



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - DECBI



Giovanna Stéfani Ávila Gonçalves

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL REDOX E METABÓLICO
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO CONSUMO
PROLONGADO DE ETANOL**

Ouro Preto - MG

2026

Giovanna Stéfani Ávila Gonçalves

**INVESTIGAÇÃO DO PERFIL REDOX E METABÓLICO
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO CONSUMO
PROLONGADO DE ETANOL**

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

Orientadora: Profª. Dra. Daniela Caldeira Costa
Coorientadora: Lara Cunha de Melo

Ouro Preto - MG

2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

G635i Gonçalves, Giovanna Stefani Avila.
Investigação do perfil redox e metabólico de camundongos submetidos ao consumo prolongado de etanol. [manuscrito] / Giovanna Stefani Avila Gonçalves. - 2026.
43 f.: il..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Coorientadora: Lara Cunha Melo.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Doença hepática induzida por substâncias e drogas. 2. Metabolismo. 3. Estresse oxidativo. 4. Abuso de Etanol. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Melo, Lara Cunha. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.36

Bibliotecário(a) Responsável: Angela Maria Raimundo - SIAPE: 1.644.803



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovanna Stefani Ávila Gonçalves

Investigação do perfil redox e metabólico de camundongos submetidos ao consumo prolongado de etanol

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

Aprovada em 24 de julho de 2026

Membros da banca

Profa Dra Daniela Caldeira Costa Calsavara - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Lara Cunha de Melo - Co-orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ms Breno Moreira - Universidade Federal de Ouro Preto
Ms César Henrique Pereira - 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 30/07/2026



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/07/2026, às 11:30, 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 **1149748** e o código CRC **39D827AE**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me sustentou até aqui. Mesmo diante dos obstáculos e incertezas, foi Ele quem me guiou, fortaleceu e me concedeu perseverança para seguir em frente, permitindo que eu chegasse a este momento. Sem Ele, nada disso seria possível.

À minha mãe, Elizângela Ávila, expresso minha profunda gratidão por sempre me incentivar a estudar, perseguir meus sonhos e por todo o suporte ao longo da minha trajetória acadêmica. Ao meu pai, Derneley Gonçalves, agradeço por todo o esforço e dedicação para garantir o sustento da nossa família, sendo também um importante suporte para que eu alcançasse esta formação. À minha irmã, Lorrany, agradeço pelo apoio, pela escuta e por sempre torcer por mim.

Ao meu namorado, Mateus Freitas, agradeço por nunca medir esforços para me ver feliz, por sempre me escutar, aconselhar e incentivar nos momentos difíceis. Obrigada por acreditar em mim, me lembrar da minha força e tornar essa trajetória mais leve.

Às amigas que construí ao longo desta trajetória, Alice Maria, Heloisa Rodington, Rayane, Vitória Saggiaro, Nathan Baeta, Júlio Victor, Breno e Bárbara, agradeço pela parceria e por tornarem os dias mais desafiadores em momentos mais leves e especiais.

Deixo meu sincero agradecimento à minha orientadora, Daniela Caldeira, pela confiança, orientação e incentivo durante toda esta trajetória. À minha coorientadora, Lara Cunha, agradeço pela dedicação, pelos ensinamentos e pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. À Renata Rebeca e a toda a equipe do LBM, minha gratidão pelo acolhimento, parceria e por contribuírem para minha formação acadêmica.

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pela formação acadêmica, pelas oportunidades proporcionadas ao longo desta trajetória e pelo apoio institucional, incluindo a concessão da bolsa de iniciação científica pelo Programa Institucional de Pesquisa (PIP/PROPPI).

*“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso!
Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar.”*

– Josué 1:9

RESUMO

A doença hepática associada ao álcool (DHA) é uma importante causa de morbidade e mortalidade, estando relacionada a alterações metabólicas, estresse oxidativo e danos hepáticos decorrentes do consumo excessivo de etanol. O metabolismo do álcool favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo para o desequilíbrio redox e o desenvolvimento de lesões hepáticas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o intervalo entre a última administração de etanol e a eutanásia influencia o perfil metabólico e redox de camundongos C57BL/6 submetidos ao consumo prolongado de etanol. Os animais foram distribuídos em grupos Controle e Etanol, sendo eutanasiados 5 ou 12 horas após a última administração. Foram avaliados os níveis séricos de glicose, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além dos biomarcadores hepáticos de estresse oxidativo, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade da catalase, bem como alterações histopatológicas hepáticas. Os resultados demonstraram ausência de diferenças significativas nos níveis séricos de glicose, triglicerídeos, ALT e AST entre os grupos experimentais nos dois tempos avaliados. Em contrapartida, observou-se aumento significativo dos níveis de TBARS e da atividade da catalase no grupo Etanol após 5 horas da última administração, indicando aumento transitório do estresse oxidativo hepático e ativação da resposta antioxidante. Após 12 horas, esses parâmetros não diferiram do grupo Controle. A análise histopatológica não revelou alterações significativas associadas ao consumo de etanol. Conclui-se que o consumo prolongado de etanol induziu alterações redox hepáticas transitórias, sem promover alterações metabólicas sistêmicas, aumento dos marcadores séricos de lesão hepatocelular ou alterações histopatológicas detectáveis nos períodos analisados.

Palavras-chave: doença hepática associada ao álcool; alterações metabólicas; estresse oxidativo; lesão hepática.

ABSTRACT

Alcohol-associated liver disease (ALD) is a major cause of morbidity and mortality and is associated with metabolic alterations, oxidative stress, and liver damage resulting from excessive ethanol consumption. Ethanol metabolism promotes the formation of reactive oxygen species (ROS), contributing to redox imbalance and the development of liver injury. In this context, the present study aimed to evaluate whether the interval between the last ethanol administration and euthanasia influences the metabolic and redox profile of C57BL/6 mice subjected to prolonged ethanol consumption. The animals were divided into Control and Ethanol groups and euthanized 5 or 12 hours after the last administration. Serum levels of glucose, triglycerides, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were evaluated, in addition to hepatic oxidative stress biomarkers, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and catalase activity, as well as hepatic histopathological alterations. The results showed no significant differences in serum glucose, triglycerides, ALT, or AST levels between the experimental groups at either time point. In contrast, a significant increase in TBARS levels and catalase activity was observed in the Ethanol group 5 hours after the last administration, indicating a transient increase in hepatic oxidative stress and activation of the antioxidant response. After 12 hours, these parameters did not differ from the Control group. Histopathological analysis revealed no significant alterations associated with ethanol consumption. In conclusion, prolonged ethanol consumption induced transient hepatic redox alterations without promoting systemic metabolic changes, increasing serum markers of hepatocellular injury, or detectable histopathological alterations during the evaluated periods.

Keywords: alcohol-associated liver disease; metabolic alterations; oxidative stress; liver injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação dos níveis séricos de triglicerídeos dos grupos Controle e Etanol.....	25
Figura 2. Avaliação dos níveis séricos de glicose dos grupos Controle e Etanol.....	26
Figura 3. Avaliação das atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nos grupos Controle e Etanol.....	28
Figura 4. Avaliação da peroxidação lipídica por meio da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos Controle e Etanol.....	30
Figura 5. Avaliação da atividade da enzima antioxidante hepática catalase (CAT) nos grupos Controle e Etanol.....	31
Figura 6. Fotomicrografias representativas do parênquima hepático dos grupos Controle e Etanol, corados por hematoxilina e eosina (HE), com ampliação de 400×.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Epidemiologia do etilismo.....	10
2.2 Metabolismo do etanol.....	11
2.3 Estresse oxidativo e etanol.....	14
2.4 Lesão hepática.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 Animais e condições experimentais.....	19
4.2 Delineamento experimental.....	19
4.3 Coleta do material biológico.....	20
4.4 Análises bioquímicas.....	21
4.4.1 Quantificação de ALT e AST.....	21
4.4.2 Dosagem de glicose e triglicerídeos.....	21
4.5 Biomarcador de dano oxidativo.....	22
4.5.1 Homogenato de fígado.....	22
4.5.2 Quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	22
4.6 Perfil antioxidante hepático.....	23
4.6.1 Catalase (CAT).....	23
4.7 Análise Histológica.....	23
4.8 Análises Estatísticas.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Avaliação dos níveis séricos de triglicerídeos.....	25
5.2 Avaliação dos níveis séricos de glicose.....	26
5.3 Avaliação dos marcadores de lesão hepática.....	27
5.4 Avaliação do dano oxidativo por meio dos níveis de TBARS.....	29
5.5 Avaliação da atividade da enzima antioxidante catalase.....	31
5.6 Análise histológica.....	32
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXO A.....	43

1. INTRODUÇÃO

O consumo de álcool está historicamente associado à cultura humana, sendo amplamente utilizado em contextos sociais e recreativos. Entretanto, o aumento do consumo de bebidas alcoólicas tem contribuído significativamente para a elevação das taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Hyun *et al.*, 2021). O etanol é uma das substâncias psicoativas mais consumidas globalmente, e seu uso crônico está fortemente relacionado ao desenvolvimento da doença hepática associada ao álcool (DHA), caracterizada por um espectro progressivo de lesões hepáticas que inclui esteatose, hepatite alcoólica, fibrose e cirrose (Gao; Bataller, 2011; Rehm *et al.*, 2013).

