



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



ISABELA FERREIRA QUEIROZ

**ANÁLISE TEMPORAL DA HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELO
PARACETAMOL**

OURO PRETO

2022

ISABELA FERREIRA QUEIROZ

**ANÁLISE TEMPORAL DA HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELO
PARACETAMOL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Ouro Preto como
requisito obrigatório para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Caldeira Costa

Coorientadora: Ma. Aline Meireles Coelho

OURO PRETO

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

Q3a Queiroz, Isabela Ferreira.
Análise temporal da hepatotoxicidade induzida pelo Paracetamol.
[manuscrito] / Isabela Ferreira Queiroz. - 2022.
48 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.
Coorientadora: Ma. Aline Meireles Coelho.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Medicamentos - Efeitos colaterais. 2. Acetaminofen - Intoxicação.
3. Fígado - Doenças. I. Coelho, Aline Meireles. II. Costa, Daniela Caldeira.
III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.065

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Ferreira Queiroz

Análise temporal da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovada em 14 de junho de 2022

Membros da banca

Dra Daniela Caldeira Costa Calsavara - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutoranda Aline Meireles Coelho - Coorientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Doutorando Allan Cristian Gonçalves (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mestranda Maria Laura da Cruz Castro (Universidade Federal de Ouro Preto)

Daniela Caldeira Costa Calsavara, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 21/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/06/2022, às 21:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0348649** e o código CRC **FA4030A1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo cuidado nos pequenos detalhes, por sempre me guiar e iluminar. Aos meus pais: João e Marli. Vocês são exemplos de equilíbrio e força pra mim. A confiança e orações de vocês me fazem acreditar que sou capaz de realizar todos os meus sonhos. Nem minhas melhores palavras descrevem minha gratidão, vocês são peças fundamentais do que sou hoje. Obrigada por todo amor e apoio sempre!

Agradeço minhas irmãs, Viviane e Júlia, meu cunhado Felipe e a todos da minha família por toda torcida e companheirismo. Sem esquecer dos amigos mais que especiais que fizeram essa jornada cheia de desafios e renúncias, mais leve com risadas, momentos e trocas sinceras. A todos que torcem por mim e pelo meu sucesso a minha gratidão.

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) por todo aprendizado e suporte pra realização deste trabalho. Em especial à minha orientadora Daniela, por todo apoio e atenção. À minha querida coorientadora Aline que sempre acreditou no meu potencial me mostrando que posso ir além, pela confiança e parceria.

Por fim, agradeço a Escola de Farmácia pelo inestimável ensino de qualidade e à cidade de Ouro Preto que sempre terei enorme carinho.

RESUMO

O paracetamol, é um dos analgésicos e antipiréticos mais utilizados, porém devido ao acesso fácil ao medicamento e a automedicação da população tem-se observado um aumento no número de intoxicações por este fármaco. A utilização do paracetamol em doses elevadas pode causar danos hepáticos irreversíveis. A hepatotoxicidade ocasionada pelo paracetamol é iniciada por um metabólito reativo chamado N-acetil-p-benzoquinonimina (NAPQI) que, em baixas quantidades é neutralizado pela glutathiona hepática (GSH), entretanto em excesso pode ocasionar depleção de GSH e sérios danos hepáticos. Baseado no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as principais alterações hepáticas decorrentes da intoxicação com paracetamol em curto prazo (3 horas) e em longo prazo (12 horas). Para tal, foram utilizados 21 camundongos C57BL/6 distribuídos nos seguintes grupos: Grupo controle (n=7) que recebeu apenas água; Grupo APAP 3H (n=7) e Grupo APAP 12H (n=7) que receberam a dose tóxica de paracetamol 500 mg/kg, 3 ou 12 horas antes da eutanásia, respectivamente. Após a eutanásia, amostras do soro e fígado foram coletadas e armazenadas para a avaliação da função hepática e renal, análise dos biomarcadores do estado redox hepático, análise histopatológica e perfil inflamatório. Os resultados mostraram que houve um aumento significativo das enzimas ALT e AST após 12 h de intoxicação, sugerindo lesão hepática. Na função renal observamos um aumento de creatinina após 3 e 12 horas de intoxicação. Já em relação à concentração de ureia observamos um aumento em seus níveis após 12 horas. Em relação aos biomarcadores do estado redox houve um aumento de proteína carbonilada após 12 horas e um aumento de peroxidação lipídica tanto em 3 horas como em 12 horas. Enquanto na quantificação dos grupamentos sulfidrila houve uma redução após 12 horas de exposição ao fármaco. No que diz respeito aos componentes da via do inflamassoma observou-se que uma diminuição na expressão de IL-18 e CASP-1 em 3 horas, já em 12 horas houve aumento na expressão de IL-18, CASP-1, NLRP3 e IL1- β . Também foi observado um aumento na concentração das citocinas pro-inflamatórias TNF e IL-6 em 12 horas de intoxicação. Além disso, na histoarquitetura hepática os índices de necrose e hiperemia aumentaram após 12 horas de exposição, enquanto a binucleação diminuiu nesse período. Dessa forma, concluímos que o paracetamol induz lesões hepáticas já nas primeiras horas de intoxicação, sendo que no período de 12 horas após a intoxicação todos os parâmetros avaliados foram alterados. Sendo assim, a análise temporal dos efeitos hepatotóxicos desse fármaco poderá abrir novas perspectivas para estudos clínicos que visem

uma abordagem terapêutica mais eficiente, aumentando a chance de sobrevivência do indivíduo intoxicado.

Palavras-chaves: Paracetamol; hepatotoxicidade; NAPQI; CYP450; estado redox; inflamação

ABSTRACT

Paracetamol is one of the most observed and most used antipyretics, but due to easy access to the drug and the population's self-medication, an increase in the number of intoxications by this drug has been observed. The use of paracetamol in high doses can cause liver damage. Paracetamol hepatotoxicity is caused by a reactive metabolite called acetyl-p-benzoquinonimine (NAPQI) which at low levels is neutralized by hepatic glutathione (GSH), but in excess can cause GSH depletion and liver damage. Based on the above, the present study as an objective evaluated with changes in the term paracetamol in a recent study (3 hours) and in the long term (12 hours). For this, 21 C57BL/6 mice were distributed in the following groups: Control group (=7) that received only water; 3H APAP Group (n=7) and 12H APAP Group (n=7) who received a toxic dose of paracetamol 500 mg/kg, 3 or 12 hours before euthanasia, respectively. After euthanasia, serum and liver samples were collected and stored for assessment of liver and kidney function, analysis of biomarkers of liver redox status, histopathological analysis and inflammatory profile. The results showed that there was a significant increase in ALT and AST enzymes after 12 h of intoxication, suggesting liver damage. Renal function notes an increase in creatinine after 3 and 12 hours of intoxication. Regarding the urea concentration, we observed one in its levels after 12 hours. Regarding the biomarkers of the redox state, there was an increase in carbonyl protein after 12 hours and an increase in lipid peroxidation both at 3 hours and at 12 hours. While in the quantification of sulfhydryl groups there was a reduction after 12 hours of drug exposure. Regarding the components of the inflammasome pathway, it was observed that a reduction in the expression of IL-18 and CASP-3 hours, there was already an increase of 12 hours in the expression of IL-18, CASP-1, NLRP3 and IL1 - β . An increase in the concentration of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 was also observed. Of that, his in hepatic architecture the indices and hyperemia occurred after 12 exposure, while the binucleation of additional necrosis hours in that period. Thus, we concluded that paracetamol was already in the first intoxication units, and in the period of 12 hours after intoxication, all hours in parameters were changed. Therefore, a temporal analysis of the hepatotoxic effects of this drug open perspectives for clinical studies aimed at a more efficient therapeutic approach, increasing a chance of survival of the intoxicated individual.

Keywords: Paracetamol; CYP450; NAPQI; hepatotoxicity; redox state; inflammation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.Fases do Metabolismo de Substâncias Exógenas no Fígado.....	12
FIGURA 2.Fórmula Estrutural do Paracetamol (N-(4-hidroxifenil) etanamida).....	13
FIGURA 3.Estresse oxidativo mitocondrial, formação de peroxinitrito, alteração da permeabilidade e fragmentação do DNA mitocondrial durante a hepatotoxicidade induzida por paracetamol.	17
FIGURA 4.Esquema de ativação do inflamassoma NRLP3	19
FIGURA 5.Delineamento experimental dos animais intoxicados pelo APAP por 3 horas	21
FIGURA 6.Delineamento experimental dos animais intoxicados pelo APAP por 12 horas ...	22
FIGURA 7.Avaliação da função hepática através da atividade de ALT e AST em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg)	29
FIGURA 8.Avaliação da histoarquitetura hepática em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol	30
FIGURA 9.Avaliação da função renal através da concentração de creatinina e ureia em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg)	31
FIGURA 10.Avaliação da concentração total de proteína carbonilada e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg)	32
FIGURA 11.Avaliação da concentração total de grupos sulfidrilas em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg)	32
FIGURA 12.Os efeitos do APAP na via do inflamassoma em fígado de camundongos intoxicados com paracetamol	33
FIGURA 13.Avaliação dos níveis de TNF (A) e IL-6 (B) em fígado de camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol	34

FIGURA 14. Gráficos de dispersão ilustrando a correlação de Pearson entre os grupos experimentais 35

FIGURA 15. Representação da hepatotoxicidade do paracetamol após 12 horas de intoxicação 39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Manifestações clínicas cronológica da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.	15
TABELA 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a análise de qRT-PCR.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Fígado.....	11
2.2. Paracetamol	13
2.3. Estresse oxidativo	16
2.4. Inflamação	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos:.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Coleta do material biológico.....	22
4.3. Análises bioquímicas	22
4.4. Biomarcadores do dano oxidativo	23
4.5. Análise das defesas antioxidantes.....	25
4.6. Análise perfil Inflamatório	26
4.7. Análise Histológica.....	28
4.8. Análise estatística	29
5. RESULTADOS	29
5.1. Marcadores de função hepática	29
5.2. Avaliação da histoarquitetura hepática.....	30
5.3. Marcadores de função renal.....	31
5.4. Biomarcadores do dano oxidativo	31
5.5. Avaliação da atividade antioxidante.....	32
5.6. Perfil Inflamatório	32

5.7. Análise de correlação dos parâmetros avaliados	34
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS	44

1. INTRODUÇÃO

O fármaco paracetamol (APAP), também conhecido como acetaminofeno, possui propriedades analgésicas para dor e antipiréticas para febre. Além de ser um medicamento de venda livre, ele está disponível em várias formas farmacêuticas, o que viabiliza seu fácil acesso por milhões de pessoas no mundo (WIFFEN et al., 2017). A dose terapêutica recomendada é cerca de 4 g/dia. Entretanto, ele é responsável por inúmeras intoxicações por ano, podendo levar a insuficiência hepática aguda (IHA) e assim causar centenas de mortes. Nos Estados Unidos mais de 50% dos casos de IHA está relacionado a superdosagem do paracetamol (YOON et al., 2016).

A intoxicação com paracetamol pode ocorrer em casos de overdose, seja acidentalmente pelo uso incorreto do fármaco, devido a automedicação, ou de caráter intencional, por tentativa de suicídio. A intoxicação com este fármaco também pode ocorrer mesmo quando administrado em sua dose recomendada, quando o uso é associado ao álcool e/ou outros fármacos, ou ainda, quando há uma doença hepática pré-existente (THUSIUS et al., 2019). Assim, torna-se necessário um tratamento rápido de pacientes com IHA, para que não haja a necessidade de transplante hepático ou, até mesmo, o óbito do paciente.

Quando administrado, o APAP é absorvido e transportado para o fígado onde é metabolizado. O fígado é responsável por metabolizar moléculas endógenas e exógenas, exercendo papel essencial na homeostase do organismo em vias como: metabolismo da glicose, controle endócrino, síntese e degradação de macromoléculas, metabolismo de colesterol e lipídeos, processos de regulação do sistema imune e decomposição dos xenobióticos (TREFTS et al., 2017). Além disso, a metabolização de moléculas exógenas como o paracetamol ocorre pelo sistema citocromo P450 (CYP450) e é dividido em duas etapas: o metabolismo de primeira fase, composto por reações de oxidação, redução e hidrólise e; pelo metabolismo de segunda fase caracterizado por reações de conjugação (STAVROPOULOU et al., 2018).

A hepatotoxicidade se inicia com a formação de um metabolito tóxico reativo N-acetil-p-benzoquinonimina (NAPQI), que reduz os níveis de glutatona hepática, favorecendo a ligação do NAPQI às proteínas celulares, lipídeos e outras biomoléculas. A ligação das proteínas mitocondriais com o NAPQI leva à danos no DNA mitocondrial (mtDNA), abertura de poros de transição mitocondriais e a alterações no potencial de membrana. Essas alterações conduzem a morte celular por necrose dos hepatócitos (RAMACHANDRAN et al., 2020).

