroperoxide, the final volume was 1 mL and room temperature was 28°C. Up to the time of analysis, the tubes were kept in the dark, and the reaction was assessed in a TD/20 20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA), with a response range of 300-650 nm (27). For each sample, a kinetic capture of chemiluminescence was performed during 40 min, linearization of the data and correction per gram of tissue was done. Results were expressed in relative light units per gram of tissue (RLU/g tissue). The entire curve was used to determine the lipid hydroperoxides present in the sample.

Measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS): The lipid peroxidation of liver homogenates of all groups was determined by TBARS reaction. In the TBARS assay, the malondialdehyde (MDA) formed during lipid peroxidation reacts and forms a colored product, a (TBA)₂-MDA adduct. In acid solution, (TBA)₂-MDA absorbs light at 532 nm, and is readily extractable into organic solvent such as butan-1-ol. TBARS levels was measured as described by Slater (28) and expressed as nmol/100 mg tissue.

Measurement of total protein: The total protein content was measured using the method described by Lowry (29) and modified by Miller (30).

Statistical analysis: Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 4.0 (La Jolla, 5 CA). Results are presented as means ± SEM of 2 independent experiments. The “n” in the legends refers to the number of mice per group in each experiment. Survival rates were estimated by the Kaplan–Meier method, and statistical analysis was carried out by the log-rank test to test for equality of the survival curves. The differences between the experimental groups were compared by one-way ANOVA and individual comparisons were subsequently made by Tukey’s post hoc test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

CCl₄-induced lethality was reduced in ST2 deficient mice

Corn oil (vehicle) did not alter the survival of animals WT and ST2^{-/-}. CCl₄ induced 100% of lethality within 18h in WT mice. On the other hand, CCl₄-induced only 20% lethality in ST2^{-/-} mice within 18h, which increased up to 70% lethality at 42h remaining until 48h (Fig. 1). Therefore, impaired IL-33/ST2 signaling increased the survival compared to WT mice in CCl₄ model. Corroborating a role for IL-33/ST2 in CCl₄ model, it was observed a significant increase of IL-33 (Fig. 2A) and ST2 (Fig. 2B) production 6 h after CCl₄ administration).