O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização do etanol, sendo particularmente suscetível aos efeitos tóxicos do consumo prolongado de álcool (Cederbaum, 2012). Durante o consumo crônico, ocorre maior participação de vias metabólicas associadas à isoenzima CYP2E1, favorecendo a formação de espécies reativas de oxigênio e outros compostos citotóxicos, capazes de intensificar o estresse oxidativo e contribuir para o desenvolvimento de lesões hepatocelulares (Guengerich, 2020; Mincis; Mincis, 2011). Além disso, este consumo crônico pode comprometer os sistemas antioxidantes endógenos, promovendo redução progressiva da glutathione e de outras defesas antioxidantes celulares (Chidiac *et al.*, 2023).

O aumento do estresse oxidativo induzido pelo etanol está associado ao agravamento da lesão hepática, favorecendo danos às proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Hoek; Pastorino, 2002; Louvet; Mathurin, 2015). Além disso, o consumo prolongado de álcool está relacionado à elevação de enzimas séricas hepáticas, como ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e GGT (gama-glutamyl transferase), além do desenvolvimento de alterações histológicas características, incluindo esteatose hepática, balonização hepatocelular, infiltrado inflamatório e fibrose, que contribuem para a progressão da lesão hepática associada ao álcool (Lefkowitz, 2005; Gao; Tsukamoto, 2016).

Nesse contexto, modelos experimentais em camundongos têm sido amplamente utilizados na investigação da doença hepática associada ao álcool, por permitirem a reprodução de alterações metabólicas, bioquímicas e histopatológicas induzidas pelo etanol (Bertola *et al.*, 2013). Esses modelos possibilitam a avaliação dos efeitos do consumo crônico de etanol sobre o metabolismo hepático, o estresse oxidativo e a integridade celular, além de contribuírem para a compreensão da progressão das alterações hepáticas ao longo do tempo.

Diante disso, torna-se relevante investigar os efeitos do consumo prolongado de etanol sobre o fígado em diferentes intervalos após a última administração, especificamente 5 e 12 horas, por meio da análise de parâmetros bioquímicos séricos e indicadores de estresse oxidativo hepático.

A hipótese deste trabalho é que o consumo prolongado de etanol promove alterações metabólicas e redox no fígado de camundongos C57BL/6, cuja magnitude depende do tempo decorrido entre a última exposição ao etanol e a coleta das amostras. Assim, espera-se que os animais avaliados 5 e 12 horas após a última administração apresentem perfis distintos de resposta hepática, especialmente em relação aos marcadores de estresse oxidativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do etilismo

O etilismo constitui um importante problema de saúde pública global devido à sua elevada associação com morbidade e mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo de álcool foi responsável por aproximadamente 2,6 milhões de mortes em 2019, representando 4,7% de todas as mortes mundiais. Estima-se, ainda, que cerca de 400 milhões de indivíduos apresentem transtornos relacionados ao uso de álcool, dos quais aproximadamente 209 milhões vivem com dependência alcoólica (Who, 2024).

A carga global de doenças atribuíveis ao álcool afeta de maneira desproporcional a população masculina. Em 2019, aproximadamente 2 milhões de mortes relacionadas ao consumo de álcool ocorreram entre homens, correspondendo a 6,9% dos anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs), enquanto entre as mulheres foram registradas cerca de 0,6 milhão de mortes e 2,0% dos DALYs. Além disso, indivíduos jovens também representam um grupo significativamente vulnerável, sendo que cerca de 13% das mortes registradas entre pessoas de 20 a 39 anos foram atribuídas ao consumo de álcool (Who, 2024).

Além da elevada prevalência mundial, os padrões de consumo de álcool também representam importante fator associado ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao etanol. Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que o consumo médio entre indivíduos consumidores corresponde a aproximadamente 27 g de álcool puro por dia, estando associado ao aumento significativo da ocorrência de doenças e óbitos. Em 2019, cerca de 17% da população mundial com 15 anos ou mais apresentou episódios de consumo excessivo de álcool (“binge drinking”), enquanto o consumo pesado contínuo foi particularmente prevalente entre indivíduos do sexo masculino (Who, 2024).

Embora não exista consenso internacional acerca da quantidade de álcool considerada prejudicial, evidências demonstram que o consumo diário de 30 a 50 g de álcool por períodos superiores a cinco anos pode contribuir para o desenvolvimento da doença hepática alcoólica. A esteatose hepática pode ocorrer em aproximadamente 90% dos indivíduos que consomem mais de 60 g de álcool por dia, enquanto a cirrose hepática pode desenvolver-se em cerca de 30% dos indivíduos submetidos ao consumo prolongado superior a 40 g/dia (Bhaumik; Chaudhuri, 2024).

O consumo crônico de álcool está associado ao desenvolvimento de diversas alterações sistêmicas e doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios do trato digestório (Corrao *et al.*, 2004). Entretanto, o fígado destaca-se como um dos principais órgãos afetados pela exposição prolongada ao etanol, principalmente por ser o primeiro órgão exposto ao álcool após absorvido pelo trato gastrointestinal, por meio da circulação porta, além de representar o principal local de metabolização do etanol (Osna *et al.*, 2022).

Dessa forma, o consumo crônico e excessivo de álcool pode comprometer a função hepática normal e promover danos estruturais progressivos, contribuindo para o desenvolvimento da doença hepática associada ao álcool (DHA). O espectro de lesões hepáticas relacionadas ao etanol inclui esteatose, esteato-hepatite, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (Osna *et al.*, 2022).

2.2 Metabolismo do etanol

O etanol é absorvido principalmente pelo trato gastrointestinal, sendo a taxa de absorção influenciada por fatores como a quantidade ingerida, a concentração alcoólica da bebida, a interação com medicamentos e a presença de alimentos no estômago, os quais podem retardar o processo digestivo e modificar a velocidade de absorção (Papalimperi *et al.*, 2019). Após a absorção, aproximadamente 95% do etanol é metabolizado pelo fígado, enquanto cerca de 5% é excretado de forma inalterada pelos pulmões, urina e suor (Papalimperi *et al.*, 2019).

O fígado desempenha papel central no metabolismo do etanol devido à elevada concentração de enzimas metabolizadoras (Mincis; Mincis, 2011). A metabolização hepática do etanol ocorre principalmente por meio de três vias enzimáticas: a álcool desidrogenase (ADH), considerada a principal enzima envolvida nesse processo, o sistema microsomal oxidativo do etanol (MEOS), associado principalmente ao citocromo P450 2E1 (CYP2E1), e a catalase, que atuam como vias alternativas de menor participação relativa. Independentemente da via envolvida, a etapa inicial do metabolismo do etanol resulta na formação de acetaldeído, um composto altamente reativo e tóxico, posteriormente convertido em acetato pela ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), especialmente pela isoforma mitocondrial ALDH2, considerada a principal responsável pela oxidação do acetaldeído no

fígado (Cederbaum, 2012; Contreras-Zentella *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2020; Mincis; Mincis, 2011).

A álcool desidrogenase (ADH), altamente expressa nos hepatócitos, catalisa a oxidação do etanol em acetaldeído, o qual, posteriormente, é transportado para as mitocôndrias e convertido em acetato pela ação da aldeído desidrogenase (ALDH) (Li *et al.*, 2015). As reações catalisadas por ADH e ALDH utilizam NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada) como cofator, promovendo sua redução a NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e alterando a razão NAD^+/NADH celular, o que interfere no equilíbrio redox hepático e em diversas vias metabólicas dependentes de NAD^+ (Cederbaum, 2012).

Segundo Krebs *et al.* (1969), o aumento da razão NADH/NAD^+ é considerado um importante fator nas alterações do metabolismo hepático de carboidratos associadas ao consumo crônico de álcool, estando relacionado à inibição da gliconeogênese hepática e podendo contribuir para quadros de hipoglicemia, especialmente em indivíduos submetidos ao alcoolismo crônico, desnutrição ou jejum.

Além dos efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, o etanol também promove importantes alterações no metabolismo lipídico hepático. O fígado desempenha papel fundamental na homeostase dos lipídios, participando da captação, síntese, oxidação, armazenamento e exportação de ácidos graxos. A manutenção do equilíbrio entre essas vias é essencial para o funcionamento adequado do órgão, uma vez que alterações nesses processos podem favorecer o acúmulo de lipídios nos hepatócitos e contribuir para o desenvolvimento de lesões hepáticas. Após sua captação pelo fígado, os ácidos graxos podem ser direcionados para a β -oxidação, utilizada para produção de energia, armazenados na forma de triglicerídeos ou exportados para a circulação associados às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Badmus *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2008).