O desequilíbrio redox induzido por essas alterações durante a intoxicação do paracetamol induz a formação de espécies reativas como o peróxido de hidrogênio, causando efeitos deletérios na função de proteínas e lipídeos (SANTO; ZHU; LI, 2016).

Além desse desequilíbrio bioquímico nas biomoléculas e a morte celular por necrose, os componentes intracelulares liberados dos hepatócitos podem levar a mecanismos inflamatórios como à ativação do complexo do inflamassoma (NLRP3) nas células de Kupffer, causando uma liberação de citocinas pró-inflamatórias (IMAEDA et al., 2009). A principal função do inflamassoma é reconhecer uma ampla variedade de sinais de perigo, incluindo padrões moleculares relacionados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares relacionados a danos (DAMPs) e, portanto, levar à ativação da caspase-1, o que conduz à ativação das pró-interleucina-1 β (pro-IL- β) e pró-interleucina-18 (pró-IL-18) em IL-1 β e IL-18 maduras (YANG et al., 2019).

Evidências sugerem que a resposta inflamatória possa estar diretamente associada à patogênese da lesão hepática induzida por APAP, dessa maneira além da avaliação bioquímica, a avaliação das alterações histológicas e, da via do inflamassoma, torna-se relevante para um melhor entendimento dos danos hepáticos ocasionados ao longo do tempo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Fígado

O fígado é considerado a maior glândula do corpo humano, responsável por cerca de 2% do peso corporal de um adulto saudável. Possui diversas funções, além da participação na digestão, de modo a apoiar a função de outros órgãos e impactar todos os sistemas fisiológicos (BOGDANOS *et al.*, 2013). Dentre suas principais atribuições está o metabolismo de macronutrientes, síntese de hormônios, a regulação do volume sanguíneo, síntese e degradação de proteínas plasmáticas, suporte ao sistema imunológico e também o metabolismo e detoxificação dos compostos xenobióticos (TREFTS *et al.*, 2017), assim chamados por não serem produzidos e nem serem encontrados normalmente no corpo. Entretanto, a exposição do fígado a eles após ingestão oral de bebidas alcoólicas e fármacos, por exemplo, é quase imediata o tornando um órgão vulnerável a lesões. Nesse sentido, sabe-se que o organismo é exposto a diversos xenobióticos e vários deles são conhecidos por terem um potencial hepatotóxico (GU; MANAUTOU, 2012).

O metabolismo de substâncias exógenas no fígado é um processo enzimático pelo qual os compostos são convertidos em subprodutos mais hidrofílicos, para que possam ser inativados e facilmente excretados. Ele ocorre por meio de duas fases. Na primeira fase, a substância passa por reações de oxidação, redução ou hidrólise. Isso se torna possível principalmente através do sistema citocromo P450 (CYP450), uma família de heme proteínas encontradas no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos que catalisam as reações do metabolismo hepático. (STAVROPOULOU et al., 2018). Essas reações necessitam de cofator como o fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH) para exercerem seu papel de introduzir ou expor um grupo funcional reativo (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) na molécula do xenobiótico a fim de aumentar a hidrofilia em relação à molécula inicial. Entretanto, através desse processo alguns compostos podem formar metabólitos ativos e tóxicos para o organismo que serão detoxificados pelas reações de fase 2 (MITTAL et al., 2015).

No decorrer da segunda fase do metabolismo, o metabólito formado na fase 1 é conjugado covalentemente a uma macromolécula endógena como o ácido glicurônico, glutatona (GSH) e sulfatos inorgânicos com o auxílio das UDP-glicuronil transferases (UGTs), glutatona S- transferases (GSTs) e sulfotransferases (SULTs) (Figura 1). Dessa forma, serão finalmente excretadas pelo trato urinário e não causarão maiores danos. Além desse importante papel de defender as células dos metabólitos tóxicos, essas enzimas desempenham uma ação essencial ao agir sobre os radicais livres produzidos normalmente pelo organismo (ALMAZROO et al., 2017).

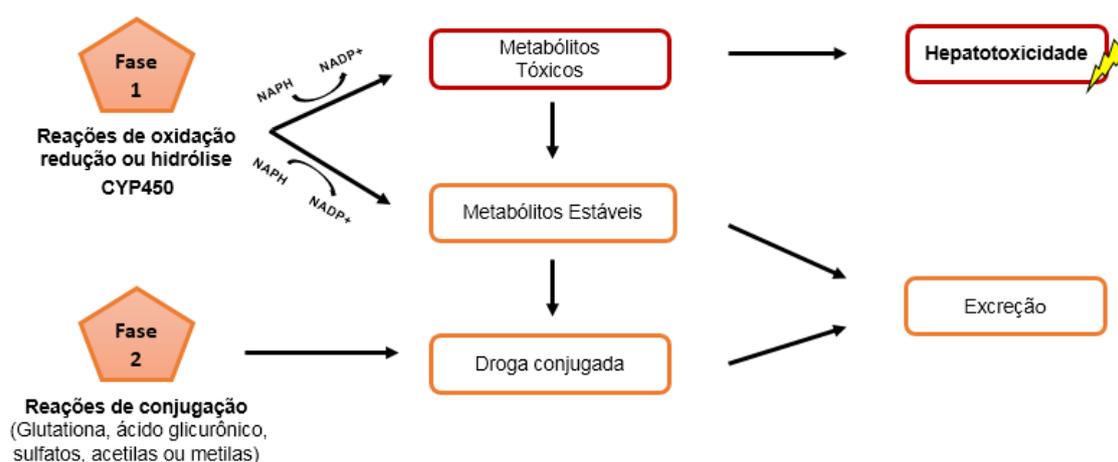


Figura 1. Fases do Metabolismo de Substâncias Exógenas no Fígado. Reações da fase 1 são catalisadas pelo citocromo P450. Reações da fase 2 são reações de conjugação com glutatona, ácido glicurônico, sulfatos, acetilas ou metilas. Os metabólitos tóxicos que são formados podem levar a hepatotoxicidade. CYP450 – Citocromo P450, NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina, NADP⁺ - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina na forma oxidada.

2.2. Paracetamol

Devido ao papel central do fígado na metabolização de diversos fármacos, muitos deles podem levar a lesão hepática induzida por medicamentos, conhecida como DILI (*drug-induced liver injury*). As lesões hepáticas induzidas por drogas podem ser classificadas como: intrínsecas/dependentes da dose e idiossincrático/independente da dose. Entre os fármacos causadores de DILI, destaca-se o paracetamol (N-acetil-p-aminofenol, acetaminofeno, APAP) que representa um dos melhores exemplos de DILI preditiva (LICATA, 2016).

O paracetamol (APAP), é um fármaco comumente utilizado por ter propriedades analgésicas e antipiréticas. Possui como benefício o alívio da dor de intensidade leve a moderada e da febre, além de ser usado associado a opioides para tratamento da dor crônica (Wiffen et al.; 2017).

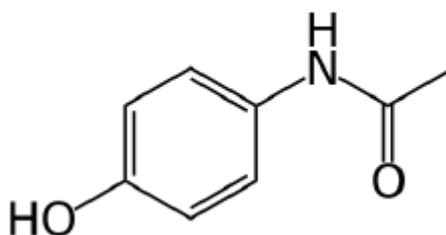


Figura 2. Fórmula Estrutural do Paracetamol (N-(4-hidroxifenil)etanamida)
Fonte: IUPAC

É um medicamento de venda livre disponível em várias formas farmacêuticas, como comprimidos, xaropes, supositórios retais e líquidos intravenosos, viabilizando seu fácil acesso e uso diário por milhões de pessoas no mundo. A dose terapêutica e segura recomendada é cerca de 4 g/dia para adultos e 50-75 mg/kg/dia em crianças. Quando administrado em dose única superior a 7g em adultos e 150 mg/kg em uma criança é apontado como altamente tóxico para fígado e rins (ALVARELLOS et al., 2015). No entanto, a intoxicação pode ocorrer mesmo em doses terapêuticas quando seu uso é concomitante com álcool etílico e outros fármacos, quando há uma doença hepática pré-existente ou predisposição genética. Dessa forma, o paracetamol pode induzir uma grave lesão no fígado, podendo levar a insuficiência hepática aguda (IHA) e consequentemente centenas de mortes (THUSIUS et al., 2019).

Davidson e Eastham, em 1966 foram os primeiros a descrever o APAP como sendo hepatotóxico em casos de overdose. Desde então muitos outros casos foram relatados

(DAVIDSON; EASTHAM, 1966). Nos Estados Unidos, mais de 50% dos casos de IHA estão relacionados a overdose causada pelo paracetamol (YOON et al., 2016). Essa overdose pode ser de acidental pelo uso irracional do medicamento ou de caráter intencional, por tentativa de suicídio. Aproximadamente 90% das tentativas de suicídio entre jovens da Dinamarca e da sociedade ocidental estão relacionadas com a intoxicação pelo paracetamol (HEDELAND et al., 2016).

Atualmente o fármaco utilizado como antídoto na intoxicação pelo APAP é a N-acetilcisteína (NAC), que atua restaurando as reservas de glutatona hepática e se mostra eficiente na maioria dos casos. Entretanto, devido à alta dose de ataque inicial, ele está susceptível a reações adversas do tipo anafilactóide: reações cutâneas e no trato gastrointestinal (TGI), como náuseas e vômitos, hipotensão e choque. Dessa maneira, outras intervenções complementares vêm sendo feitas e estudadas para diminuir essas intercorrências e proporcionar uma terapêutica mais eficaz e segura para os pacientes (MCNULTY et al., 2018).

As principais manifestações clínicas são comuns em grande parte dos pacientes com overdose de APAP e geralmente são divididas em quatro estágios (Tabela 1). No primeiro estágio os sintomas são inespecíficos como mal-estar, náusea e vômito. Já nos próximos estágios, após 24 horas, é observada nefrotoxicidade, com aumento de creatinina e oligúria (PHOLMOO et al., 2019), além do aumento sérico das enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST). A AST existe na forma citoplasmática e mitocondrial e pode ser encontrada em outros tecidos, além do fígado. A ALT é exclusivamente citoplasmática encontrada principalmente no fígado, considerada mais específica que a AST. Essas enzimas são essenciais no diagnóstico e entendimento da severidade das lesões hepáticas, uma vez, que após o mecanismo de hepatotoxicidade ser estabelecido, elas extravasam das células e passam para a corrente sanguínea (XIE et al., 2019).

Tabela 1		Manifestações clínicas da hepatotoxicidade causada pelo paracetamol	
<u>Estágio 1</u> (≥ 24 horas)	<ul style="list-style-type: none"> • Náusea, vômito, mal-estar, sudorese (alguns pacientes podem ser assintomático) • AST / ALT são normalmente normais (AST / ALT pode começar a aumentar 8-12 h após overdose massiva) 		
Estágio 2 (24-72h)	<ul style="list-style-type: none"> • Os sintomas do estágio I geralmente melhoram ou remitem (o chamado período latente) • Elevação subclínica de AST / ALT • <u>Nefrotoxicidade</u> (creatinina elevada e oligúria) pode se tornar evidente 		
Estágio 3 (72-96h)	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomas sistêmicos do estágio I reaparecem • Elevação de AST / ALT, normalmente pico em 72-96 h após a ingestão (frequentemente > 3000 IU / L) • Icterícia, encefalopatia e acidose láctica podem se desenvolver • Morte frequente 		
<u>Estágio 4</u> (96 h–2 semanas)	<ul style="list-style-type: none"> • Os sobreviventes do estágio 3 entrarão na fase de recuperação, que geralmente dura de 1 a 2 semanas, mas pode levar várias semanas em casos graves • A recuperação histológica ocorre mais lentamente do que a recuperação clínica e pode demorar até 3 meses • Quando a recuperação ocorre, ela está completa 		

Tabela 1.. Manifestações clínicas cronológica da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol. Adaptado (PHOLMOO et al, 2019)

Quando administrado, o APAP é rapidamente absorvido do intestino e transportado para o fígado onde é metabolizado principalmente pelas reações de conjugação. A maior parte, equivalente a dois terços, é conjugado com o ácido glicurônico pela enzima UDP-glucuronosiltransferase (UGT) e o restante, cerca de um terço, são sulfatados pela enzima sulfotransferase (SULT). Os metabolitos não tóxicos formados são facilmente excretados pelos rins. No entanto, menos de 5% do APAP, nas doses terapêuticas, é oxidado no intermediário reativo N-acetil-P-benzoquinona imina (NAPQI), pela isoforma CYP2E1, que por sua vez é inativado pela glutatona e subsequentemente excretado como ácido mercaptúrico e conjugados de cisteína. Em doses excessivas, há saturação das vias do ácido glicurônico e do sulfato e a produção do componente tóxico NAPQI é maior, sobrecarregando o sistema CYP (JAESCHKE et al., 2019). O excesso de NAPQI leva a depleção de glutatona (GSH). Quando os níveis de glutatona se esgotam, o NAPQI se liga a proteínas mitocondriais formando aductos de proteína, o que leva a disfunção mitocondrial, ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e morte celular por necrose (MOLES et al., 2018).