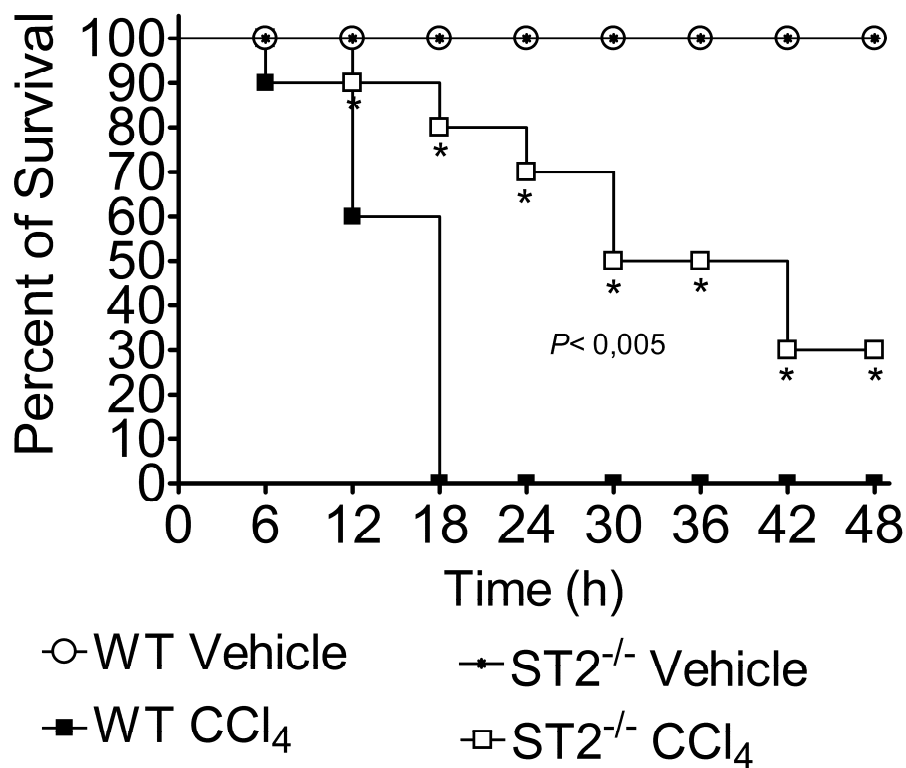


Figure 1: CCl₄-induced lethality was reduced in ST2 deficient mice. Balb/c and ST2^{-/-} mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). The lethality induced by CCl₄ was monitored at 6h intervals during 48 h. Data present mean ± SEM, n=10, representative of two independent experiments. **p*< 0.005 ST2 CCl₄ compared to WT CCl₄. Kaplan–Meier method, followed by the log-rank test.

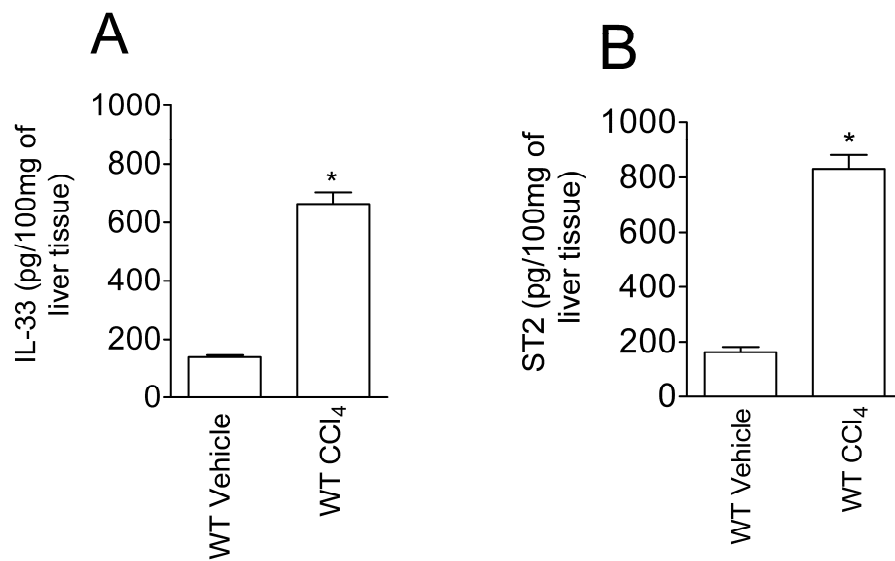


Figure 2: CCl₄ induces IL-33 and ST2 production in the liver. Balb/c (WT) mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). After 6h, samples of liver were collected for IL-33 (panel A) and ST2 (panel B) levels determination by ELISA. n = 5, representative of two independent experiments. *p < 0.05 compared to vehicle. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Reduced CCl₄-induced cytokine production in ST2^{-/-} mice

Mice were treated with CCl₄ or vehicle and after 6h were sacrificed for liver sample collection. CCl₄ induced significant increase of cytokine production in the liver compared to vehicle (Fig. 3). It was evaluated the production of proinflammatory cytokines such as TNF-α (Fig. 3A) and IL-1β (Fig. 3B), Th1/innate immunity cytokines such as IL-12 (Fig. 3C) and IFN-γ (Fig. 3D) and Th2 cytokine such as IL-5 (Fig. 3E). Thus, ST2 gene deficiency decreases the production of proinflammatory cytokines upon CCl₄ stimulus. There was no difference in cytokine levels between vehicle treated WT and ST2^{-/-} mice (Fig. 3).