Nesse contexto, o metabolismo do etanol interfere diretamente na regulação dessas vias, promovendo alterações que favorecem o acúmulo de lipídios no fígado (Jeon; Carr, 2020). Entre os principais mecanismos envolvidos, destaca-se a inibição da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos. Além dos efeitos tóxicos diretos sobre as mitocôndrias, a metabolização do etanol promove aumento da razão NADH/NAD^+ ,

alterando o estado redox celular e reduzindo a utilização dos ácidos graxos como fonte energética. Como consequência, ocorre favorecimento do acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática (Jeon; Carr, 2020).

Além das alterações na β -oxidação, o etanol também compromete a exportação hepática de triglicerídeos. Em condições fisiológicas, os hepatócitos empacotam lipídios neutros em partículas de VLDL, processo que contribui para evitar o acúmulo excessivo de triglicerídeos intracelulares. Entretanto, o etanol pode comprometer a montagem e a secreção dessas lipoproteínas ao reduzir a síntese de apolipoproteína B100 (apoB100) e a atividade da proteína de transferência de triglicerídeos microsomal, prejudicando a exportação lipídica e favorecendo a retenção de gordura no tecido hepático (Jeon; Carr, 2020). Paralelamente às alterações no metabolismo lipídico, o metabolismo do etanol também resulta na formação de metabólitos reativos, entre os quais se destaca o acetaldeído (Cederbaum, 2012).

O acetaldeído formado durante o metabolismo do etanol consiste em um metabólito altamente reativo, associado a danos teciduais. Em condições fisiológicas, a capacidade da ALDH em oxidar o acetaldeído geralmente excede sua produção, mantendo baixos os níveis circulantes desse composto. Entretanto, o consumo crônico de álcool favorece tanto o aumento da produção de acetaldeído quanto a redução de sua oxidação, em decorrência da diminuição da atividade da ALDH2, associada ao comprometimento da função mitocondrial, resultando no acúmulo desse composto e na intensificação de seus efeitos tóxicos (Cederbaum, 2012).

Além da via principal mediada pela ADH, outras enzimas também participam da metabolização do etanol. Os hepatócitos apresentam elevada atividade da enzima catalase, localizada nos peroxissomos e responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Em determinadas condições, essa enzima também pode atuar na oxidação do etanol, utilizando o peróxido de hidrogênio como substrato e gerando acetaldeído (Cioarca-Nedelcu; Atanasiu; Stoian, 2021).

Por sua vez, isoenzimas do citocromo P450, especialmente a CYP2E1, também participam da oxidação do etanol no fígado. Localizadas predominantemente no retículo endoplasmático dos hepatócitos, essas isoenzimas integram o sistema microsomal oxidativo do etanol (MEOS). Embora a ADH represente a principal via de metabolização do etanol em

condições fisiológicas, o CYP2E1 é induzido pelo consumo crônico de álcool e passa a exercer papel importante na conversão do etanol em acetaldeído, especialmente em concentrações elevadas de etanol (Zakhari, 2006).

O aumento da atividade do CYP2E1 após o consumo crônico de álcool ocorre principalmente devido à redução da degradação da enzima, favorecendo seu acúmulo nos hepatócitos, e não pelo aumento de sua produção. Durante a metabolização do etanol pela via do MEOS, ocorre a conversão de NADPH e O₂ em NADP⁺ e H₂O, processo associado à formação de espécies reativas de oxigênio. Nesse contexto, o CYP2E1 exerce papel importante na indução da peroxidação lipídica, oxidação e nitração de proteínas (Tan; Yates; Lilly; Dhanda, 2020).

2.3 Estresse oxidativo e etanol

Segundo Helmut Sies e Dean Jones (2007), o estresse oxidativo caracteriza-se por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, promovendo alterações na sinalização e no controle redox celular, além de possíveis danos moleculares.

Os radicais livres, que são oxidantes, constituem um grupo de espécies reativas caracterizado pela presença de elétrons desemparelhados, característica associada à elevada instabilidade e reatividade química (Li *et al.*, 2015). Em sistemas biológicos, as espécies reativas podem ser classificadas em espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas de oxigênio incluem moléculas radicalares e não radicalares, o radical superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Já as espécies reativas de nitrogênio compreendem compostos derivados do óxido nítrico, produzidos por diferentes vias celulares (Li *et al.*, 2015).

Devido ao seu elevado potencial oxidativo, as EROs e ERNs podem induzir peroxidação lipídica, promover danos ao DNA e oxidar diferentes biomoléculas presentes em membranas e tecidos biológicos, contribuindo para lesões celulares. Entretanto, em condições fisiológicas, o organismo possui sistemas antioxidantes capazes de neutralizar parcialmente essas espécies reativas, contribuindo para a manutenção da homeostase celular (Li *et al.*, 2015).

Nesse contexto, os eventos patogênicos associados ao consumo de etanol estão diretamente relacionados às suas vias de metabolização e à formação de acetaldeído, primeiro

produto gerado durante sua oxidação hepática. O metabolismo do etanol ocorre principalmente por meio da álcool desidrogenase (ADH), porém em consumo crônico há a indução de maior atividade do sistema microsomal oxidativo do etanol (MEOS), dependente do citocromo P450 2E1 (CYP2E1). A indução do MEOS acelera a conversão do etanol em acetaldeído e favorece a produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais etoxi, hidroxietil, acetil, superóxido e hidroxila, além de peróxido de hidrogênio, contribuindo para lesões celulares e hepáticas (Teschke, 2018).

Além da geração de espécies reativas, o consumo crônico de etanol favorece um ciclo contínuo de dano celular associado ao acetaldeído. A indução do MEOS aumenta a conversão do etanol em acetaldeído, elevando suas concentrações hepáticas. O acúmulo desse metabólito compromete funções mitocondriais, incluindo a atividade da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2), responsável pela sua detoxificação. Como consequência, ocorre maior acúmulo intracelular de acetaldeído, estabelecendo um ciclo de retroalimentação associado ao agravamento do dano hepático (Teschke, 2018).

Dessa forma, os antioxidantes desempenham papel importante na redução do estresse oxidativo, atuando tanto na inibição de enzimas produtoras de radicais livres, como xantina oxidase e NAD(P)H oxidase, quanto no aumento da expressão e atividade de enzimas antioxidantes, incluindo glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, conforme descrito por Chaudhary *et al.* (2023).

As defesas antioxidantes enzimáticas atuam na neutralização das EROs por meio de diferentes sistemas celulares, sendo essenciais para a manutenção da homeostase redox em condições fisiológicas normais (Halliwell; Gutteridge, 2015). Entre essas enzimas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), responsáveis pela desintoxicação de radicais livres de oxigênio (Birben *et al.*, 2012). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é posteriormente decomposto em água e oxigênio pela CAT e/ou pela GPx, prevenindo o acúmulo de EROs e reduzindo os danos oxidativos celulares (Ighodaro; Akinloye, 2018).

A CAT é considerada uma das principais enzimas antioxidantes dos organismos aeróbicos, desempenhando papel fundamental na proteção celular contra o estresse oxidativo devido à sua elevada capacidade de decompor o peróxido de hidrogênio. Esse processo ocorre por meio de reações de oxidorredução em duas etapas, nas quais o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular, impedindo seu acúmulo intracelular e a formação

de espécies altamente reativas. Como mencionado anteriormente, a CAT também participa da metabolização do etanol por meio de sua oxidação em acetaldeído, embora sua contribuição para essa via seja menor quando comparada à ADH e ao sistema MEOS. Dessa forma, a CAT exerce importante papel na proteção de diferentes tecidos contra danos oxidativos induzidos pelo excesso de EROs (Apel; Hirt, 2004; Contreras-Zentella *et al.*, 2022).

2.4 Lesão hepática

A doença hepática associada ao álcool (DHA) corresponde a uma das principais causas de doença hepática crônica no mundo, estando diretamente relacionada ao consumo excessivo e prolongado de etanol. A DHA apresenta um espectro progressivo de alterações hepáticas, iniciando-se frequentemente com a esteatose hepática alcoólica, caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos (Mackowiak *et al.*, 2024; Osna *et al.*, 2022).

Em alguns indivíduos, a progressão da doença pode levar ao desenvolvimento de esteato-hepatite alcoólica, condição associada à inflamação hepática, lesão hepatocelular e balonização dos hepatócitos. A persistência da lesão hepática e da inflamação pode promover a progressão da fibrose para cirrose, estágio avançado da doença hepática, podendo ainda aumentar o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em fases mais graves. Além disso, formas agudas da doença, como a hepatite alcoólica, podem ocorrer tanto na presença quanto na ausência de cirrose, estando associadas à insuficiência hepática e elevada mortalidade (Seitz *et al.*, 2018; Singal *et al.*, 2019).