2.3. Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo foi definido em 1985, apenas como o desequilíbrio entre a quantidade de oxidantes e antioxidantes no organismo (SIES, 1985). Essa definição perdurou por décadas e contribuiu para muitas pesquisas nessa área, no entanto, em 2006 se fez necessário uma definição mais atual e ampla que o classificou como uma perturbação na sinalização e controle redox das células (LIEBERT; JONES, 2006). Atualmente, sabe-se que o estresse oxidativo modula vias que regulam a transcrição de genes, expressão de proteínas, apoptose celular e ativação de células estreladas hepáticas. Com isso, ele é considerado um dos mecanismos patológicos relacionados tanto ao início quanto a progressão de injúrias hepáticas. (LI et al., 2015).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons não emparelhados em sua última camada. Devido a essa característica, eles conferem um grau considerável de instabilidade e reatividade a outras moléculas como proteínas, fosfolipídios de membrana e ácidos. As espécies reativas, além dos radicais livres, englobam as espécies reativas de nitrogênio (ERN) e, principalmente, as espécies reativas de oxigênio (ERO), que incluem as espécies não-radicalares como ozônio e peróxido de hidrogênio (ARAUZ et al; 2016).

As ERO's além de serem formadas durante a respiração celular podem ser geradas de outras maneiras. Uma delas é por meio da peroxidação lipídica, que produz hidroperóxidos lipídicos e os radicais alcóxila. A junção de dois radicais, superóxido e óxido nítrico, resulta na formação do peroxinitrito que media reações de oxidação e assim promove modificações na permeabilidade e na fluidez das membranas bem como a nitração de proteínas contendo resíduos de tirosina (BARTESAGHI; RADI, 2018). Essas espécies podem ser formadas também pelas enzimas oxidases presentes no peroxissomos, xantina oxidase e NADPH oxidase, encontradas na membrana plasmática e fagossomos. Essa última está presente em fagócitos e é responsável por catalisar a produção de ERO transferindo elétrons do NADPH para o oxigênio, formando o ânion superóxido. Um outro exemplo da formação desse ânion ocorre no processo de desintoxicação de substâncias como drogas, que é realizada através de reações oxidativas pelas isoenzimas do CYP450. Logo, a origem das ERO's e ERN's são inúmeras e se dão em vários compartimentos celulares e extracelulares. Fontes exógenas também podem ser incluídas como: exposição ao fumo, luz do sol, ingestão de álcool, contaminação por metais pesados e poluição atmosférica (SANTO; ZHU; LI, 2016).

O excesso de ERO's e ERN's causa efeitos deletérios a diversas estruturas celulares como DNA, lipídios e proteínas, levando à alterações no potencial de membrana e ao dano no mtDNA, conseqüentemente a morte celular por necrose (RAMACHANDRAN et al., 2020) (Figura 3).

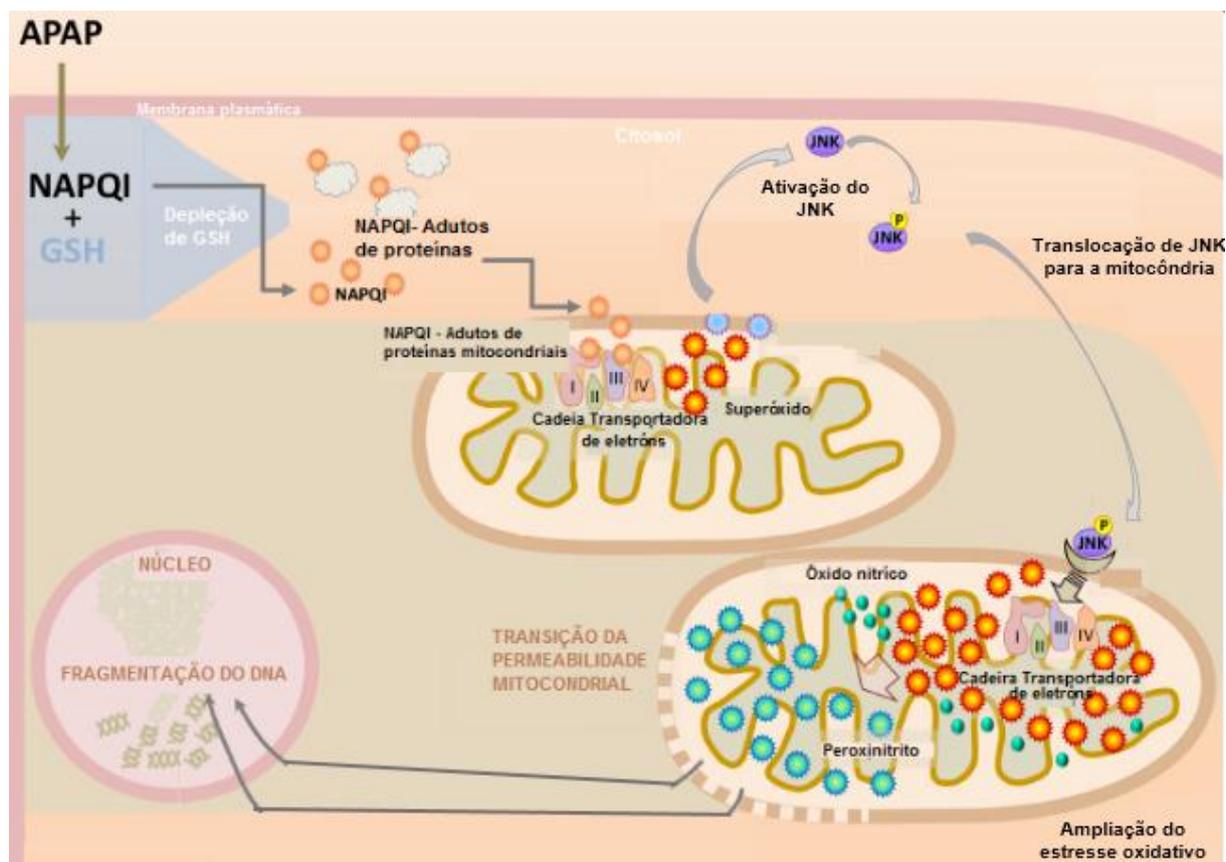


Figura 3. Estresse oxidativo mitocondrial, formação de peroxinitrito, alteração da permeabilidade e fragmentação do DNA mitocondrial durante a hepatotoxicidade induzida por paracetamol. GSH-Glutationa, NAPQI - N-acetil-P-benzoquinona imina, JNK - proteína c-Jun N-terminal cinase (Adaptado (RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2020))

Devido a extensa área necrótica dos hepatócitos, a intoxicação por APAP é caracterizada por uma resposta inflamatória. Os fragmentos celulares liberados considerados como DAMPS, incluindo mtDNA, HMGB1, EROS, ATP e muitos outros se ligam a receptores de reconhecimento padrão, como os receptores tipo Toll-like (TLRs) nas células de Kupffer e levam a ativação da transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Além da ativação do complexo do inflamassoma (NLRP3), existem outras conseqüências relacionadas à inflamação, como hiperemia dos vasos sanguíneos e binucleação (WOOLBRIGHT; JAESCHKE, 2017) (JIANG et al., 2016) (AL-GHAMDI; SHAFEK ATTA, 2020).

2.4. Inflamação

A inflamação faz parte da resposta biológica natural do organismo a estímulos prejudiciais e danos teciduais. É um importante componente da imunidade inata que envolve células imunes, vasos sanguíneos, mediadores moleculares para um possível reparo tecidual. Na intoxicação por APAP, devido à necrose, ela é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o fígado e consequente ativação das citocinas pró-inflamatórias interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) (ROE, 2021).

O TNF produzido principalmente pelos macrófagos é capaz de estimular outras citocinas como a IL-6 e está presente em muitos processos em que a inflamação é exacerbada (SILVA et al., 2019). No entanto, a produção excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias, não só aumenta a resposta imune, como pode diminuir a regeneração do tecido e contribuir para o progresso da hepatotoxicidade (BHUSHAN; APTE, 2019) (HU et al., 2019).

O processo inflamatório é acompanhado por cinco sinais cardinais: calor, vermelhidão, inchaço (edema), dor e perda de função. No qual se destaca os dois primeiros que são causados pela vasodilatação ao aumentar o fluxo sanguíneo local (hiperemia). Isso é visto na histioarquitetura hepática após a overdose do paracetamol como consequência da lesão tecidual, sendo mais um fator de estabelecimento da inflamação (JIANG et al., 2016). Outra consequência bem estabelecida é a ativação do complexo do inflamassoma.

2.4.1. Via do Inflamassoma

O inflamassoma é um complexo multiproteico formado por um receptor contendo domínio de pirina (NLRP3), por uma molécula adaptadora de proteína associada à apoptose (ASC), e a pró-caspase 1. Após estímulos liberados dos hepatócitos devido ao processo de morte celular, considerados padrões moleculares relacionados a danos (DAMPs), ocorre a oligomerização desses componentes nos macrófagos que resulta na clivagem da pró-caspase-1 em caspase-1 ativa, uma protease dependente de cisteína. Dessa forma, ocorre a clivagem da pro-interleucina-1 β e pro-interleucina-18 que foram sintetizadas a partir da cascata de ativação do NF- κ B, um fator de transcrição, tornando-as em suas formas maduras (Figura 4) (KIM; PARK, 2018)

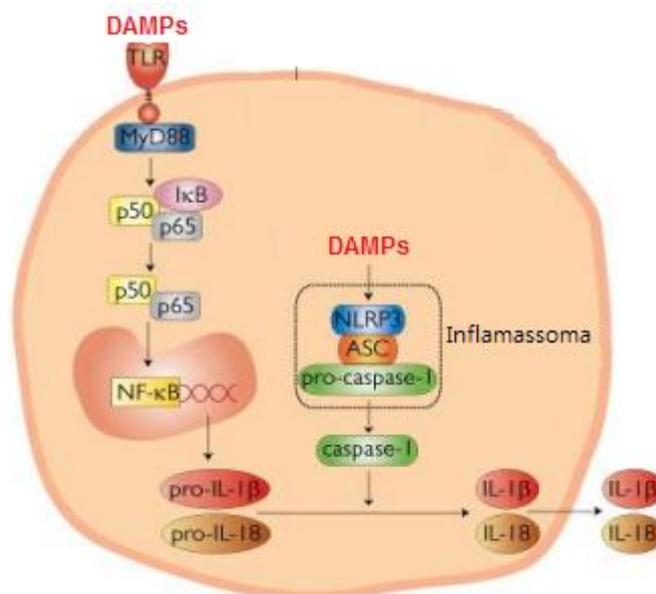


Figura 4. Esquema de ativação do inflamassoma NLRP3. Os DAMPs são reconhecidos pelos receptores tipo Toll, sinalizando a ativação do NF-κB, um fator de transcrição que induz a transcrição da pro-IL-1β e pro-IL-18. O receptor NLRP3 identifica a presença dos DAMPs e juntamente com a proteína ASC e a pro-caspase 1 formam o inflamassoma que ativa a caspase 1, modificando os precursores de IL-1β e IL-18 em suas formas maduras. DAMPs padrões moleculares relacionados a danos. TLR receptores tipo Toll. Adaptado de (PAULA, 2017)

As interleucinas da família IL-1, como a IL-1β e IL-18 exercem o papel de citocinas pró-inflamatórias, assim como IL-6 e TNFα (ÇELIK et al., 2018). Sabe-se que elas possuem um poder de modulação no progresso da inflamação relacionado à intoxicação do APAP, bem como os outros componentes da via do inflamassoma, CASP-1 e NLRP3. Dessa maneira, é importante que esses fatores sejam estudados para a maior elucidação da hepatotoxicidade do paracetamol ao longo do tempo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as alterações em curto (3 horas) e longo prazo (12 horas) dos parâmetros bioquímicos, histológicos, do estado redox e inflamatório na hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol em camundongos C57BL/6.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar a função hepática por meio das dosagens séricas de ALT e AST;
2. Avaliar a função renal por meio das dosagens séricas de creatinina e ureia;
3. Avaliar a concentração de grupamentos sulfidrila no fígado;
4. Avaliar os marcadores de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonilada) no fígado;
5. Avaliar a expressão gênica hepática da via do inflamassoma (NLRP3, CASP1, IL1- β , IL-18),
6. Quantificar os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6);
7. Quantificar a necrose hepática,
8. Avaliar o grau de binucleação e o infiltrado inflamatório no fígado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

O estudo em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com o número de protocolo 5402121118 (ANEXO 1). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 isogênicos, os quais foram alojados em gaiolas no Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP com umidade e temperatura controladas. Os animais estavam com idade de 9 a 11 semanas, com um peso médio de 23 a 25 gramas e foram submetidos aos ciclos claro/escuro de 12 horas com água e comida disponíveis “*ad libitum*”.