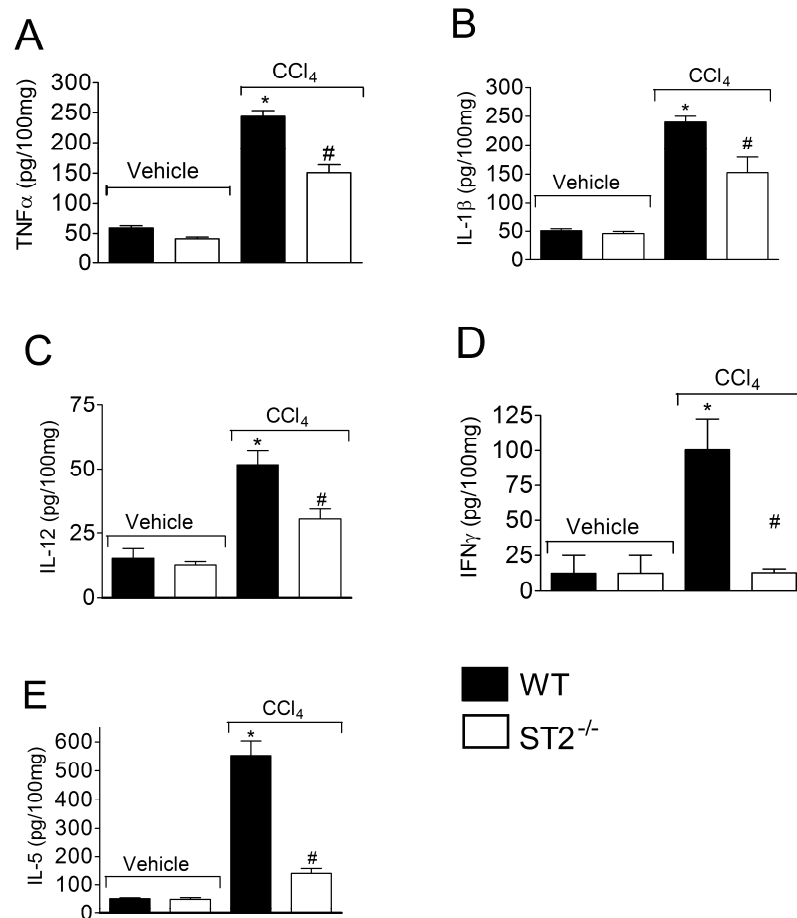


Figure 3: Reduced CCl₄-induced cytokine production in ST2^{-/-} mice. Mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). After 6h, samples of liver were collected to determine TNFα (A), IL-1β (B), IL-12 (C), IFN-γ (D) and IL-5 (E) levels by ELISA. n = 5, representative of two separated experiments. **p* < 0.05 compared to WT vehicle, #*p* < 0.001 compared to WT CCl₄. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Impact of ST2 deficiency in the modulation of SOD and catalase activity, and GSH levels by CCl₄.

Mice were treated with CCl₄ or vehicle and after 6h were sacrificed for liver sample collection. CCl₄ induced significant decrease of SOD activity without differences between WT and ST2^{-/-} mice (Fig. 4A). On the other hand, CCl₄ did not induce significant increase of catalase activity in WT mice, but there was significant increase of catalase activity in ST2^{-/-} mice that received CCl₄ (Fig. 4B). The GSH levels were reduced in ST2^{-/-} mice compared to vehicle WT and CCl₄ WT mice, indicating a pre-existing reduced levels of GSH. This also reflected in reduced GSH levels in ST2^{-/-} mice that received CCl₄ (Fig. 4C).