O metabolismo do etanol promove alterações no estado redox intracelular, contribuindo para o desenvolvimento da doença hepática associada ao álcool. O aumento intracelular da razão NADH/NAD^+ , decorrente da metabolização do etanol pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), inibe a oxidação de ácidos graxos e favorece o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos. Além disso, alterações na síntese e exportação lipídica contribuem para o desenvolvimento da esteatose hepática, considerada uma das alterações mais precoces da DHA (Jiang *et al.*, 2020).

O consumo crônico de etanol também está associado ao aumento do estresse oxidativo intracelular, principalmente pela indução do CYP2E1, capaz de favorecer a formação de espécies reativas de oxigênio. Como consequência, ocorre intensificação da peroxidação lipídica, processo que promove danos às membranas celulares e formação de aldeídos reativos, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE). Além disso, a DHA está

associada à redução das defesas antioxidantes hepáticas, especialmente da glutathione, contribuindo para o agravamento da lesão hepatocelular (Jiang *et al.*, 2020).

Do ponto de vista histopatológico, a DHA caracteriza-se por alterações morfológicas que variam conforme o estágio da doença, sendo a esteatose hepática uma das manifestações mais frequentes e considerada potencialmente reversível nas fases iniciais da doença (Maheshwari *et al.*, 2024). A esteatose pode apresentar padrão microvesicular ou macrovesicular, caracterizado pelo acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos, frequentemente com predomínio do padrão macrovesicular (Theise, 2013).

Com a progressão da lesão hepática, podem ser observados hepatócitos balonizados, corpos de Mallory-Denk, necrose hepatocelular e infiltrado inflamatório lobular, composto principalmente por linfócitos e neutrófilos, características frequentemente associadas à hepatite alcoólica. A persistência do processo inflamatório e do dano hepatocelular pode favorecer o desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática (Maheshwari *et al.*, 2024; Patel; Mueller, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar se os intervalos de 5 e 12 horas entre a última administração de etanol e a eutanásia para coleta das amostras biológicas modula o perfil metabólico sérico e o perfil redox hepático de camundongos C57BL/6 submetidos ao consumo prolongado de etanol.

3.2 Objetivos específicos:

- i) Determinar os níveis séricos de triglicerídeos e glicose;
- ii) Avaliar marcadores de lesão hepática (ALT e AST);
- iii) Avaliar o biomarcador de dano oxidativo hepático (TBARS);
- iv) Avaliar a atividade da enzima catalase;
- v) Avaliar a histopatologia do fígado.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais e condições experimentais

A pesquisa consistiu em um estudo pré-clínico utilizando amostras de fígado coletadas de camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 8 a 12 semanas de idade e peso entre 25 e 30 g, provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), com livre acesso à ração padrão e água. Este estudo integrou um projeto maior intitulado “*Investigação da associação do consumo crônico de etanol no curso temporal da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol*”, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) (ANEXO A), sob o protocolo nº 5848080524, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais:

- Grupo Controle (C): recebeu água por gavagem orogástrica durante 15 dias;
- Grupo Etanol (E): recebeu solução de etanol (10 mL/kg) por gavagem orogástrica, uma vez ao dia, durante 15 dias.

Foram adotados dois delineamentos experimentais, diferenciados pelo intervalo entre a última administração de etanol e a eutanásia para coleta das amostras biológicas. No primeiro delineamento, os animais foram eutanasiados 5 horas após a última administração de etanol (Controle: $n = 7$; Etanol: $n = 7$). No segundo delineamento, a eutanásia foi realizada 12 horas após a última administração (Controle: $n = 10$; Etanol: $n = 9$).

A escolha dos intervalos de 5 e 12 horas entre a última administração de etanol e a eutanásia teve como objetivo avaliar respostas em diferentes momentos após a exposição ao etanol. O período de 5 horas foi selecionado por representar um momento mais próximo aos eventos decorrentes da metabolização do etanol, enquanto o intervalo de 12 horas permitiu avaliar a persistência ou possível recuperação das alterações metabólicas e oxidativas após um período mais prolongado da última administração.

Modelos experimentais de exposição crônica ao etanol em roedores são amplamente utilizados para investigação das alterações metabólicas e hepáticas associadas ao consumo de álcool (Lieber; DeCarli, 1989; Bertola *et al.*, 2013). No presente estudo, foi adotado um

esquema progressivo de administração da concentração de etanol como estratégia experimental para adaptação gradual dos animais à exposição alcoólica.

No delineamento de 5 horas, os animais do grupo Etanol receberam etanol por gavagem orogástrica durante 15 dias, em esquema progressivo, utilizando solução a 20% nos primeiros 7 dias, 30% nos 7 dias subsequentes e dose final a 50% no 15º dia. O grupo Controle recebeu água, em volume equivalente, pela mesma via e durante o mesmo período experimental. As administrações foram realizadas diariamente às 6h, exceto no 15º dia, quando a última gavagem foi antecipada para as 4h. Cinco horas após a última gavagem, foi realizada a eutanásia para coleta das amostras biológicas e posterior realização das análises experimentais.

No delineamento correspondente à eutanásia de 12 horas, os animais do grupo Etanol receberam etanol por gavagem orogástrica durante 15 dias, seguindo o mesmo esquema progressivo anteriormente descrito. O grupo Controle recebeu água, em volume equivalente, pela mesma via e durante o mesmo período experimental. Nesse delineamento, as administrações foram realizadas diariamente às 20h. No 16º dia, a eutanásia foi iniciada às 8h, correspondendo a 12 horas após a última administração de etanol, para coleta das amostras biológicas e posterior realização das análises experimentais. Em ambos os delineamentos, os animais ficaram em jejum por 3 horas antes da eutanásia.

4.3 Coleta do material biológico

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com Isoflurano na concentração de 3–4% em mistura de ar/O₂, pelo fato deste anestésico não causar alterações na expressão da isoenzima CYP2E1 (Plate *et al.*, 2005). A profundidade anestésica foi confirmada pela ausência de reflexos e redução do tônus muscular.

Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação, sendo realizada coleta sanguínea por punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado a 3.000× g, durante 10 minutos, a 4 °C, para obtenção do soro.

Após a remoção do fígado, o tecido hepático foi subdividido em porções destinadas às diferentes análises. Parte das amostras foi imediatamente acondicionada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a –80 °C para posteriores análises bioquímicas. A porção restante foi fixada em solução de formaldeído tamponado a 4% para análise histológica.

4.4 Análises bioquímicas

4.4.1 Quantificação de ALT e AST

Com o objetivo de avaliar os marcadores de lesão hepática, foram determinadas as atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As análises foram realizadas utilizando kits comerciais fornecidos pelo laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

- **ALT**

A atividade sérica da ALT foi determinada por método cinético espectrofotométrico. Inicialmente, o reagente de trabalho foi preparado pela mistura dos reagentes do kit e, em seguida, adicionado às amostras. Após incubação a 37 °C, a atividade enzimática foi avaliada pela variação da absorbância em 340 nm ao longo do tempo, conforme o protocolo do fabricante.

- **AST**

Para a determinação da atividade sérica da AST, as amostras foram previamente diluídas cinco vezes (5×) e analisadas por método cinético espectrofotométrico utilizando piridoxal fosfato. Inicialmente, foi preparado o reagente de trabalho, que foi adicionado às amostras e incubado a 37 °C. Em seguida, a reação foi iniciada com a adição do Reagente 2, sendo a atividade enzimática determinada pela variação da absorbância em 340 nm ao longo do tempo.

4.4.2 Dosagem de glicose e triglicerídeos

Para avaliar a glicose e triglicerídeos a partir do soro, as análises também foram realizadas pelos kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com protocolos disponibilizados pelo fabricante.

- **Glicose:**

A concentração sérica de glicose foi determinada por método enzimático colorimétrico. A glicose é oxidada pela enzima glicose oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que reage com 4-aminoantipirina e fenol na presença de peroxidase, formando um

composto cromógeno de coloração vermelha. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de glicose na amostra, sendo a absorbância medida a 505 nm.

● Triglicerídeos:

A concentração sérica de triglicerídeos foi determinada por método enzimático colorimétrico. Após a hidrólise dos triglicerídeos, o glicerol liberado é convertido em intermediários que levam à formação de peróxido de hidrogênio. Este reage com 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, originando um composto cromógeno vermelho, cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra. A quantificação foi realizada por espectrofotometria, com leitura da absorbância no comprimento de onda de 505 nm.