4.1.1. Modelo de hepatotoxicidade induzido pelo paracetamol

A hepatotoxicidade nos camundongos C57BL/6 foi induzida conforme o modelo de intoxicação por APAP descrito na literatura (JAESCHKE et al., 2011) (MARQUES et al., 2012) (SINGH; BHAT; SHARMA, 2011) e de igual modo padronizado em trabalhos já realizados do laboratório (BANDEIRA et al., 2017a) (BANDEIRA et al., 2017b). Para o experimento, utilizou-se paracetamol da marca EMS® (lote OX0255) na sua forma líquida. Para assegurar o esvaziamento gástrico os animais ficaram em jejum por 6 horas e após esse tempo, foi administrado por via oral através de gavagem orogástrica a dose tóxica do APAP (500 mg/kg)

em um volume de 120 μ l. Os animais do grupo controle receberam por via oral, apenas 120 μ l de água destilada.

4.1.2. Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo controle (n=7) que recebeu apenas um volume único de 120 μ l de água destilada por meio de gavagem oro gástrica para exposição dos animais às mesmas de condições de estresse que os animais dos outros grupos (estresse da gavagem e da manipulação do animal);
- Grupo APAP 3 (n=7) recebeu uma dose tóxica única de paracetamol (500 mg/kg), 3 horas antes da eutanásia, por meio de gavagem oro gástrica (Figura 5);
- Grupo APAP 12 (n=7) recebeu uma dose tóxica única de paracetamol (500 mg/kg) 12 horas antes da eutanásia, por meio de gavagem oro gástrica (Figura 6).

No Grupo APAP 3, a intoxicação se iniciou após 6 horas de jejum e depois de 3 horas foi realizada a eutanásia. (Figura 5)

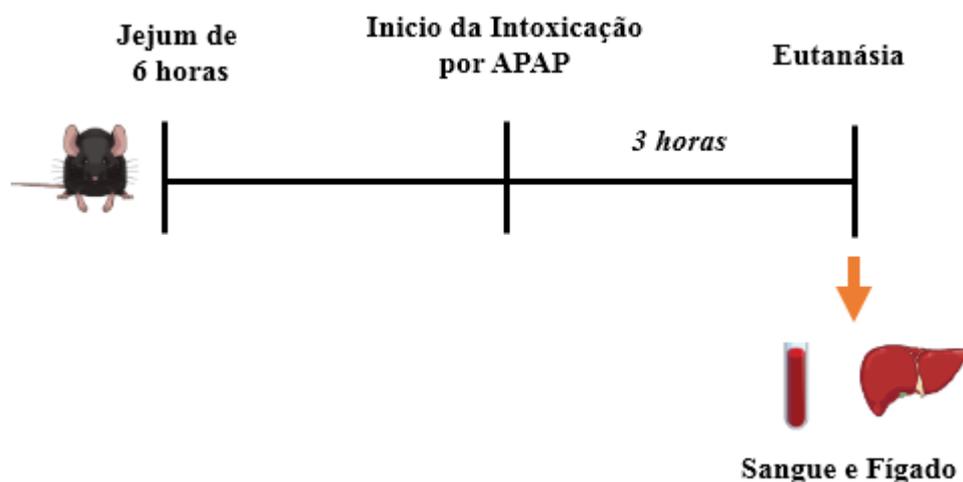


Figura 5. Delineamento experimental dos animais intoxicados pelo APAP por 3 horas. Os animais ficaram por jejum de 6 horas, em seguida foram intoxicados por APAP e eutanasiados após 3 horas para coleta dos materiais biológicos. Fonte: Autoria Própria

No Grupo APAP 12, a intoxicação se iniciou após 6 horas de jejum e depois de 12 horas foi realizada a eutanásia. (Figura 6)

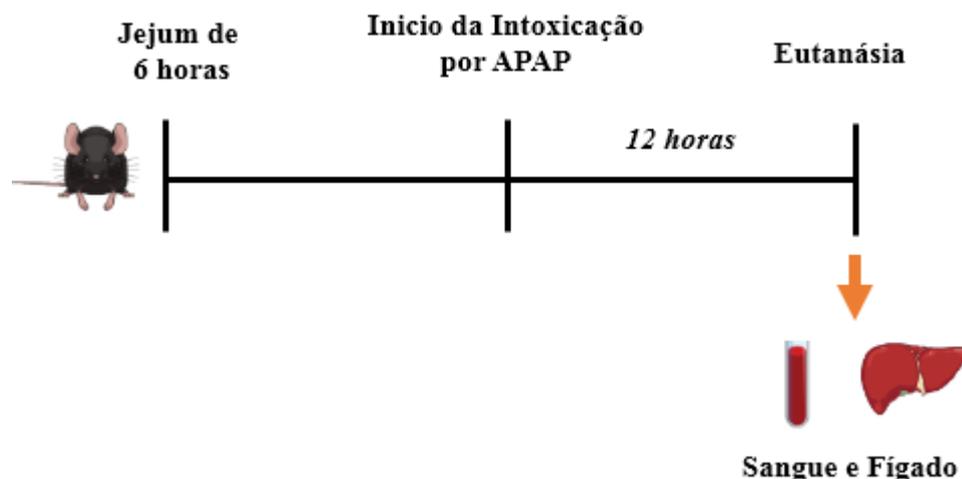


Figura 6. Delineamento experimental dos animais intoxicados pelo APAP por 12 horas. Os animais ficaram por jejum de 6 horas, em seguida foram intoxicados por APAP e eutanasiados após 12 horas para coleta dos materiais biológicos. Fonte: Autoria Própria

4.2. Coleta do material biológico

Para a coleta do material biológico primeiramente os animais foram eutanasiados por exsanguinação, utilizando-se o anestésico respiratório Isofurine® (Bio Chimico, Cordovil RJ, Brasil).

Em seguida, coletou-se o sangue por punção cardíaca após perfusão com solução salina. O sangue foi centrifugado a $9.300 \times g$ por 15 minutos a 25°C para obter o soro. Retirou-se o fígado dos animais e parte dele foi colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para análises. A outra parte foi armazenada em solução tampão de formaldeído 4% a para as análises histológicas.

4.3. Análises bioquímicas

4.3.1. Dosagens séricas da função hepática e renal

As dosagens séricas renais de creatinina e ureia e da atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram obtidas utilizando-

se amostras de soro e de kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante.

4.4. Biomarcadores do dano oxidativo

4.4.1. Homogenato

O homogenato para as dosagens de proteína total, proteína carbonilada e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi preparado utilizando 100 mg de fígado, 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM + EDTA 0,5 mM (pH 7,2) e o inibidor de protease (PMSF) à 1 mM, em seguida centrifugado 9.300 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado para realização das análises.

4.4.2. Dosagem de proteínas totais

Na determinação da concentração de proteínas totais presente no tecido foi utilizado o método de Lowry (LOWRY et al., 1951). A técnica foi aplicada para quantificar as proteínas totais nos homogenatos utilizados para a dosagem de proteína carbonilada, substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quantificar os grupos sulfidríla.

Para o início da dosagem, foi necessário preparar os reagentes descritos a seguir:

Reagente A: Adicionou-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada;

Reagente B: Dissolveu-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Reagente C foi preparado na hora da dosagem da seguinte forma: Adicionou-se 1 mL do reagente A em 50 mL do reagente B. Para 50 mL de reagente B, adicionou-se 1 mL de reagente A.

Reagente D foi preparado na hora da dosagem da seguinte forma: Dissolveu-se 1 mL de Folin Ciocalteu em 1 mL de água destilada.

Em um tubo eppendorf foi adicionado 100 µL de amostra e em seguida 1 mL do reagente C em todos os tubos (amostras, padrões e branco). Todas as misturas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL

do reagente D em todos os tubos e, posteriormente, os tubos foram incubados no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. No branco utilizamos 100 μ L de água destilada. As absorvâncias foram aferidas no equipamento espectrofotômetro a 660 nm.

Por fim, os cálculos foram feitos utilizando a equação da reta, a partir da diluição seriada de 4 pontos da curva com a solução padrão de albumina na concentração de 2 mg/ml.

4.4.3. Dosagem da proteína carbonilada

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por ERO's. Derivados carbonílicos podem ser mensurados por métodos sensíveis, principalmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com os grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada no espectrofotômetro.

O método utilizado para quantificação da concentração da proteína carbonilada foi descrito por Levine e col. (1994). A partir do homogenato, foi utilizado 500 μ L do sobrenadante descrito anteriormente e, em cada tubo eppendorf contendo a amostra foi adicionado 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $5.000 \times g$ por 10 minutos a $4^{\circ}C$ e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi adicionado 500 μ L de DNPH 10 mM e, as amostras foram submetidas ao vórtex e incubadas no escuro a temperatura ambiente por 1 hora, sendo agitados a cada 15 minutos no vórtex. Logo após, foram acrescentados 500 μ L de TCA a 10% e centrifugados a $5.000 \times g$ por 10 minutos a $4^{\circ}C$. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de mistura de etanol/acetato de etila (1:1), misturados no vórtex, e seguido de nova centrifugação como descrito nas etapas anteriores. Ao final do processo de centrifugação o sobrenadante dos tubos foi descartado e acrescentado 1 mL de SDS 6%. Logo após os tubos foram misturados no vórtex e centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 minutos a $4^{\circ}C$. Ao fim do processo, o sobrenadante foi retirado e transferido para cubeta em quartzo (Kasvi- modelo K22-110-Q), onde foram lidas as absorvâncias a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de proteína carbonilada/ mg de proteína.

4.4.4. Dosagem de TBARS

A quantificação da oxidação lipídica se dá pela capacidade do ácido tiobarbitúrico de se ligar a lipídeos oxidados, permitindo a quantificação de TBARS por método espectrofotométrico (BUEG; AUST, 1978).

O homogenato utilizado no experimento está descrito anteriormente e, para realizar a dosagem de TBARS, inicialmente foram pipetados 250 μL de sobrenadante em tubos eppendorf em seguida, adicionados 125 μL de TCA, 125 μL de TBA e 62,5 μL de BHT. Os tubos foram agitados e incubados por 15 minutos em termobloco a 95°C. Após a incubação, os tubos foram colocados por 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 18.928 x g a 4°C. Foram retirados 200 μL do sobrenadante e colocados em uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em leitor de placa com o comprimento de onda a 535 nm.

Para o cálculo realizamos a subtração das absorbâncias dos pontos da curva e das amostras com o valor do branco. Depois, traçamos a equação da reta para calcular a concentração das amostras. O valor encontrado na equação foi dividido pela quantidade de proteínas encontradas na dosagem pelo método de Lowry, já descrito.

4.5. Análise das defesas antioxidantes

4.5.1. Grupo sulfidrila

À medida que o estresse oxidativo aumenta, os grupos sulfidrila (SH) decrescem, uma vez que são considerados grupos típicos de proteínas que podem formar ligações dissulfeto quando são oxidadas (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

O tecido foi homogeneizado usando 100 mg de tecido para 1 mL de solução Tris-HCL 0,2 M (pH = 8,2). No método, esses grupos presentes nas amostras reagem com os reagentes DTNB (ácido 2-nitrobenzóico) à 0,01M e metanol, o qual em pH neutro ou alcalino, se ioniza em NTB^{2-} resultando num composto de cor amarela. No padrão utilizou-se o reagente L-cisteína em conjunto com a solução trietanolamina (TEA) à 0,02 M em diluições seriadas. As amostras, o branco e o padrão foram agitados no vórtex e centrifugados à 189 x g por 15 minutos em temperatura ambiente. A coleta do sobrenadante foi realizada e a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 412 nm foi feita em uma cubeta de quartzo. Em seguida, uma curva foi plotada com os dados de L-cisteína e das absorbâncias para a geração da equação da

reta e posterior determinação da concentração dos grupos sulfidrilas. Os valores foram normalizados usando a determinação de proteínas totais no mesmo homogenato

4.6. Análise perfil Inflamatório

4.6.1. Dosagem de citocinas

O método imunoenzimático de ELISA por meio de kits comerciais da *Peprotech*® (Rocky Hill, NJ, EUA e Biorbyte, Cambridge, UK) utilizando amostras de soro foi selecionado para a dosagem das citocinas inflamatórias, IL-6 e TNF.

A dosagem foi realizada em microplacas de 96 poços onde ocorreu a sensibilização com 50 µL dos anticorpos de captura monoclonais diluído para cada citocina e após isso, os alvos de ligação não específicos foram bloqueados com 300 µL/poço de 1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) em meio à solução de tampão fosfato e lavados 4 vezes com 300 µL do tampão de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS 1x). Em seguida, as amostras foram adicionadas, 25 µL de soro e 50 µL dos padrões para cada poço e os anticorpos de detecção biotinizados (50 µL/poço) também. Após um período de incubação, a peroxidase ligada à avidina é incluída (50 µL/poço) nas placas.

Por fim, para as leituras das absorbâncias foi inserido 50 µL/poço de cromógeno recomendado pelo fabricante e feita correção do comprimento de onda do espectrofotômetro de 405nm para 650nm (Endpoint Emax, Molecular Devices, Rochester, NY, EUA). No cálculo final das concentrações foi multiplicado por 2 a dosagem de amostras (25 µL) a fim de igualar com a dosagem do padrão (50 µL).