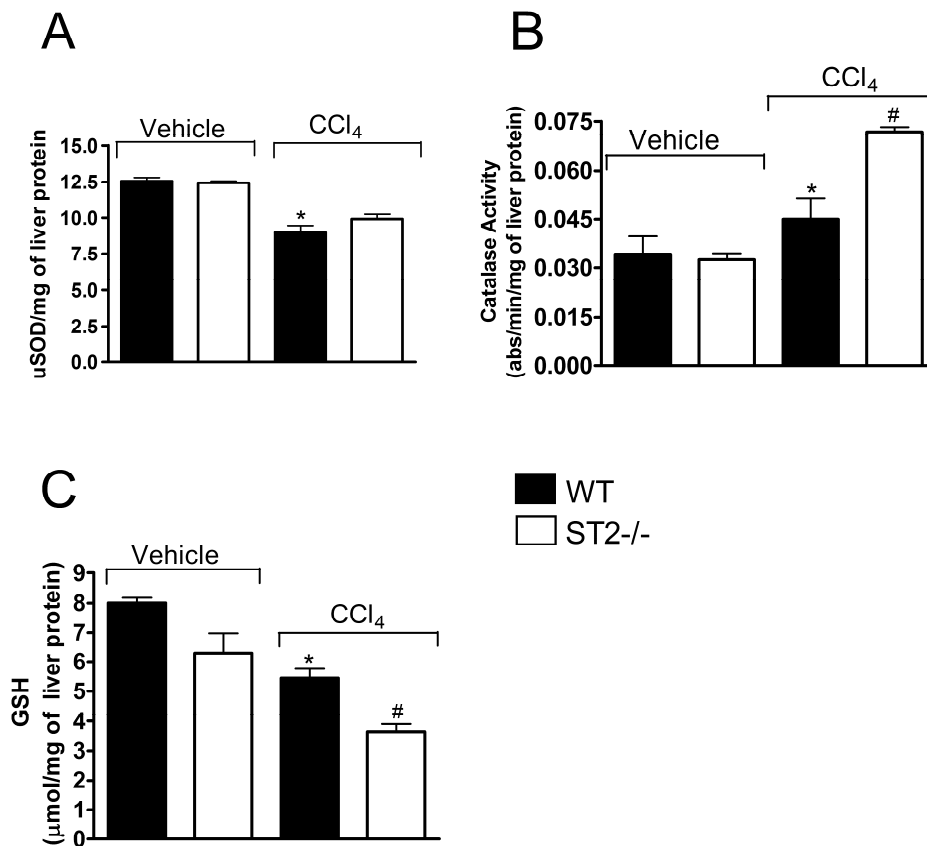


Figure 4: Impact of ST2 deficiency in the modulation of SOD and catalase activity and GSH levels by CCl₄. Mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). After 6h, samples of liver were collected to determine superoxide dismutase (SOD) and catalase activity, and GSH levels. n = 5, representative of two separated experiments. n= 5, representative of two separated experiments. *p< 0.05 compared to WT Vehicle. #p< 0.05 compared to WT CCl₄. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

ST2^{-/-} presents higher total antioxidant capacity after CCl₄ challenge.

Mice were treated with CCl₄ or vehicle and after 6h were sacrificed for liver sample collection. CCl₄ induced significant increase of Trap in CCl₄ WT compared to vehicle treated WT mice. There was also an increase of Trap in CCl₄ ST2^{-/-} mice compared to CCl₄ WT mice (Fig. 5). Thus, demonstrating that there is an even greater increase of antioxidant defenses in ST2^{-/-} mice after CCl₄ stimulus compared to WT mice.