4.5 Biomarcador de dano oxidativo

4.5.1 Homogenato de fígado

Foi preparado um homogenato para quantificar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e catalase (CAT). Para isso, foi utilizado 100 mg de fígado e 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,2). O tecido foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4 °C, logo em seguida o sobrenadante foi coletado. A partir deste homogenato, a concentração de proteínas totais do tecido foi determinada utilizando o Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

4.5.2 Quantificação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de TBARS foi realizada a partir de 250 µL de homogenato, com adição de 125 µL de TCA, 125 µL de TBA e 62,5 µL de BHT. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 95°C por 15 minutos em termobloco, seguidos de resfriamento em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 µL desta mistura e 600 µL de butanol a novos microtubos e foram novamente agitados no vórtex. Em seguida, foram submetidos à centrifugação por 10 minutos, a 7.607 x g, a 4°C. O sobrenadante (200 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços e lido em leitor de placa com o comprimento de onda de 535 nm. A curva padrão, preparada via diluição seriada, foi processada simultaneamente. Para a quantificação, as concentrações foram determinadas por meio da equação da reta obtida a partir da curva padrão, sendo corrigidas pela concentração de proteínas totais quantificada pelo Método de Lowry.

4.6 Perfil antioxidante hepático

4.6.1 Catalase (CAT)

Para a análise da atividade de catalase, preparou-se um volume de trabalho composto por 10 mL de solução tampão e 8,6 μ L de peróxido de hidrogênio, quantidade calculada para nove análises, sendo o preparo renovado conforme necessário. Diretamente na cubeta, foi adicionado 990 μ L dessa mistura e 10 μ L da respectiva amostra. As absorbâncias foram registradas a 240 nm em intervalos de 30 segundos, durante um tempo total de dois minutos. Para os cálculos, foi utilizado somente a diferença entre as absorbâncias iniciais (30 segundos) e finais (2 minutos), aplicando a Lei de Lambert-Beer. Posteriormente, a atividade enzimática foi normalizada pela concentração de proteínas totais, quantificada pelo método de Lowry, expressando os resultados finais em nmol/min/mg de proteína.

4.7 Análise Histológica

Fragmentos hepáticos foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 4% e submetidos ao processamento histológico convencional. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas e incluídas em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes histológicos com espessura aproximada de 4 μ m em micrótomo semiautomático, os quais foram montados em lâminas e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

A avaliação histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa, considerando a presença ou ausência de alterações morfológicas hepáticas. Foram analisadas cinco lâminas de cada grupo experimental (controle e etanol) nos períodos de 5 e 12 horas. As lesões avaliadas incluíram microesteatose, macroesteatose, degeneração hidrópica, infiltrado inflamatório, hiperemia e hemorragia.

Para a documentação das alterações histopatológicas observadas, foram obtidas fotomicrografias com aumento de 40 $\times$ utilizando microscópio Leica DM5000B acoplado à microcâmera AxioCam MRc. As imagens foram capturadas por meio do software Carl Zeiss AxioVision 4.8.3, sendo selecionadas imagens representativas de cada grupo experimental.

4.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, as comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste t de Student não pareado e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Para as variáveis com dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos como mediana. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$.

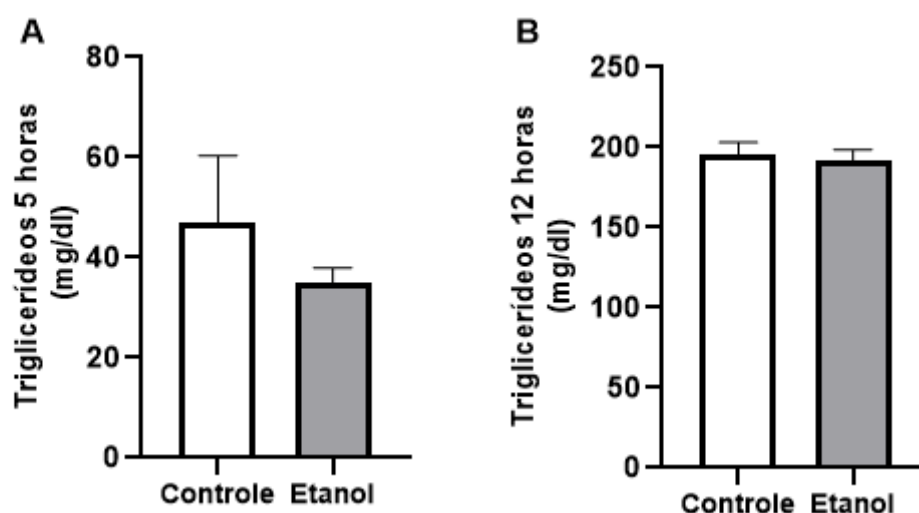
A análise estatística dos dados histológicos semiquantitativos foi realizada utilizando o mesmo software GraphPad Prism. Os dados referentes à presença ou ausência de lesões hepáticas foram estruturados em tabelas de contingência (2×2) contendo as frequências absolutas observadas para cada grupo experimental. Para avaliar a existência de diferença estatisticamente significativa entre dois grupos independentes, utilizou-se o Teste Exato de Fisher, adotando o teste bicaudal (two-tailed). Os resultados foram expressos em frequência absoluta e percentual. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos níveis séricos de triglicerídeos

Os níveis séricos de triglicerídeos não diferiram significativamente entre os grupos Controle e Etanol após 5 horas da administração de etanol (**Figura 1A**), apresentando valores de 47,04 e 35,00, respectivamente. Após 12 horas (**Figura 1B**), os valores foram de 195,3 e 191,9, respectivamente, também sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 1. Avaliação dos níveis séricos de triglicerídeos dos grupos Controle e Etanol. (A) Cinco horas após a última administração de etanol. (B) Doze horas após a última administração de etanol. A análise estatística foi realizada por meio do teste *t* de Student não pareado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.



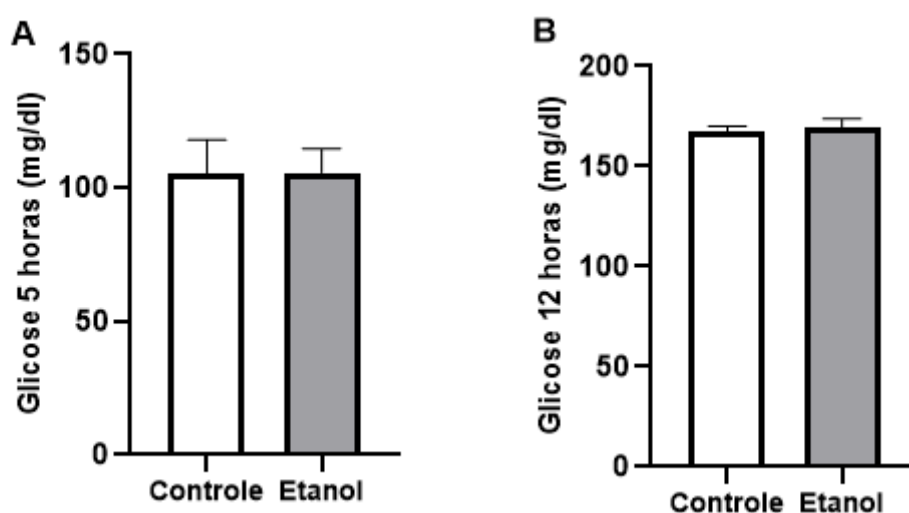
Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0.

Os triglicerídeos representam uma importante forma de armazenamento energético no organismo. Jeon e Carr (2020) relatam que o metabolismo do etanol pode promover alterações em diferentes vias do metabolismo lipídico hepático, incluindo aumento da captação de ácidos graxos, redução da β -oxidação, estímulo à lipogênese e diminuição da exportação de lipídios, favorecendo o acúmulo de lipídios nos hepatócitos. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de triglicerídeos entre os grupos Controle e Etanol. Esse resultado sugere que as alterações metabólicas induzidas pelo etanol não foram suficientes para promover modificações detectáveis nos níveis circulantes de triglicerídeos nas condições experimentais avaliadas.

5.2 Avaliação dos níveis séricos de glicose

Os níveis séricos de glicose não diferiram significativamente entre os grupos Controle e Etanol após 5 horas da administração de etanol (**Figura 2A**), apresentando valores de 105,6 e 105,6, respectivamente. Após 12 horas (**Figura 2B**), os valores foram de 167,8 e 169,6, respectivamente, também sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 2. Avaliação dos níveis séricos de glicose dos grupos Controle e Etanol. (A) Cinco horas após a última administração de etanol. (B) Doze horas após a última administração de etanol. A análise estatística foi realizada por meio do teste *t* de Student não pareado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0.