4.6.2. Avaliação da expressão gênica da via do inflamassoma

4.6.2.1 *Oligonucleotídeos iniciadores (primers)*

Os iniciadores utilizados para amplificar os genes de NLRP3, Casp-1, IL-1 β , IL-18 e a beta actina foram desenhados com base nas sequências de mRNA disponíveis no banco de dados “Mouse Genome Database” (MGD disponível em <http://www.informatics.jax.org/genes.shtml>) e com o auxílio do NCBI/Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), conforme Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a análise de qRT-PCR

Gene	Primer
NLRP3	F ^o GGCGAGACCTCTGGGAAAAA
	R ^o CCAGCAAACCCATCCACTCT
Casp-1	F ^o CTGGGACCCTCAAGTTTTGCC
	R ^o GGCAAGACGTGTACGAGTGGT
IL-1β	F ^o AGAGCCCATCCTCTGTGACT
	R ^o GGAGCCTGTAGGTGCAGTTGT
IL-18	F ^o ATTTTACTATCCTTCACCGAGAGG
	R ^o TGTTCGAGGATATGACTGATATTGA
Actb	F ^o CACTGTCGAGTCGCGTCCA
	R ^o TCATCCATGGCGAACTGGTG

Abreviação: *IL-1 β* : interleucina 1 beta; *IL-18*: interleucina 18; *Casp-1*: caspase 1; *NLRP3*: gene que codifica proteína da família NLR; *Actb*: beta actina.)

4.6.2.2 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído do fígado dos camundongos empregando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI) conforme as instruções do fabricante.

Mediu-se a quantidade do RNA extraído no comprimento de onda 260 nm, levando em conta a relação entre os comprimentos de onda 260/280 como indicativo de pureza e a relação 260/230 como indicativo de contaminação. Razões acima de 1,8 foram consideradas para a quantificação da expressão dos genes (MANCHESTER, 1996; GALLAGHER; DESJARDINS, 2006; BECKER e col., 2010). Além disso, foi averiguada a integridade do RNA em gel de agarose.

4.6.2.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

O ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total extraído usando o Kit *Capacity cDNA reverse transcription* contendo: RT Buffer 10x; dNTPMix25x; Random primers 10X; MultiScribe Reverse Transcriptase, de acordo com as instruções do fabricante.

No preparo das amostras, a fim de se obter 20 μ L de volume final, adicionou-se para cada 2 μ g de RNA total extraído (10 μ L), 2 μ L de RT Buffer 10 \times , 2 μ L de primers randômicos (10 \times RT Random primer), 0,8 μ L de dNTPs [25 \times dNTP Mix (100mM)], 1 μ L de enzima

transcriptase reversa (Multi Scribe® Reverse Transcriptase- 50 U/ μ L) e 4,2 μ L de água livre de RNase.

Em seguida, foram incubadas no termociclador (Biocycler, modelo MJ96+), seguindo as etapas: 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, para a síntese do cDNA e após armazenadas a -20°C até serem utilizadas.

4.6.2.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR) foi utilizada para a análise da expressão gênica dos genes em estudo. Em placas de 96 poços, a fim de se obter um volume final de 10 μ L foi inserido em cada poço 1 μ L de cDNA diluído 5x em água livre, 0,5 μ L de cada *primer* (*forward e reverse*, 10 μ M), 5 μ L *Power* de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 3 μ L de água livre de DNase.

Posteriormente, a placa foi inserida no aparelho ABI 7300 Applied Biosystems® e a reação se deu de acordo com sua programação. Após a reação, foram obtidas curvas de dissociação do produto que confirmava a especificidade de cada um.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (Cq comparativo ou Δ Cq), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da diferença entre ele e a expressão do gene de referência (Actb).

4.7. Análise Histológica

O fígado foi armazenado em tampão de formol a 4% para conservação. O tecido hepático foi fixado e processado em uma série crescente de álcoois e, em seguida, embebido em parafina. Foram obtidas em micrótomo semiautomático secções parafinadas por volta de 04 μ m e montadas as lâminas, nas quais foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE). Utilizou-se o microscópio óptico Leica® acoplado a câmera digital DM5000, com o software de análises Leica Application Suite® do Laboratório Multiusuários de Microscopia Avançada e Microanálise no Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto para a obtenção de fotomicrografias. Foram obtidas 20 imagens para cada lâmina correspondente a um animal. A análise morfométrica quantitativa das áreas de

necrose foi auxiliada pelo software ImageJ®, versão 1.32j. Enquanto a qualitativa realizou-se por ferramentas manuais envolvendo o número de pixels.

4.8. Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (dados paramétricos). Utilizou-se $P < 0,05$ como valor de significância e o teste estatístico one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Em relação a estatística das correlações utilizou-se para os dados paramétricos a correlação de Pearson entre os grupos experimentais. Já para os dados não paramétricos a correlação de Spearman. Considerando que $r > 0,05$ positivo se refere a uma correlação forte e os valores significativos com $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Prism® versão 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. Marcadores de função hepática

Para avaliar a intoxicação pelo paracetamol (APAP) realizamos a dosagem sérica das enzimas transaminases ALT (A) e AST (B). Em relação a atividade das enzimas, não foi observada diferença no grupo APAP 3h quando comparado ao grupo controle, entretanto observamos um aumento significativo após 12 horas de exposição ao fármaco, sugerindo uma lesão hepática após este período de tempo (Figura 7).

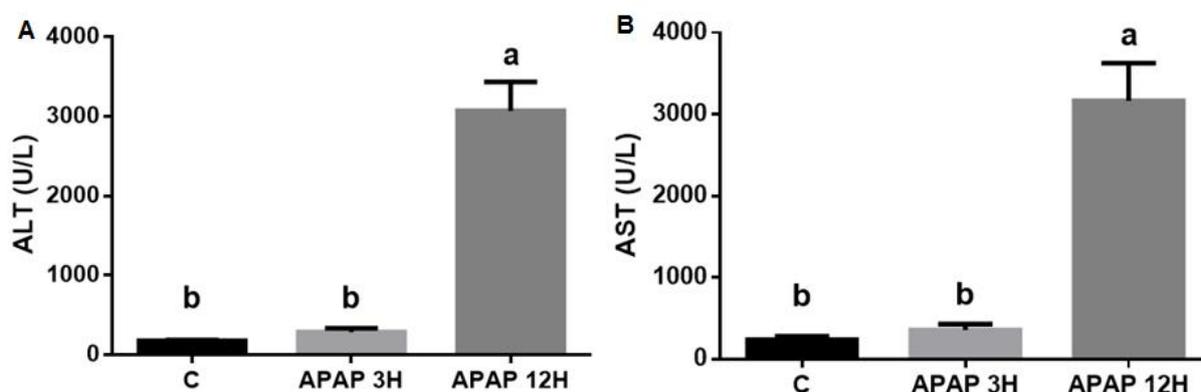


Figura 7. Avaliação da função hepática através da atividade de ALT e AST em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós

teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase.

5.2. Avaliação da histoarquitetura hepática

Na avaliação da histoarquitetura hepática, observamos que o grupo controle (figura 8.A) apresenta os hepatócitos íntegros e similar ao perfil saudável do fígado. Após a intoxicação dos animais com o paracetamol, observamos alterações nas células hepáticas. Em 3 horas (figura 8.B) encontramos discretas áreas de necrose na região centro-lobular. Já em 12 horas (figura 8.C) observamos um aumento das áreas de necrose na região centro-lobular, sendo esses dados compatíveis com o perfil de intoxicação hepática pelo paracetamol. Em relação à quantificação da área de necrose (figura 8.D), observamos um aumento no grupo APAP 12h quando comparado ao grupo APAP 3h e grupo controle.

A capacidade de regeneração tecidual foi avaliada pelo índice de binucleação (figura 8.E) e observamos que no grupo APAP 12 h houve um decréscimo com diferença significativa se comparado aos outros grupos avaliados.

Em relação ao índice de hiperemia, observamos um aumento significativo no grupo APAP 12 h (figura 8.F) quando comparado com os grupos APAP 3 h e grupo controle.

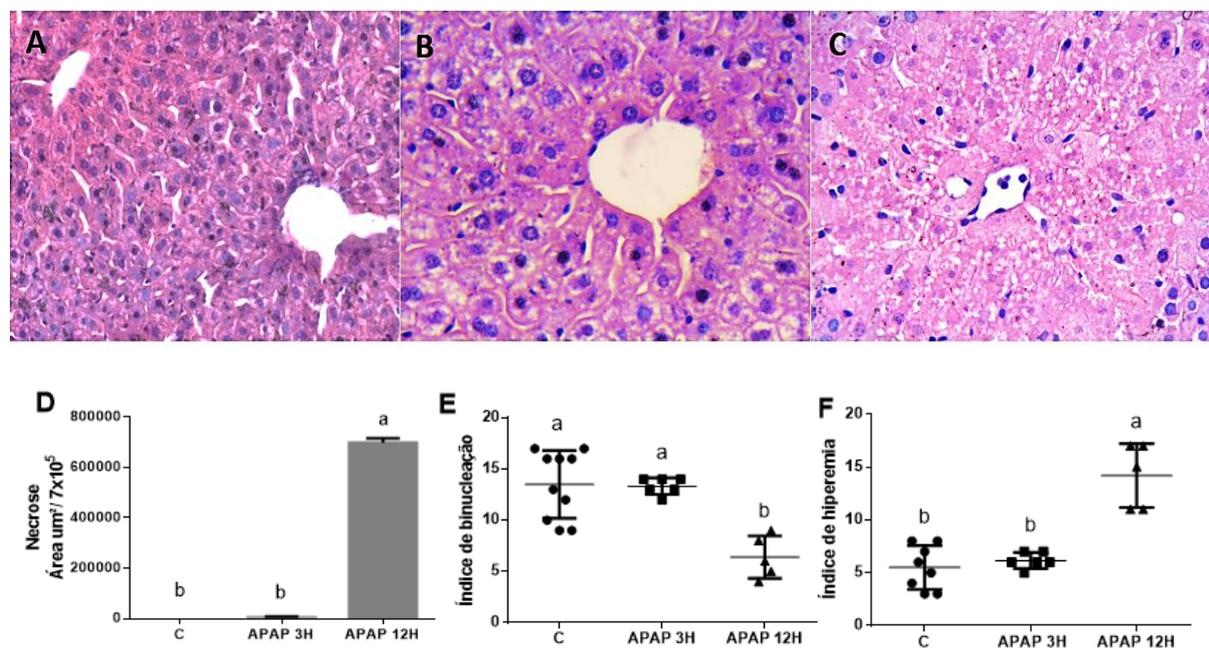


Figura 8. Avaliação da histoarquitetura hepática em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol. (A) fotomicrografia representativa do grupo controle, (B) fotomicrografia representativa grupo APAP 3H, (C) fotomicrografia representativa grupo APAP 12H, (D) representa a análise quantitativa das áreas de necrose, (E) análise quantitativa do índice de binucleação dos hepatócitos e (F) análise quantitativa do índice

de hiperemia. A área de necrose foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. A binucleação e hiperemia foram avaliados pelo teste exato de Fisher. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.3. Marcadores de função renal

Os marcadores de função renal utilizados para a avaliação da nefrotoxicidade por APAP foram as dosagens séricas de creatinina (A) e de ureia (B) (Figura 9). No período de 3 horas e 12 horas houve um aumento significativo da creatinina em relação ao grupo controle. Já na quantificação de ureia, observamos um aumento desse metabólito apenas 12 horas após a intoxicação.

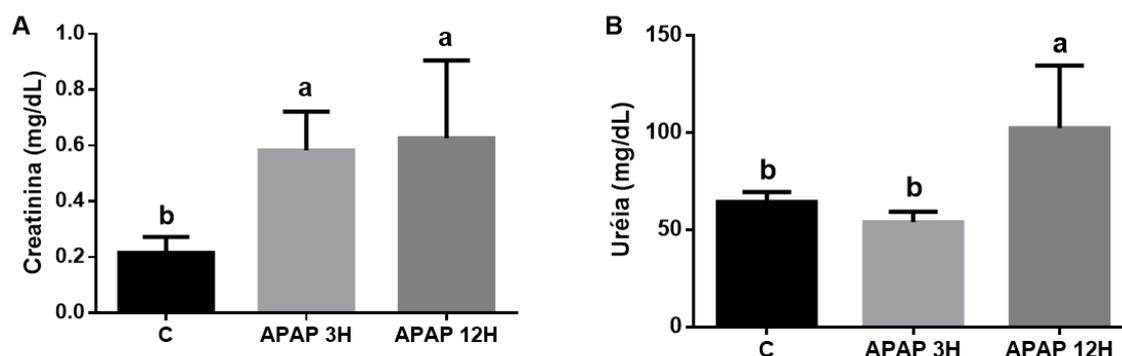


Figura 9 Avaliação da função renal através da concentração de creatinina e ureia em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.4. Biomarcadores do dano oxidativo

A quantificação de proteína carbonilada (A) e ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) caracterizaram os marcadores de dano oxidativo na intoxicação por APAP (Figura 10). No período de 3 horas e 12 horas houve um aumento significativo da quantidade de TBARS em relação ao grupo controle. Já na quantificação de proteína carbonilada houve um aumento significativo apenas após 12 horas de intoxicação.