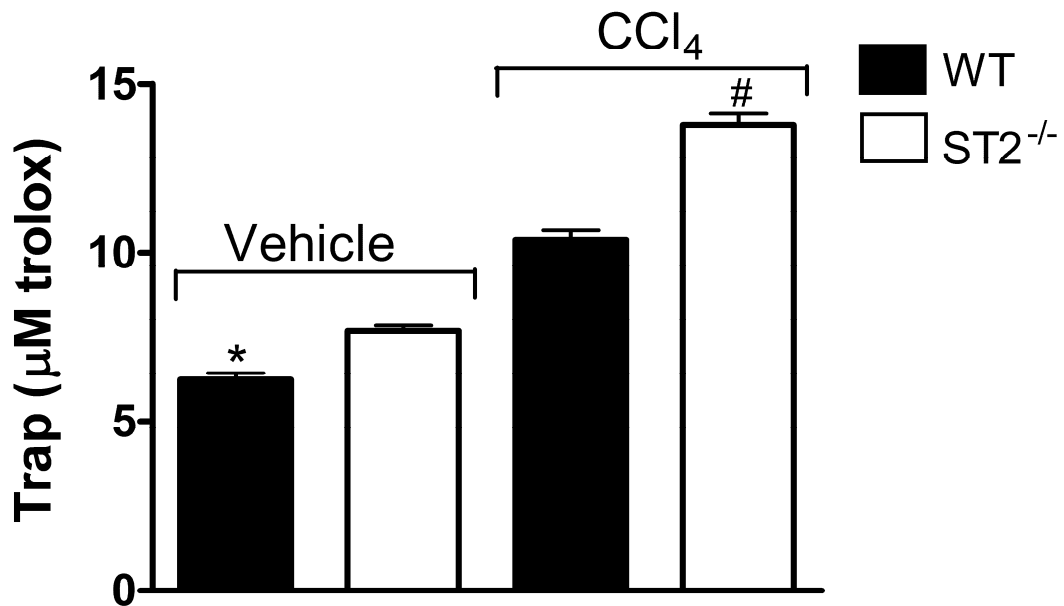


Figure 5: ST2^{-/-} presents higher total antioxidant capacity after CCl₄ challenge. Mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). After 6h, samples of liver were collected to determine the total antioxidant capacity (TRAP). n=5, representative of two separated experiments. n = 5, representative of two separated experiments. *p< 0.05 compared to WT CCl₄. #p< 0.05 compared to WT CCl₄. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Reduced CCl₄-induced lipid peroxidation and carbonyl proteins in ST2^{-/-} mice

Mice were treated with CCl₄ or vehicle and after 6h were sacrificed for liver sample collection. CCl₄ induced significant increase of carbonyl protein compared to vehicle (Fig. 6A). ST2^{-/-} mice that received CCl₄ or vehicle presented reduced carbonyl proteins compared to CCl₄ WT group (Fig. 6A). The same profile was observed on the detection of thiobarbituric acid reactive species, including MDA (Fig. 6B). In the detection of lipid peroxidation by chemiluminescence method, CCl₄ induced a significant increase of lipid peroxidation between 2-10 minutes, returning to control levels after 12 minutes in WT mice. The CCl₄-induced lipid peroxidation was reduced in ST2^{-/-} between 3-9 min mice (Fig. 6C). There was no difference between WT and ST2^{-/-} mice that received saline demonstrating that there is no background deficiency that would affect the present results (data not shown).