A glicose sérica foi avaliada devido ao papel central do fígado na manutenção da homeostase glicêmica, regulando processos como gliconeogênese, glicogenólise e glicogênese (Han *et al.*, 2016). Embora o metabolismo do etanol possa interferir na produção hepática de glicose por meio da alteração da razão NADH/NAD^+ , não foram observadas modificações significativas na glicemia dos animais expostos ao etanol. Segundo Krebs *et al.* (1969), o aumento da razão NADH/NAD^+ decorrente da metabolização do etanol pode comprometer a gliconeogênese hepática e favorecer o desenvolvimento de hipoglicemia, especialmente em condições de desnutrição ou jejum prolongado. Entretanto, nas condições experimentais empregadas neste estudo, incluindo o curto período de jejum anterior à coleta das amostras, as alterações metabólicas induzidas pelo etanol não foram suficientes para comprometer a homeostase glicêmica.

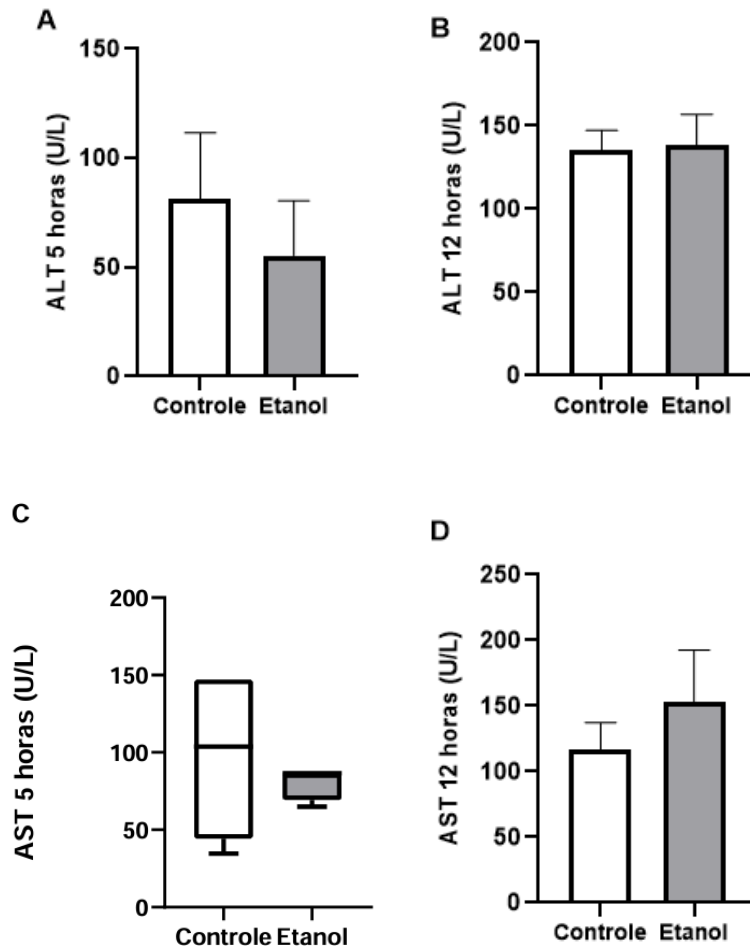
A oxidação do etanol pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase aumenta a produção de NADH, favorecendo o desvio de piruvato para lactato e de oxaloacetato para malato, o que pode reduzir a disponibilidade de substratos para a gliconeogênese. Entretanto, esse mecanismo tende a ter maior repercussão sobre a glicemia em condições de jejum prolongado, depleção de glicogênio hepático ou desnutrição. Assim, a ausência de alteração significativa na glicose sérica sugere que, nas condições experimentais adotadas, os mecanismos compensatórios de manutenção da glicemia, como glicogenólise residual, regulação hormonal e disponibilidade energética, podem ter sido suficientes para preservar a homeostase glicêmica nos dois tempos avaliados.

Além disso, é importante considerar que a glicose sérica representa um marcador sistêmico e pontual, podendo não refletir integralmente alterações metabólicas hepáticas mais sutis. O fígado possui elevada capacidade de adaptação metabólica, e pequenas alterações na gliconeogênese, glicogenólise ou captação periférica de glicose podem não ser detectáveis apenas pela dosagem sérica em um único momento experimental. Dessa forma, a ausência de diferença na glicemia não exclui a ocorrência de alterações bioquímicas intracelulares induzidas pelo etanol, mas indica que essas alterações não foram suficientes para comprometer a manutenção sistêmica da glicose nos intervalos de 5 e 12 horas após a última administração.

5.3 Avaliação dos marcadores de lesão hepática

Em relação às atividades séricas de ALT e AST, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Controle e Etanol, tanto no delineamento de 5 horas quanto no de 12 horas (**Figura 3**). Para a ALT, as atividades séricas médias foram de 81,47 e 55,44 após 5 horas (**Figura 3A**), e de 135,1 e 138,5 após 12 horas (**Figura 3B**), nos grupos Controle e Etanol, respectivamente ($p > 0,05$). De forma semelhante, as atividades séricas de AST não diferiram significativamente entre os grupos, apresentando mediana de 103,8 e 86,5 após 5 horas (**Figura 3C**) e média de 116,8 e 152,8 após 12 horas (**Figura 3D**), nos grupos Controle e Etanol, respectivamente ($p > 0,05$).

Figura 3. Avaliação das atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nos grupos Controle e Etanol. (A) ALT cinco horas após a última administração de etanol. (B) ALT doze horas após a última administração de etanol. (C) AST cinco horas após a última administração de etanol. (D) AST doze horas após a última administração de etanol. A análise estatística da ALT foi realizada por meio do teste *t* de Student não pareado. Para a AST, foi utilizado o teste de Mann-Whitney no delineamento de 5 horas e o teste *t* de Student não pareado no delineamento de 12 horas. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0.

A atividade sérica das aminotransferases ALT e AST é amplamente utilizada como indicador de lesão hepatocelular. Entretanto, conforme destacado por Senior (2012), suas determinações séricas não constituem testes de função hepática, mas sim marcadores de lesão das células hepáticas. Além disso, o autor ressalta que a atividade sérica da ALT, quando avaliada isoladamente, não prediz necessariamente a gravidade da lesão hepática, apresentando maior valor preditivo quando interpretada em conjunto com outros parâmetros relacionados à função e à lesão do fígado.

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas atividades séricas de ALT e AST entre os grupos Controle e Etanol, tanto após 5 quanto após 12 horas da última administração de etanol. Embora tenham sido observadas variações nos valores dessas aminotransferases entre os grupos experimentais, destacou-se o aumento da atividade sérica de AST após 12 horas no grupo etanol, com valor de p próximo ao nível de significância estatística ($p = 0,0592$), sem, contudo, atingir o critério de significância adotado.

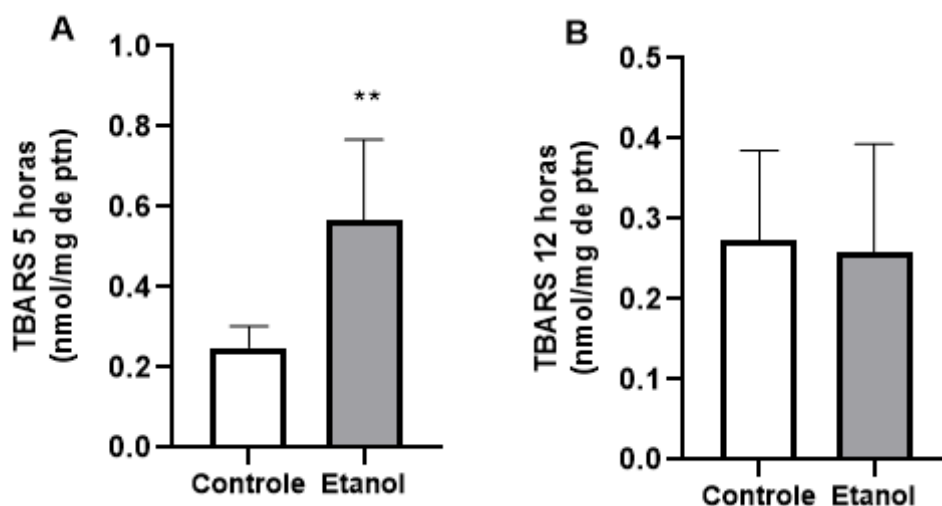
Uma possível explicação para esses achados é que o período de exposição ao etanol e as condições do protocolo experimental possam não ter sido suficientes para promover lesão hepatocelular de magnitude capaz de resultar em aumento detectável das aminotransferases séricas. Dessa forma, é possível que alterações hepáticas iniciais tenham ocorrido sem repercussão significativa sobre esses marcadores bioquímicos, reforçando a necessidade de interpretar os níveis de ALT e AST em conjunto com outros parâmetros relacionados à avaliação da lesão hepática, conforme proposto por Senior (2012).