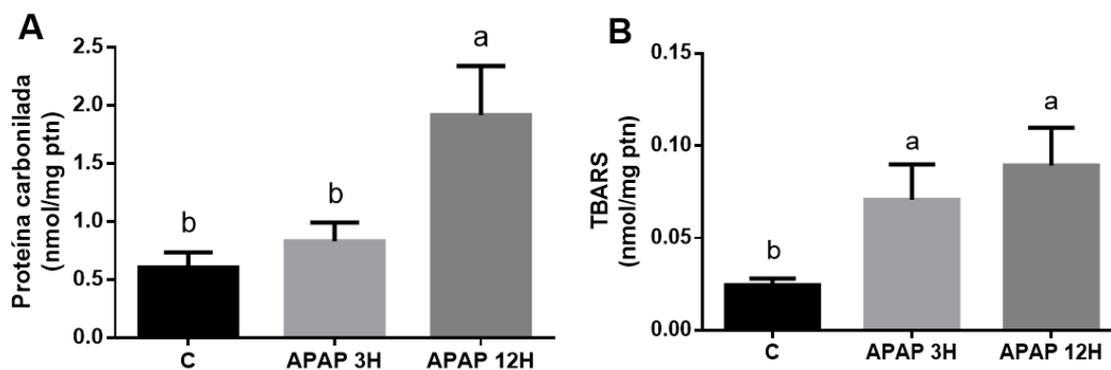


Figura 10 Avaliação da concentração total de proteína carbonilada e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.5. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a capacidade antioxidante após a hepatotoxicidade do APAP utilizou-se a dosagem total dos grupos sulfidrila (-SH) (A) (Figura 11). Observou-se uma redução de grupamentos sulfidrila em 12 horas após a intoxicação, mas nenhuma alteração foi observada no período de 3 horas, sugerindo uma diminuição do potencial redutor hepático apenas em um período de exposição maior ao fármaco.

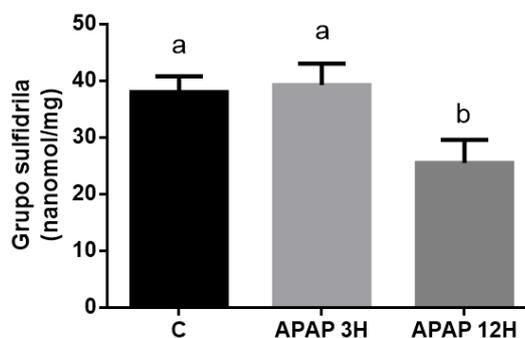


Figura 11. Avaliação da concentração total de grupos sulfidrila em camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol (500mg/kg). A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.6. Perfil Inflamatório

5.6.1. Avaliação da expressão gênica dos componentes da Via do Inflamassoma

Na análise dos componentes da via do inflamassoma, é possível observar que a expressão de NLRP3 (figura 12.A), CASP-1 (figura 12.B), IL-1 β (figura 12.C) e IL-18 (figura

12.D) estão aumentados em 12 horas de intoxicação e apresenta uma diferença significativa se comparada ao grupo APAP 3H e ao grupo controle. Todavia, os níveis de CASP-1 (figura 12.B) e IL-18 (figura 12.D) reduziram expressivamente em 3 horas de exposição ao fármaco comparada aos outros grupos.

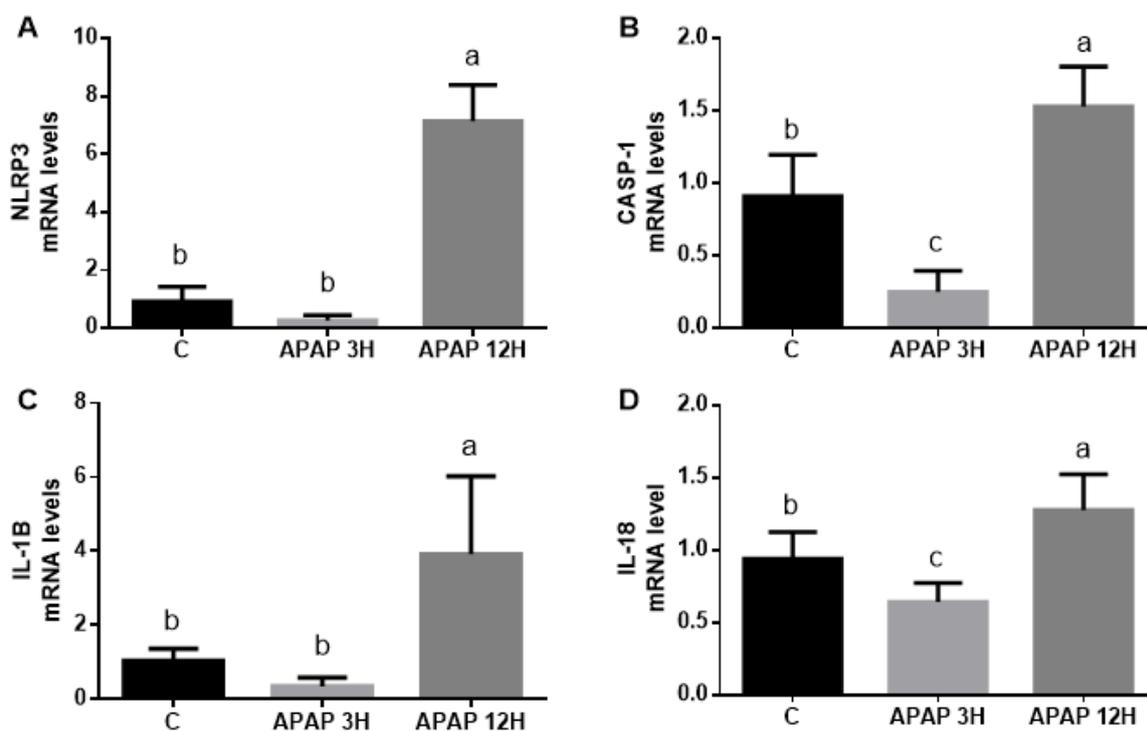


Figura 12. Os efeitos do APAP na via do inflamassoma em fígado de camundongos intoxicados com paracetamol. O nível de mRNA de NLRP3 (A), CASP-1 (B), IL-1 β (C), IL-18 (D), quantificados por PCR em tempo real. A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.6.2. Dosagem de citocinas

A respeito das citocinas pró-inflamatórias, observamos que tanto os níveis de TNF como de IL-6 aumentam ao longo do tempo. Em 12 horas de intoxicação tem-se um aumento com uma diferença significativa comparado ao grupo APAP 3H e grupo controle (Figura 13).

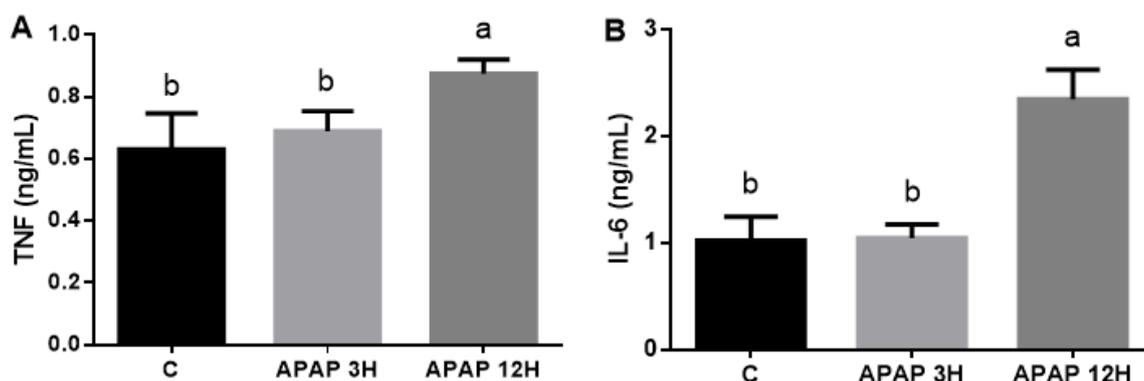
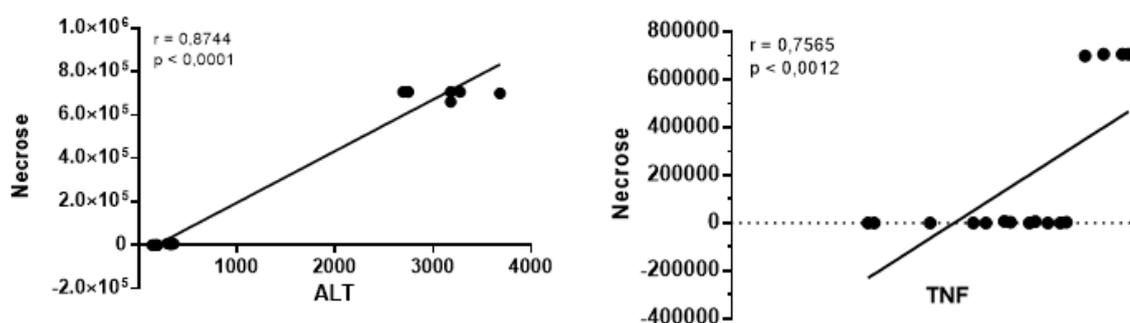


Figura 13. Avaliação dos níveis de TNF (A) e IL-6 (B) em fígado de camundongos C57BL/6 intoxicados com paracetamol. A análise estatística foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA e o pós teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.7. Análise de correlação dos parâmetros avaliados

Em uma análise de correlação entre os dados apresentados, na qual estatisticamente o $r > 0,5$ e mais próximo de 1 representa uma forte correlação. Na figura 14, avaliamos que a correlação entre necrose e ALT, ($r=0,8744$ e $p < 0,0001$), necrose e TNF ($r=0,7565$ e $p < 0,0012$), IL-6 e TNF ($r=0,6239$ e $p < 0,0453$) bem como hiperemia e IL-6 ($r=0,6775$ e $p < 0,00177$) apresentou uma forte correlação positiva e significativa. Enquanto que ao correlacionar necrose e o índice de binucleação ($r = -0,8246$ e $p < 0,0001$) obtivemos também uma forte correlação significativa, entretanto negativa.



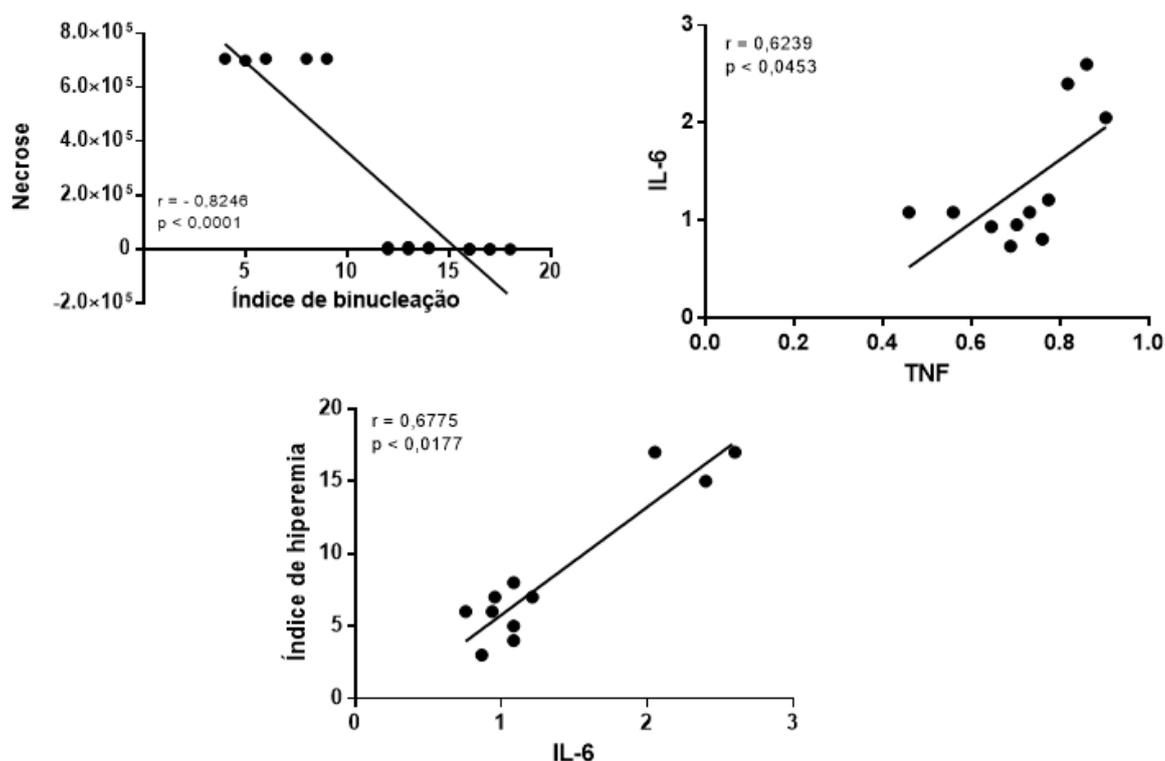


Figura 14. Gráficos de dispersão ilustrando a correlação de Pearson entre os grupos experimentais (paramétricos) e correlação Spearman (não paramétricos). Valores de $r > 0,5$ possuem forte correlação. Foram considerados valores significativos $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados diferentes parâmetros em uma análise temporal da intoxicação por APAP, sendo que os resultados obtidos demonstraram que a hepatotoxicidade resulta em alterações no estado redox das células, alterações bioquímicas bem como a ativação da resposta inflamatória ao longo do tempo.