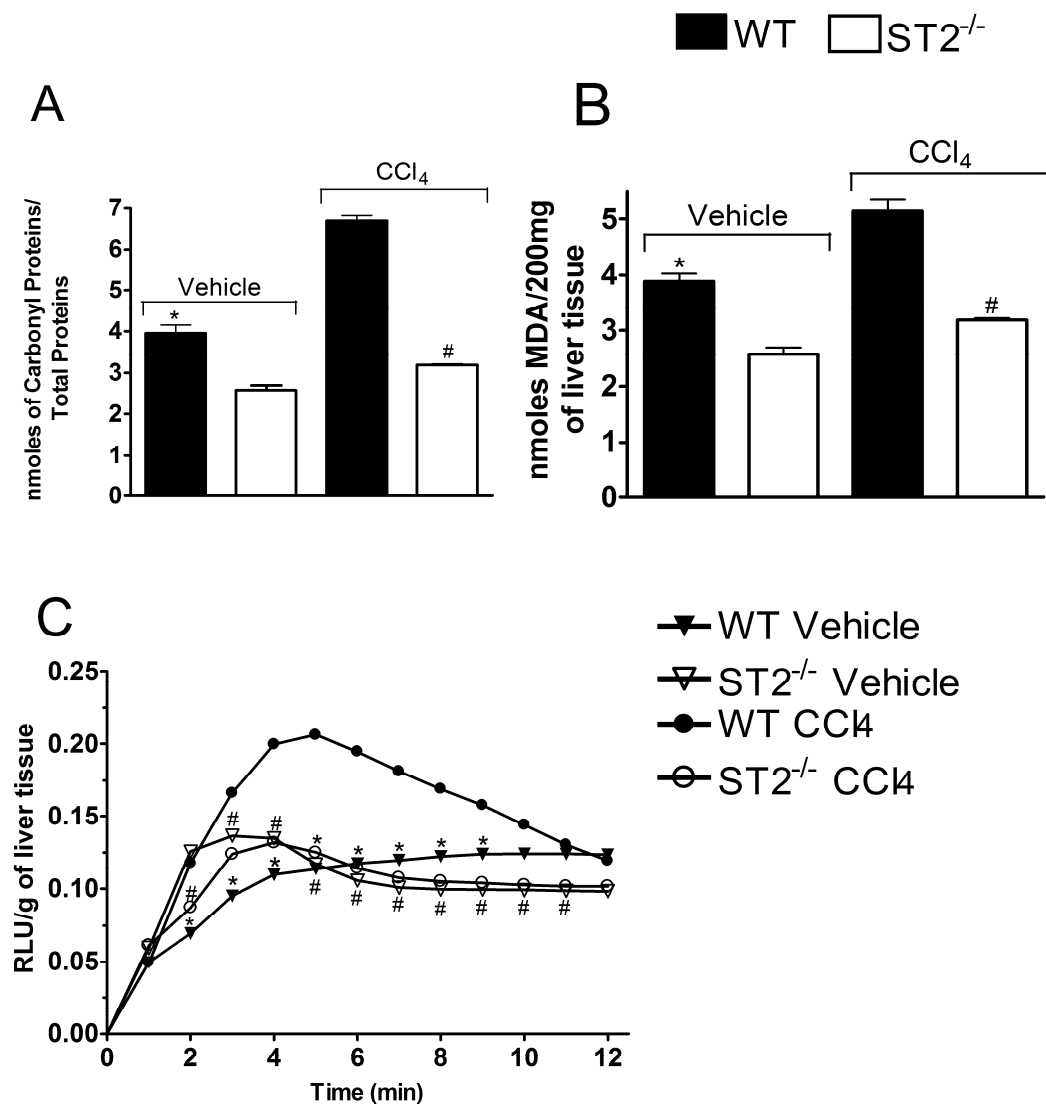


Figure 6: Reduced CCl₄-induced lipid peroxidation and carbonyl proteins in ST2^{-/-} mice. Mice were treated with CCl₄ (100μl of CCl₄ dissolved in corn oil/10g of mice body weight) or vehicle (corn oil). After 6h, samples of liver were collected to determine lipid peroxidation by TBARS (panel B) or chemoluminescence (panel C) and carbonyl proteins (panel A). n = 5, representative of two separated experiments. *p < 0.05 compared to WT CCl₄. #p < 0.05 compared to WT CCl₄. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

DISCUSSION

In the present study, it was evaluated the effect of ST2 deficiency in the lethality, oxidative stress and cytokine production in the liver induced by CCl₄. ST2^{-/-} mice presented increased percentage of survival and prolonged survival compared to WT mice together with reduced oxidative stress and cytokine production in the liver.

It has been previously demonstrated that ST2^{-/-} mice present increased cytokine production and inflammatory lymphocyte and macrophage infiltration in the liver in the concavalin A model, and also increased fibrosis in concavalin A and CCl₄ models (16,15). In addition, the treatment with soluble (s) ST2-Fc fusion protein, which is expected to bind IL-33 and diminish its activity, increased the severity of liver inflammation, though with an enhanced Th2 profile (17), which is not expected because IL-33 injection induces Th2 response (2). In the majority of studies, ST2^{-/-}, anti-ST2 antibody and sST2-Fc fusion protein treatments present similar results. However, it has also been demonstrated opposite effects. For instance, sST2-Fc fusion protein reduces LPS-induced lethality and cytokine production while anti-ST2 antibody increases LPS-induced lethality and cytokine production (31). A possible explanation is that the sST2-Fc fusion protein binds macrophages and induces NFκB activation through unknown pathways (31) while anti-ST2 antibody would induce ST2L expressing cells to be leased reducing inflammation (11) and ST2^{-/-} would have a impaired IL-33 signaling (2). Therefore, it is likely that previous data using sST2-Fc fusion protein (17) represents a different scenario compared to the present results.

Corroborating the present data preclinical evidence demonstrating the importance of IL-33/ST2 signaling to liver failure, patients with acute liver failure, acute-on-chronic liver failure and chronic hepatic failure awaiting liver transplantation presented increased IL-33 serum levels compared to healthy volunteers. Moreover, ST2 levels were higher in acute liver failure and acute-on-chronic liver failure compared to chronic hepatic failure patients

indicating that higher ST2 levels are detected in acute phase rather than chronic phase of liver failure. IL-33 levels also correlated with alanine aminotransferase (32). The major sources of IL-33 in normal liver from both mice and humans are the liver sinusoidal endothelial cells and, in fibrotic liver, the activated hepatic stellate cells (33).