A literatura demonstra que modelos experimentais de DHA apresentam grande variabilidade quanto à magnitude das alterações séricas de ALT e AST, dependendo do protocolo utilizado, da linhagem animal, da dose de etanol, da duração da exposição, da via de administração, da presença ou ausência de desafio agudo adicional e do estado nutricional dos animais (Rabelo *et al.*, 2024). Assim, a ausência de aumento significativo dessas aminotransferases sugere que o protocolo de consumo prolongado de etanol, nas condições avaliadas, não foi suficiente para induzir lesão hepatocelular extensa com liberação expressiva dessas enzimas para a circulação.

5.4 Avaliação do dano oxidativo por meio dos níveis de TBARS

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram significativamente maiores no grupo Etanol em relação ao grupo Controle após 5 horas da última administração de etanol (**Figura 4A**) ($p = 0,0040$). Após 12 horas (**Figura 4B**), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,8092$).

Figura 4. Avaliação da peroxidação lipídica por meio da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos Controle e Etanol. (A) Cinco horas após a última administração de etanol. (B) Doze horas após a última administração de etanol. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. $**p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0.

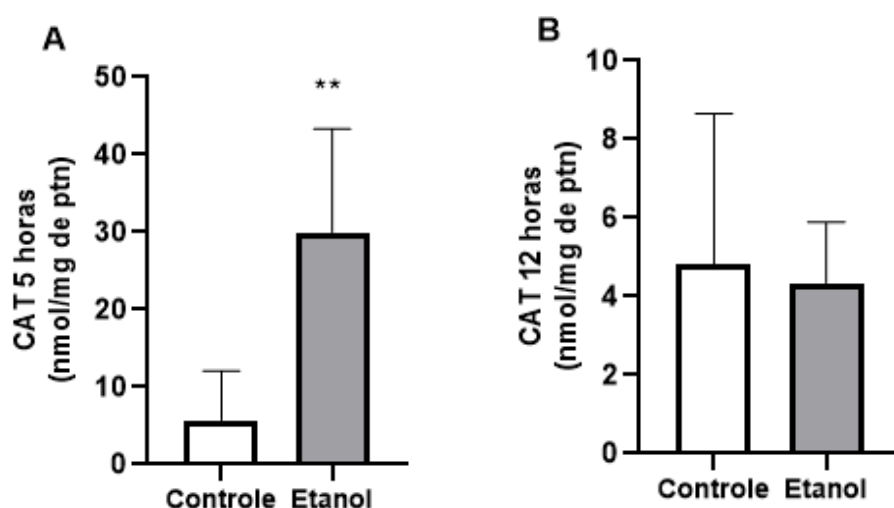
O aumento significativo dos níveis de TBARS observado após 5 horas da administração de etanol (**Figura 4A**) sugere intensificação da peroxidação lipídica e, consequentemente, aumento do estresse oxidativo hepático. Esse resultado indica que o metabolismo do etanol favoreceu a formação de espécies reativas capazes de promover danos oxidativos aos lipídios de membrana.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após 12 horas (**Figura 4B**). Resultado semelhante foi descrito por Zloch (1994), que demonstrou aumento da peroxidação lipídica hepática nas horas iniciais após intoxicação aguda por etanol, seguido de retorno aos níveis fisiológicos, caracterizando um curso temporal limitado dessa alteração. Segundo os autores, a redução da peroxidação lipídica ao longo do tempo pode estar relacionada à diminuição do estímulo oxidativo decorrente da metabolização do etanol e, possivelmente, à atuação de mecanismos antioxidantes endógenos capazes de atenuar os efeitos deletérios do álcool. Essa hipótese pode representar uma possível explicação para a normalização dos níveis de TBARS observada no presente estudo.

5.5 Avaliação da atividade da enzima antioxidante catalase

A atividade da enzima antioxidante catalase apresentou aumento significativo no grupo Etanol em comparação ao grupo Controle após 5 horas da administração de etanol ($p = 0,0040$) (**Figura 5A**). Entretanto, após 12 horas da administração, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,7596$) (**Figura 5B**).

Figura 5. Avaliação da atividade da enzima antioxidante hepática catalase (CAT) nos grupos Controle e Etanol. (A) Cinco horas após a última administração de etanol. (B) Doze horas após a última administração de etanol. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: Elaborado pela autora utilizando o software GraphPad Prism® versão 8.0.

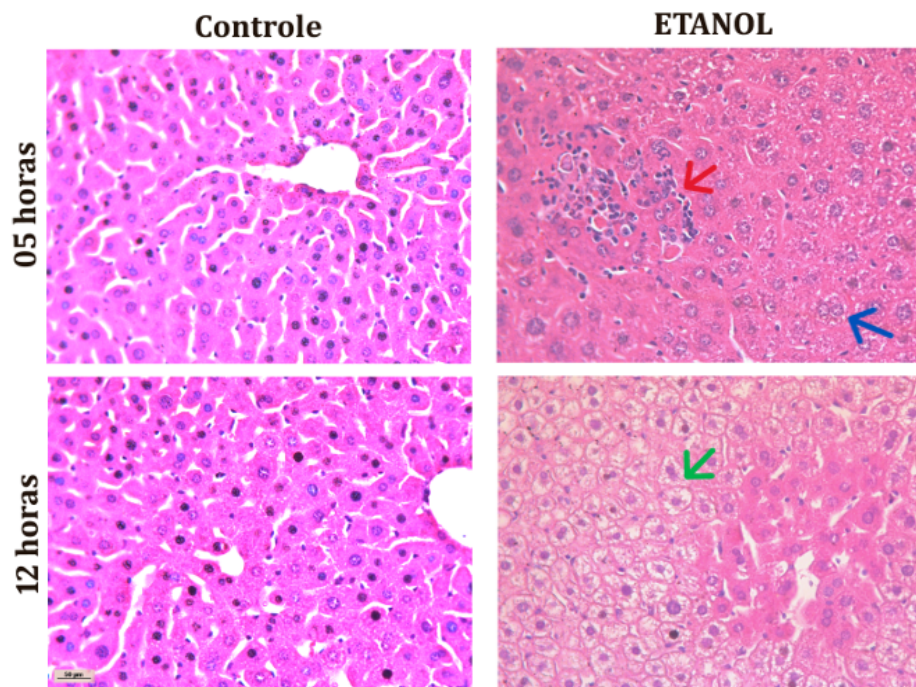
O aumento significativo da atividade da catalase após 5 horas da administração de etanol sugere a ativação de mecanismos antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo induzido pelo álcool. Esse resultado coincide com o aumento dos níveis de TBARS observado no mesmo período, indicando que a intensificação da peroxidação lipídica foi acompanhada por uma resposta antioxidante adaptativa. A catalase atua na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, contribuindo para a manutenção da homeostase redox e para a proteção celular contra danos oxidativos (Apel; Hirt, 2004; Contreras-Zentella *et al.*, 2022).

Por outro lado, após 12 horas, não foram observadas diferenças significativas na atividade da catalase entre os grupos, comportamento semelhante ao observado para os níveis de TBARS. Esse perfil sugere que tanto a resposta oxidativa quanto a resposta antioxidante ocorreram de forma transitória. De maneira semelhante, Zloch (1994) propuseram que

mecanismos antioxidantes endógenos podem contribuir para atenuar os efeitos deletérios do etanol, hipótese que pode auxiliar na compreensão da normalização dos marcadores observada no presente estudo.

5.6 Análise histológica

Figura 6. Fotomicrografias representativas do parênquima hepático dos grupos Controle e Etanol, corados por hematoxilina e eosina (HE), com ampliação de 400×. O grupo Controle apresentou parênquima hepático preservado em ambos os tempos experimentais. No grupo Etanol, após 5 horas, observaram-se infiltrado inflamatório (seta vermelha) e microesteatose (seta azul), enquanto após 12 horas foi evidenciada degeneração hidrópica (seta verde).



Fonte: Lâminas confeccionadas pelo Laboratório de Morfopatologia e fotomicrografias obtidas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada e Microanálise da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Tabela 1: Análise semi-quantitativa, em porcentagem e valor de p, da ocorrência de dano histopatológico

	Grupo 5 horas			Grupo 12 horas		
	Controle n (%)	Etanol n (%)	Exato de Fisher p	Controle n (%)	Etanol n (%)	Exato de Fisher p
Microesteatose	1 (16)	1 (16)	>0,9999	1 (16)	2 (40)	0,0572
Macroesteatose	0 (0)	0 (0)	>0,9999	0 (0)	0 (0)	>0,9999
Degeneração hidrópica	2 (33)	3 (50)	>0,9999	4 (66)	3 (60)	>0,9999
Inflamação lobular	3 (50)	2 (33)	>0,9999	0 (0)	0 (0)	>0,9999
Hiperemia	2 (33)	3 (50)	>0,9999	3 (50)	2 (40)	>0,9999
Hemorragia	0 (0)	0 (0)	>0,9999	0 (0)	0 (0)	>0,9999
Necrose	1 (16)	1 (16)	>0,9999	4 (66)	3 (60)	>0,9999

Fonte: Autoria pessoal.