As transaminases hepáticas ALT e AST são enzimas presentes no fígado e importantes marcadores de lesão hepática. Elas extravasam para o sangue em decorrência do rompimento dos hepatócitos geralmente devido a morte celular por necrose. Na intoxicação de 500 mg/kg de APAP, em 3 horas não observamos uma diferença significativa nos níveis de ALT e AST. O mesmo ocorreu utilizando-se a mesma dosagem de fármaco no estudo de (LI et al., 2019) em 2 horas de exposição. No entanto, após 12 horas de exposição os níveis séricos dessas enzimas aumentaram significativamente. Dados similares utilizando a mesma dosagem e tempo de exposição ao fármaco são demonstrados no estudo de (MINSART et al., 2020).

Os rins são os principais órgãos responsáveis pela excreção de xenobióticos. Na intoxicação por APAP eles torna-se vulnerável as lesões, ao interferir diretamente nas

concentrações de ureia e creatinina, importantes biomarcadores da função renal (GUPTA et al., 2017). Nas análises de nefrotoxicidade do presente estudo, observamos que a partir de 3 horas de intoxicação com 500 mg/kg de APAP houve um aumento significativo na concentração sérica de creatinina. Dado observado até mesmo em menores doses, cerca de 200 mg/kg, e em poucas horas de intoxicação (HUSSAIN et al., 2019). Em relação aos níveis séricos de ureia, ocorreu um aumento significativo em 12 horas de exposição ao fármaco, como esperado e demonstrado em (HART et al., 1994) numa dose administrada de 600mg/kg de paracetamol. Demonstramos assim que além da hepatotoxicidade, a intoxicação por paracetamol também afeta a função renal consideravelmente.

A morte dos hepatócitos por necrose é uma característica bem estabelecida decorrente da lesão hepática ao longo do tempo de intoxicação pelo APAP. No tempo de 3 horas de exposição ao fármaco não foi encontrada diferença estatística, embora na histoarquitetura por H&E apresentasse discreta área necrótica. Em contrapartida no tempo de 12 horas configurou-se uma extensa área de necrose, como demonstrado no estudo de (BANDEIRA et al., 2017). No estudo de (BHUSHAN et al., 2014) encontra-se dados semelhantes no tempo de 3 e 12 horas de exposição ao fármaco, o que corrobora com a avaliação qualitativa e na quantificação do grau de necrose do nosso estudo. Esses dados encontrados foram similares aos das enzimas hepáticas. Nesse sentido, observamos que existe uma forte correlação positiva e significativa ($r=0,8744$ e $p < 0,0001$) entre a necrose e a transaminase ALT, ou seja, quanto maior os níveis séricos de ALT maior será o índice de necrose, sendo essa correlação um indicativo de lesão hepática.

O fígado após sofrer um dano, como a overdose de paracetamol, possui a capacidade de se regenerar. A regeneração tecidual dos hepatócitos, ocorre na tentativa de proliferar as células não lesadas e assim não levá-las à morte celular. Com isso, analisamos a capacidade de regeneração tecidual ao quantificar o índice de binucleação dos hepatócitos. Em nosso estudo, houve um decréscimo desse parâmetro após 12 horas de intoxicação. Nesse sentido, ao correlacionar o índice de binucleação e necrose observamos uma forte correlação, mas negativa ($r = -0,8246$ e $p < 0,0001$), pois à medida que a necrose aumenta a capacidade das células binuclearem diminui, sendo parâmetros inversamente proporcionais.

Os mecanismos celulares em que a necrose está inserida desencadeia outros processos celulares, como a inflamação. Ela é caracterizada pela vasodilatação dos vasos ao aumentar o fluxo sanguíneo, local para a passagem de células inflamatórias, conhecido como hiperemia. Esse parâmetro em nosso estudo foi quantificado e se apresentou de forma significativa nos

seios hepáticos com 12 horas de exposição ao fármaco. Estudos como o de (JIANG et al., 2016) sugere que em doses menores (400 mg/kg), a partir de 6 horas de exposição já é possível encontrar esse tipo de sinal devido a intoxicação por paracetamol. Nesse sentido, pode-se correlacionar o aumento da necrose com o aumento da resposta inflamatória, tanto pela variável da hiperemia como de TNF e IL-6. Assim, nossos resultados mostram uma correlação significativa e forte entre necrose e TNF ($r=0,7565$ e $p < 0,0012$), bem como entre hiperemia e IL-6 ($r=0,6775$ e $p < 0,00177$).

No processo de inflamação ocorre a ativação de importantes citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6 que aumentam a resposta imune, mas de forma exacerbada podem contribuir para o progresso da hepatotoxicidade (HU et al., 2019). Isso é observado em nosso estudo, em que a dosagem sérica dessas citocinas aumentou significativamente em 12 horas de intoxicação. Dados similares a esse são encontrados no estudo de (FU et al., 2018) em uma menor dose, cerca de 300 mg/kg. Nossos resultados sugerem que o aumento de TNF está relacionado com o aumento de IL-6 por essas duas variáveis possuírem uma forte correlação significativa e positiva ($r = 0,6239$ e $p < 0,0453$), sugerindo assim a importância delas na modulação da inflamação na intoxicação por APAP.

Entre as principais consequências da intoxicação por paracetamol está o desequilíbrio do estado redox. Sabe-se que os radicais livres produzidos em excesso, levam a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas. Na avaliação desses componentes utilizando o doseamento das substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS) e proteínas carboniladas constatamos um aumento significativo em 12 horas, como constatado no estudo de (BANDEIRA et al., 2017c) na mesma dosagem de APAP (500mg/kg) que a utilizada no nosso estudo. Importante ressaltar que, em menor tempo de exposição ao paracetamol também foi possível observar o aumento de TBARS como retratado em nossos resultados e na literatura em (YE et al., 2014).

Em contrapartida, o sistema antioxidante do organismo é prejudicado e causa uma diminuição em seus componentes enzimáticos e não enzimáticos, como a glutathiona (GSH), o componente essencial para a detoxificação do APAP (GUO et al., 2019). A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo, em que o aminoácido cisteína possui o grupamento sulfidrila (-SH) em sua cadeia lateral. Proteínas também possuem esse grupamento ligado ao carbono (grupo tiol) e quando oxidadas formam ligações covalentes. Com isso, à medida que os grupos sulfidrila (-SH) diminuem, o estresse oxidativo aumenta (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Dessa forma, a concentração desses grupos foi determinada em nosso estudo e verificou-se que em 12 horas de

intoxicação por paracetamol eles diminuíram de forma significativa, enquanto em 3 horas não foi possível observar essa alteração.

O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico pertencente à resposta imune inata que se ativa ao reconhecer quaisquer sinais de dano as células. Estudos mostram que a hepatotoxicidade causada pelo APAP está relacionada com ativação desse complexo (SHARMA et al., 2016) (YANG et al., 2019). O receptor NLRP3 reconhece os sinais de perigo e ativa a enzima CASP-1 que cliva as citocinas pró IL-1 β e pró IL-18 para torna-las ativas e exercerem suas funções (KIM; PARK, 2018). Em nosso estudo, observamos um aumento da expressão gênica de todos os componentes da via do inflamassoma após 12 horas de intoxicação. Foi observado em pesquisa anterior que após 24 horas de exposição ao fármaco mesmo em doses menores de paracetamol (180 mg/kg e 300 mg/kg) os níveis do mRNA de NLRP3, CASP-1, IL-1 β e IL-18 estão aumentados, bem como na dose utilizada em nosso estudo (500mg/kg), corroborando com os nossos resultados (SHAN et al., 2019).

Assim, 12 horas após a intoxicação com APAP existe um agravamento da lesão hepática observada pelo aumento do índice de necrose e um prejuízo na regeneração hepática (redução do índice de binucleação), culminando no extravasamento sérico de ALT e AST. Essa lesão hepática pode estar associada ao aumento do estresse oxidativo (observado neste estudo pelo aumento de TBARS e proteína carbonilada e redução de grupamentos sulfidrilas), ativação da via do inflamassoma e liberação de mediadores inflamatórios, como TNF e IL-6 (Figura 15.)

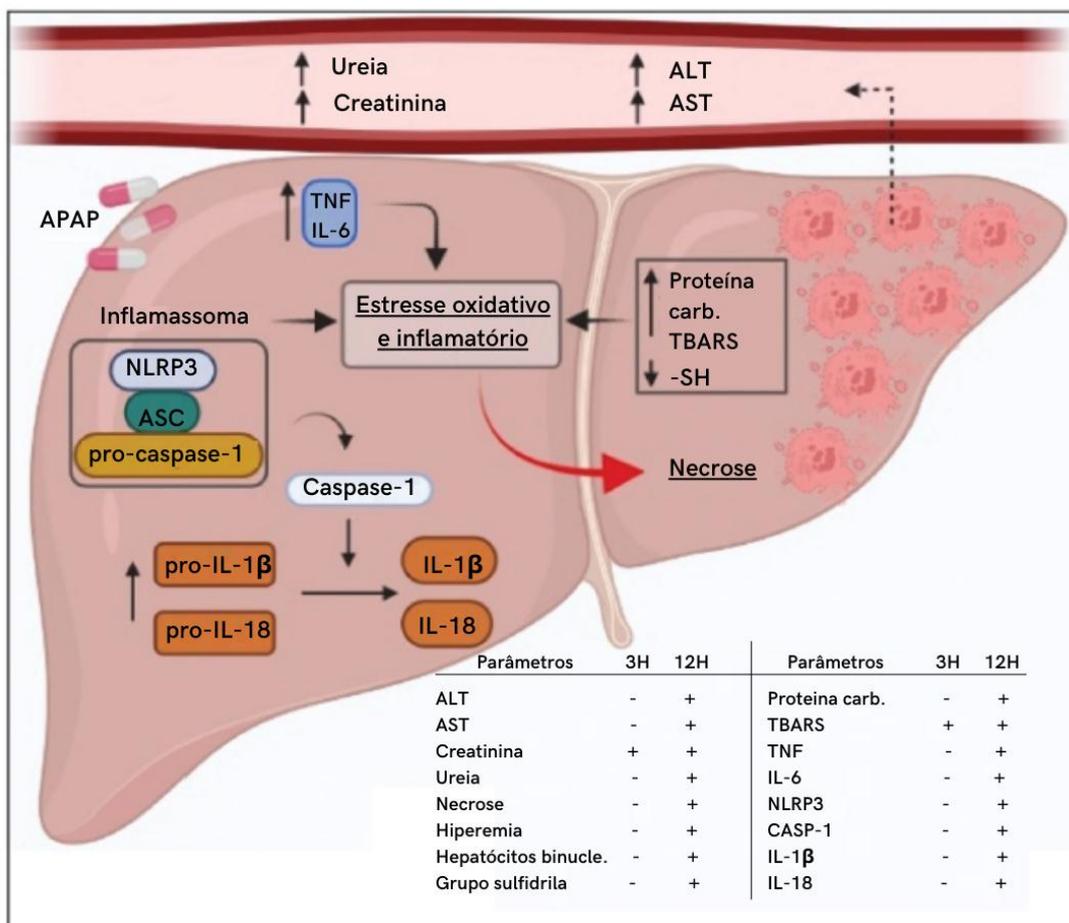


Figura 15. Representação da hepatotoxicidade do paracetamol após 12 horas de intoxicação. Devido ao estresse oxidativo e inflamatório que resultam na necrose e dificuldade de regeneração dos hepatócitos, há o extravassamento e aumento de ALT, AST na corrente sanguínea, interferindo também nos níveis ureia e creatinina no sangue. Marcadores do estado redox como proteína carbonilada, TBARS e grupos sulfidrila estão modificados. A via do inflamassoma ativada através do complexo NLRP3, ASC e pro-caspase-1 induz a caspase-1 a clivar as interleucinas pro-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas ativas modulando a resposta inflamatória causada pela lesão hepática. Além dos níveis de IL-6 e TNF que também se alteram em 12 horas (Adaptado de (COELHO et al., 2022)).