It is possible that the opposite results in the concavalin A and CCl₄ models (15) are also dependent on the different nature of cellular activation between these models. Concavalin A activates toll-like receptors 2/6, 4 and 5 (34) while IL-33/ST2 impairs TLR4 signaling (13, 31, 35). The mechanisms involved in the lethality and hepatic injury induced by CCl₄ depend on the production of free radicals as the CCl₄ is converted by cytochrome P450 to trichloromethyl and trichloromethylperoxil (18,19). Corroborating that ST2 deficiency counteracted the development of oxidative stress and cytokine production, it was observed that ST2^{-/-} mice presented similar SOD activity, which would result in similar levels of hydrogen peroxide from the dismutation of superoxide anion, but with higher catalase activity demonstrating a better antioxidant profile. The GSH levels were lower in ST2^{-/-} than WT, but could be a result of higher catalase activity that would result in lower levels of hydroxyl radical, which is the target of glutathione system. In agreement, it was observed that ST2^{-/-} mice present higher total antioxidant capacity. This method evaluates low molecular weight antioxidants such as GSH and vitamin E (25). This indicates that ST2^{-/-} mice have lower oxidative stress and a reduction of the consequences of oxidative stress (36-39). In fact, ST2^{-/-} mice had lower protein carbonylation and less lipid peroxidation induced by CCl₄ compared to WT animals. The basal activity of SOD was slightly but significantly reduced in ST2^{-/-} mice compared to WT (data not shown) though no difference was observed after vehicle or CCl₄, and there was no difference between WT and ST2^{-/-} mice regarding the activity or levels of carbonyl proteins, GSH, Trap, catalase and lipid peroxidation (MDA and chemiluminescence) (data not shown). Thus, pre-existing basal

differences did not influence the results. In sepsis, ST2^{-/-} mice present more severe inflammation because IL-33/ST2 signaling reduces LPS/TLR4/GRK2-induced internalization of chemokine receptors (35) and ST2^{-/-} neutrophils produce reduced amounts of superoxide anion due to a deficiency in NADPH oxidase with the consequent reduced microbicidal activity (40), which corroborate with the present results demonstrating reduced oxidative stress in ST2^{-/-} compared to WT mice after CCl₄ challenge.

There is direct relationship between cytokines and oxidative stress since superoxide anion induces NFκB activation, which is an important transcription factor in cytokine induction. In turn, cytokines such as TNFα activates NADPH oxidase resulting in superoxide anion production (41). IL-33 is also considered an alarmin, due to its fast release upon a variety of stimuli (42), supporting that it might be an initiating cytokine in many conditions. Nevertheless, it is also possible that IL-33 might act in synergy with other cytokines as well as its action depends on other cytokines. IL-33 synergizes with IL-12 to promote the effector function of CD8⁺ T cells (43). IL-33 also induces the production of TNFα, IL-1β, IFN-γ and IL-5 (4,14,44). An inverse pathway also occurs since TNFα plus IL-1β induce IL-33 production (45), and TNFα increases the ST2 expression in rheumatoid arthritis (46). Herein, IL-33/ST2 signaling deficiency resulted in reduced production of TNFα, IL-1β, IL-12, IFN-γ and IL-5.

Concluding, the present data add to previous evidence on IL-33 and ST2 expression (33) by demonstrating the functional consequences of ST2 deficiency in the classic CCl₄-induced hepatic lesions model. ST2 deficiency resulted in reduced inflammatory cytokine production and oxidative stress, indicating the together with previous evidence (32) the potential of targeting IL-33/ST2 axis to reduce liver damage. Future studies might ascertain the relevance of the present pre-clinical evidence.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Jesus A. Vargas and Pedro S. R. Dionísio Filho. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and Fundação Araucária (Brazil).

REFERENCES

1. Barksby H E, Lea S R, Preshaw P M, Taylor J J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149 (2): 217-25.
2. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23 (5): 479-90.
3. Liew F Y, Pitman N I, McInnes I B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10 (2): 103-10.
4. Verri W A Jr, Guerrero A T, Fukada S Y, et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 (7): 2723-8.
5. Cho K A, Suh J W, Sohn J H, et al. IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011. [Epub ahead of print].
6. Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff S C, Falk W, Martin M U. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(47): 18660-5.
7. Chackerian A A, Oldham E R, Murphy E E, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein R A. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol.* 2007; 179(4): 2551-5.
8. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol.* 2008; 181(7): 4780-90.
9. Gächter T, Werenskiöld A K, Klemenz R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 1996; 271(1): 124-9.