7. CONCLUSÃO

O paracetamol em altas doses pode induzir nefro e hepatotoxicidade, os quais se agravam com o decorrer do tempo de exposição ao fármaco. Assim, algumas alterações bioquímicas foram observadas já nas primeiras horas de intoxicação, entretanto no período de 12 horas todos os parâmetros avaliados neste estudo encontraram-se alterados.

Além disso, a análise dos resultados obtidos neste modelo experimental nos permite refletir sobre a importância do rápido atendimento ao paciente e que a identificação precoce da intoxicação pelo fármaco pode ser fundamental para minimizar a evolução das lesões no indivíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GHAMDI, T. H.; SHAFEK ATTA, I. Efficacy of interleukin-6 in the induction of liver cell proliferation after hemi-hepatectomy: histopathologic and immunohistochemical study. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 13, n. 7, p. 1540–1549, 2020.

ALVARELLOS, M. L. et al. PharmGKB summary. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 25, n. 12, p. 622–630, 2015.

ARAUZ, J.; RAMOS-TOVAR, E.; MURIEL, P. **Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside** *Annals of Hepatology* Fundacion Clinica Medica Sur, , 1 mar. 2016.

BANDEIRA, A. C. B. et al. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1057–1065, 2017a.

BANDEIRA, A. C. B. et al. Lycopene inhibits reactive oxygen species production in SK-Hep-1 cells and attenuates acetaminophen-induced liver injury in C57BL/6 mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p. 7–17, 2017b.

BANDEIRA, A. C. B. et al. Lycopene inhibits reactive oxygen species production in SK-Hep-1 cells and attenuates acetaminophen-induced liver injury in C57BL/6 mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p. 7–17, 2017c.

BARTESAGHI, S.; RADI, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. **Redox Biology**, v. 14, p. 618–625, 2018.

BHUSHAN, B. et al. Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 11, p. 3013–3025, 2014.

BHUSHAN, B.; APTE, U. **Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities** *American Journal of Pathology* Elsevier Inc., , 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30653954/>>. Acesso em: 12 set. 2020

BOGDANOS, D. P.; GAO, B.; GERSHWIN, M. E. Liver Immunology Dimitrios. **Comperative Physiology**, v. 3, n. 2, p. 567–598, 2013.

ÇELİK, A. et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2018.

COELHO, A. M. et al. Temporal analysis of paracetamol-induced hepatotoxicity. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2022.

DAVIDSON, D. G. D.; EASTHAM, W. N. Acute Liver Necrosis Following Overdose of Paracetamol. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5512, p. 497–499, 27 ago. 1966.

EMEIGH HART, S. G. et al. **Acetaminophen Nephrotoxicity in CD-1 Mice. I. Evidence of a Role for in Situ Activation in Selective Covalent Binding and Toxicity** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1994.

FU, C. LIN et al. Platycodin D protects acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting hepatocyte MAPK pathway and apoptosis in C57BL/6J mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 867–877, 2018.

GU, X.; MANAUTOU, J. E. **Molecular mechanisms underlying chemical liver injury** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 3 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306029>>. Acesso em: 4 maio. 2020

GUO, H. et al. Shikonin attenuates acetaminophen-induced acute liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 112, n. February, p. 108704, 2019.

GUPTA, G. et al. Nephrotoxicity in Rats Exposed to Paracetamol : The Protective Role of Morabosteroid , a Steroidal Glycoside. v. 36, n. 2, p. 113–119, 2017.

HEDELAND, R. L. et al. Risk factors and characteristics of suicide attempts among 381 suicidal adolescents. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 105, n. 10, p. 1231–1238, 1 out. 2016.

HU, J. N. et al. **Ginsenoside Rk1 ameliorates paracetamol-induced hepatotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, nitrate stress and apoptosis**. [s.l.] The Korean Society of Ginseng, 2019. v. 43

HUSSAIN, Z. et al. Protective effects of Cinnamomum zeylanicum L. (Darchini) in acetaminophen-induced oxidative stress, hepatotoxicity and nephrotoxicity in mouse model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. August 2018, p. 2285–2292, 2019.

IMAEDA, A. B. et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 305–314, 2009.

JAESCHKE, H. et al. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity - A clinically relevant model to test the efficacy of natural products. **Life Sciences**, v. 88, n. 17–18, p. 737–745, 2011.

JIANG, Y.-M. et al. Schisandrol B protects against acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice via activation of the NRF2/ARE signaling pathway. **Nature Publishing Group**, v. 37, p. 382–389, 2016.

KIM, E. H.; PARK, P. H. Globular adiponectin protects rat hepatocytes against acetaminophen-induced cell death via modulation of the inflammasome activation and ER stress: Critical role of autophagy induction. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 278–292, 2018.

LI, S. et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087–26124, 2015.

LI, Y. et al. Chlorpromazine protects against acetaminophen-induced liver injury in mice by modulating autophagy and c-Jun N-terminal kinase activation. **Liver Research**, v. 3, n. 1, p. 65–74, 2019.

LICATA, A. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. **European Journal of Internal Medicine**, v. 28, p. 9–16, 2016.

LIEBERT, M. A.; JONES, D. P. Clinical Measures of the Balance. v. 8, 2006.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGHT, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 e 275, 1951.

MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1971–1982, 2012.

MCNULTY, R. et al. Fewer adverse effects with a modified two-bag acetylcysteine protocol in paracetamol overdose. **Clinical Toxicology**, v. 56, n. 7, p. 618–621, 2018.

MINSART, C. et al. N-acetylcysteine and glycyrrhizin combination: Benefit outcome in a murine model of acetaminophen-induced liver failure. **World Journal of Hepatology**, v. 12, n. 9, p. 596–618, 2020.

MITTAL, B. et al. **Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 71

MOLES, A. et al. Mitochondrial-lysosomal axis in acetaminophen hepatotoxicity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018.

PAULA, A. RESSALVA autor (a) , o texto completo desta tese. 2017.

PHOLMOO, N.; BUNCHORNTAVAKUL, C. Characteristics and Outcomes of Acetaminophen Overdose and Hepatotoxicity in Thailand. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 7, n. X, p. 1–8, 28 jun. 2019.

RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Acetaminophen Hepatotoxicity. **Seminars in Liver Disease**, v. 39, n. 2, p. 221–234, 2019.

RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. A mitochondrial journey through acetaminophen hepatotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 140, p. 111282, 2020.

ROE, K. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 2, p. 6–10, 2021.

SANTO, A.; ZHU, H.; LI, Y. R. Free Radicals: From Health to Disease. **Reactive Oxygen Species**, n. October, 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. C, p. 192–205, 1968.

SHAN, S. et al. Mitophagy protects against acetaminophen-induced acute liver injury in mice through inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 169, p. 113643, 2019.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.

SIES, H. **Oxidative Stress: Introductory Remarks**. [s.l.] PERGAMON PRESS INC., 1985.

SILVA, L. B. et al. The Role of TNF- α as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, n. 1, p. 332–338, 2019.

SINGH, A.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P. Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity. **Journal of Clinical Toxicology**, v. 04, n. 01, p. 1–19, 2011.

STAVROPOULOU, E.; PIRCALABIORU, G. G.; BEZIRTZOGLU, E. **The role of cytochromes P450 in infection** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 31 jan. 2018.

THUSIUS, N. J.; ROMANOWICZ, M.; BOSTWICK, J. M. Intentional or Inadvertent Acetaminophen Overdose—How Lethal It Really Is? **Psychosomatics**, v. 60, n. 6, p. 574–581, 2019a.

THUSIUS, N. J.; ROMANOWICZ, M.; BOSTWICK, J. M. Intentional or Inadvertent Acetaminophen Overdose—How Lethal It Really Is? **Psychosomatics**, 2019b.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. **The liver** *Current Biology* Cell Press, , 6 nov. 2017a.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. In: **Current Biology**. [s.l.] Cell Press, 2017b. v. 27p. R1147–R1151.

WIFFEN, P. J. et al. **Oral paracetamol (acetaminophen) for cancer pain** *Cochrane Database of Systematic Reviews* John Wiley and Sons Ltd, , 12 jul. 2017.

WOOLBRIGHT, B. L.; JAESCHKE, H. **Role of the inflammasome in acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure** *Journal of Hepatology* Elsevier B.V., , 1 abr. 2017.

XIE, K. et al. Loss of Life Expectancy by 10 Years or More From Elevated Aspartate Aminotransferase. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 114, n. 9, p. 1478–1487, 2019.

YANG, Y. et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 in inflammasome activation and its inhibitors. **Cell Death and Disease**, 2019.

YOON, E. et al. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 4, n. 2, p. 131, 28 jun. 2016.

ANEXOS

Anexo 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da piperina no fígado de camundongos C57Bl/6 intoxicados por paracetamol", protocolada sob o CEUA nº 5402121118 (ID 000120), sob a responsabilidade de **Daniela Caldeira Costa Calsavara** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 23/11/2018.

We certify that the proposal "Effect of piperine on the liver of C57Bl/6 mice intoxicated with acetaminophen", utilizing 123 isogenics mice (123 males), protocol number CEUA 5402121118 (ID 000120), under the responsibility of **Daniela Caldeira Costa Calsavara** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 11/23/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [02/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos	idade:	8 a 12 semanas	N:	123
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	C57Bl/6						

Local do experimento: Os animais durante o período de experimentação serão mantidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade federal de Ouro Preto (UFOP). Para a realização das eutanásias, os animais serão direcionados para o Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) situado no prédio ICEB da mesma instituição.

Ouro Preto, 23 de novembro de 2018

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Anexo 2



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado “**Análise Temporal da Hepatotoxicidade Induzida pelo Paracetamol**” foi eleito o melhor trabalho da Área de Ciências da Vida apresentado na **XXVIII Seminário de Iniciação Científica** durante o Encontro de Saberes 2020 da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado de modo remoto entre os dias 30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020, na UFOP Aberta.

Autores:

ISABELA FERREIRA QUEIROZ
DANIELA CALDEIRA COSTA CASALVARA
MELINA OLIVEIRA DE SOUZA
ALINE MEIRELES COELHO

Profa. Renata Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação/UFOP
Comissão Organizadora do Encontro de Saberes 2020

Prof. Thiago Cazati
Coordenação Geral da IC/UFOP
Comissão Organizadora do Encontro de Saberes 2020



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Diretoria de Relações Internacionais

Certificamos que o trabalho intitulado “**Análise Temporal da Hepatotoxicidade Induzida pelo Paracetamol: Um olhar sob ótica da Inflamação**” foi eleito *melhor trabalho na Área de Ciências da Vida (CV)* apresentado no **XXIX Seminário de Iniciação Científica** durante o Encontro de Saberes 2021 da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado de modo remoto entre os dias 29 de Novembro a 03 de Dezembro de 2021, na UFOP Aberta.

Autores:

Isabela Ferreira Queiroz, Aline Meireles Coelho, Wanderson Geraldo Lima, André Talvani, Luiza Oliveira Perucci, Daniela Caldeira Costa

Autenticidade



Código: 184220399561e20b5b13dec

Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Krupp
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Prof.ª Dr.ª Tânia Rozal Garcia
Pró-Reitora de Graduação

Renata Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Joaquim Pinheiro Schwartz
Diretor de Relações Internacionais

Natália de Souza Liebke
Pró-reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Temporal analysis of paracetamol-induced hepatotoxicity

Aline Meireles Coelho^a , Isabela Ferreira Queiroz^a, Wanderson Geraldo Lima^a , André Talvani^a, Luiza Oliveira Perucci^b, Melina Oliveira de Souza^c and Daniela Caldeira Costa^a

^aDepartment of Biological Sciences (DECBI), Institute of Exact and Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brazil; ^bCenter for Research in Biological Sciences (NUPEB), Federal University of Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brazil; ^cDepartment of Food (DEALI), School of Nutrition, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Paracetamol-induced hepatotoxicity (APAP) causes severe damage that may be irreversible. Understanding the evolution of liver injury caused by overdose of the drug is important to assist in the treatment. In the present study, we evaluated the acute intoxication by APAP (500 mg/kg) in periods of 3 and 12 hours in C57BL/6 mice through biochemical, histological, inflammatory parameters, and the redox status. The results showed that in the 3-hour period there was an increase in creatinine dosage and lipid peroxidation (TBARS) compared to the control group. In the period of 12 hours after APAP intoxication all parameters evaluated were altered; there was an increase of ALT, AST, and necrosis, besides the increase of redox status biomarkers as carbonylated protein, TBARS, and MMP-9. We also observed activation of the inflammasome pathway as well as a reduction in the regenerative capacity of hepatocytes with a decrease in binucleated liver cells. In cytochrome gene expression, the mRNA level increased in CYP2E1 isoenzyme and reduced CYP1A2 expression. This study indicated that early treatment is necessary to mitigate APAP-induced acute liver injury, and alternative therapies capable of controlling the progression of intoxication in the liver are needed.

ARTICLE HISTORY

Received 3 September 2021
Revised 21 February 2022
Accepted 4 March 2022

KEYWORDS

Paracetamol; acetaminophen; CYP450; redox status; inflammation