10. Leung B P, Xu D, Culshaw S, McInnes I B, Liew F Y. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol.* 2004; 173(1): 145-50.
11. Xu D, Chan W L, Leung B P, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 1998; 187(5): 787-94.
12. Löhning M, Stroehmann A, Coyle A J, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(12): 6930-5.
13. Brint E K, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 2004; 5(4): 373-9.
14. Smithgall M D, Comeau M R, Yoon B R, Kaufman D, Armitage R, Smith D E. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008; 20(8): 1019-30.
15. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol.* 2012; 56(1): 26-33.
16. Arshad M I, Rauch M, L'helgoualc'h A, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol.* 2011; 41(8): 2341-8.
17. Amatucci A, Novobrantseva T, Gilbride K, Brickelmaier M, Hochman P, Ibraghimov A. Recombinant ST2 boosts hepatic Th2 response in vivo. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(1): 124-32.
18. Kumar V, Abbas A K, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier 8th edition, 2009.
19. Connor H D, Thurman R G, Galizi M D, Mason R P. The formation of a novel free radical metabolite from CCl₄ in the perfused rat liver and in vivo. *J Biol Chem.* 1986; 261(10): 4542-8.
20. Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. In *Antioxidants, Oxidants, and Free Radicals.* Taylor and Francis. 1997; p. 237.
21. Hernández-Munoz R, Díaz-Munoz M, López V, et al. Balance between oxidative damage and proliferative potential in an experimental rat model of CCl₄-induced cirrhosis: protective role of adenosine administration. *Hepatology.* 1997; 26(5): 1100-1110.
22. Sedlak J, Lindsay R H. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25(1): 192-205.
23. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.
24. Beutler, E. Superoxide Dismutase. In: *Red Cell Metabolism: Manual of Biochemical Methods.* Grune & Stratton. 1984; 83-65.
25. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero M L, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta.* 1996; 255(2): 107-17.

26. Reznick A Z, Witt E, Matsumoto M, Packer L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189(2): 801-6.
27. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10(2): 93-100.
28. Slater T F. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222(1): 1-15.
29. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
30. Miller, G L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 1959; 31: 426-428.
31. Sweet M J, Leung B P, Kang D, et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol.* 2001; 166(11): 6633-9.
32. Roth G A, Zimmermann M, Lubczyk B A, et al. Up-regulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. *J Surg Res.* 2010; 163(2): 79-83.
33. Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6B): 1726-39.
34. Unitt J, Hornigold D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81(11): 1324-8.
35. Alves-Filho J C, Sônego F, Souto F O, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med.* 2010; 16(6): 708-12.
36. Halliwell B, Gutteridge J M C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arc. Of Biochem. And Biophys.* 1990; 280: 1-8.
37. Halliwell B, Gutteridge J M C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. *Free Radicals in biology and medicine.* Clarendo Press. 1989: 22-58.
38. Ferreira A L A, Matsubara L S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.,* 1997: 43.
39. Vasconcelos S M L, Goulart M O F, Moura J B F, Mafredini V, Benfato M. S., Kubota L T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quimica Nova.* 2007; 30(5): 1323-1338.
40. Buckley J M, Liu J H, Li C H, et al. Increased susceptibility of ST2-deficient mice to polymicrobial sepsis is associated with an impaired bactericidal function. *J Immunol.* 2011; 187(8): 4293-9.
41. Kilpatrick L E, Sun S, Li H, Vary T C, Korchak H M. Regulation of TNF-induced oxygen

radical production in human neutrophils: role of delta-PKC. *J Leukoc Biol.* 2010; 87(1):153-64.

42. Moussion C, Ortega N, Girard J P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008; 3(10): 3331.

43. Yang Q, Li G, Zhu Y, et al. IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2011; 41(11):3351-60

44. Bourgeois E, Van L P, Samson M, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol.* 2009; 39(4):1046-55.

45. Xu D, Jiang H R, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(31):10913-8.

46. Verri W A Jr, Souto F O, Vieira S M, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(9):1697-703.