A análise semiquantitativa das alterações histopatológicas, apresentada na Tabela 1, demonstrou que, após 5 horas, foram observados casos de microesteatose (16% em ambos os grupos), degeneração hidrópica (33% no grupo Controle e 50% no grupo Etanol), inflamação lobular (50% no grupo Controle e 33% no grupo Etanol), hiperemia (33% no grupo Controle e 50% no grupo Etanol) e necrose (16% em ambos os grupos). Não foram observados casos de macroesteatose ou hemorragia, e nenhuma das alterações apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Após 12 horas, foram observados casos de microesteatose (16% no grupo Controle e 40% no grupo Etanol), degeneração hidrópica (66% no grupo Controle e 60% no grupo Etanol), hiperemia (50% no grupo Controle e 40% no grupo Etanol) e necrose (66% no grupo Controle e 60% no grupo Etanol). Não foram identificados casos de macroesteatose, inflamação lobular ou hemorragia. Assim como no período de 5 horas, nenhuma das alterações histopatológicas apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Assim, os achados das análises histopatológicas indicam que, nas condições experimentais avaliadas, o consumo prolongado de etanol não foi suficiente para induzir alterações morfológicas hepáticas extensas ou consistentes detectáveis pela coloração de hematoxilina-eosina. Entretanto, a ausência de diferença estatística não exclui a ocorrência de alterações hepatocelulares iniciais, especialmente considerando que os marcadores redox,

como TBARS e catalase, apresentaram aumento significativo no tempo de 5 horas. As alterações histológicas avaliadas por HE podem apresentar menor sensibilidade para detectar lesões metabólicas e redox iniciais. O aumento da peroxidação lipídica observado após 5 horas sugere dano oxidativo aos lipídios de membrana, mas esse evento pode preceder alterações morfológicas detectadas, como necrose, balonização hepatocelular ou infiltrado inflamatório significativo.

Dessa forma, é possível que o etanol tenha induzido alterações bioquímicas precoces, sem que essas alterações tenham alcançado magnitude suficiente para comprometer a arquitetura hepática ou gerar lesões histológicas extensas no momento da coleta. Outro ponto que merece destaque é que a presença de degeneração hidrópica tanto nos grupos Controle quanto nos grupos Etanol deve ser interpretada com cautela. Essa alteração representa uma forma de lesão celular reversível, caracterizada por tumefação celular decorrente da incapacidade da célula em manter a homeostase iônica e hídrica, levando ao acúmulo intracelular de água (Kumar *et al.*, 2010), sendo considerada uma alteração morfológica inespecífica.

Sua ocorrência em animais controles sugere que fatores inerentes ao procedimento experimental, como manipulação, gavagem, jejum, anestesia, processamento tecidual ou variabilidade individual, podem ter contribuído para esse achado. Dessa forma, a degeneração hidrópica isolada, sem aumento concomitante de ALT, AST, necrose ou inflamação significativa, não permite inferir lesão hepatocelular grave induzida pelo etanol.

Em suma, a partir da análise em conjunto dos dados obtidos neste estudo, pode-se inferir que as alterações redox podem preceder a elevação sérica das aminotransferases. No presente estudo, o aumento de TBARS e da atividade da catalase observado após 5 horas indica que houve intensificação transitória da peroxidação lipídica e ativação de resposta antioxidante. Entretanto, esse estresse oxidativo inicial pode não ter atingido magnitude suficiente para causar ruptura importante da integridade hepatocelular, o que explicaria a manutenção dos níveis séricos de ALT e AST. Após 12 horas, a ausência de diferença em TBARS e catalase sugere uma possível atenuação do estímulo oxidativo ou ativação de mecanismos compensatórios, o que também pode ter contribuído para a ausência de alterações nas aminotransferases nesse tempo.

A literatura demonstra que modelos experimentais de doença hepática associada ao álcool apresentam grande variabilidade quanto à magnitude das alterações séricas de ALT, AST e triglicerídeos, dependendo do protocolo utilizado, da linhagem animal, da dose de etanol, da duração da exposição, da via de administração, da presença ou ausência de desafio agudo adicional e do estado nutricional dos animais.

Portanto, a ausência de diferenças nos níveis séricos de glicose, triglicerídeos, ALT e AST nos tempos de 5 e 12 horas sugere que o consumo prolongado de etanol, nas condições experimentais utilizadas, promoveu alterações hepáticas mais relacionadas ao desequilíbrio redox transitório do que a uma desregulação metabólica sistêmica ou lesão hepatocelular. Esse achado reforça a importância de interpretar os marcadores séricos em conjunto com parâmetros hepáticos diretos, como TBARS, atividade de enzimas antioxidantes e análise histopatológica, uma vez que alterações séricas isoladas podem não ser suficientemente sensíveis para detectar fases iniciais ou discretas da lesão hepática induzida pelo etanol.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração prolongada de etanol, nas condições experimentais utilizadas, foi capaz de induzir aumento transitório do estresse oxidativo hepático, evidenciado pela elevação dos níveis de TBARS e da atividade da catalase após 5 horas da última administração. Entretanto, essas alterações redox não foram acompanhadas por modificações significativas nos parâmetros bioquímicos séricos, nem por diferenças histopatológicas significativas entre os grupos Controle e Etanol. Dessa forma, os resultados sugerem que o protocolo experimental promoveu uma resposta oxidativa precoce, porém insuficiente para desencadear lesão hepática significativa nos períodos analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 373–399, 2004.
- BADMUS, O. O.; HILLHOUSE, S. A.; ANDERSON, C. D.; HINDS, T. D.; STEC, D. E. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. *Clinical Science*, v. 136, n. 18, p. 1347–1366, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1042/CS20220572>.
- BERTOLA, A.; MATHEWS, S.; KI, S. H.; WANG, H.; GAO, B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nature Protocols*, v. 8, n. 3, p. 627–637, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.032>.
- BHAUMIK, P.; CHAUDHURI, S. Current concept of management of alcoholic hepatitis. *International Journal of Scientific Study*, v. 12, n. 1, p. 4–10, abr. 2024.
- BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, p. 9–19, 2012.
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol metabolism. *Clinics in Liver Disease*, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>.
- CHAUDHARY, P.; JANMEDA, P.; DOCEA, A. O.; YESKALIYEVA, B.; ABDULL RAZIS, A. F.; MODU, B.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, v. 11, p. 1158198, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>.
- CHIDIAC, A. S.; BUCKLEY, N. A.; NOGHREHCHI, F.; CAIRNS, R. Paracetamol (acetaminophen) overdose and hepatotoxicity: mechanism, treatment, prevention measures, and estimates of burden of disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 19, n. 5, p. 297–317, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/17425255.2023.2223959>.
- CIOARCA-NEDELCU, R.; ATANASIU, V.; STOIAN, I. Alcoholic liver disease—from steatosis to cirrhosis: a biochemistry approach. *Journal of Medicine and Life*, v. 14, n. 5, p. 594–599, 2021. DOI: <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0081>.

COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; LEONCINI, S. *et al.* Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes & Nutrition*, v. 5, p. 101–109, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0159-9>.

CONTRERAS-ZENTELLA, M. L.; VILLALOBOS-GARCÍA, D.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, R. Ethanol metabolism in the liver, the induction of oxidant stress, and the antioxidant defense system. *Antioxidants*, v. 11, n. 7, p. 1258, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11071258>.

CORRAO, G.; BAGNARDI, V.; ZAMBON, A.; LA VECCHIA, C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Preventive Medicine*, v. 38, p. 613–619, 2004. DOI: [10.1016/j.ypmed.2003.11.027](https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2003.11.027)

GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, v. 141, n. 5, p. 1572–1585, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.002>.

GAO, B.; TSUKAMOTO, H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology*, v. 150, n. 8, p. 1704–1709, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.025>.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease. *Chemico-Biological Interactions*, v. 322, p. 109056, 2020.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HAN, H.-S.; KANG, G.; KIM, J. S.; CHOI, B. H.; KOO, S.-H. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 48, n. 3, p. e218, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2015.122>.

HOEK, J. B.; PASTORINO, J. G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*, v. 27, n. 1, p. 63–68, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00215-X](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00215-X).

HYUN, J.; HAN, J.; LEE, C.; YOON, M.; JUNG, Y. Pathophysiological aspects of alcohol metabolism in the liver. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 11, p. 5717, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115717>.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JEON, S.; CARR, R. Alcohol effects on hepatic lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, v. 61, n. 4, p. 470–479, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.R119000547>.

JIANG, Y.; ZHANG, T.; KUSUMANCHI, P.; HAN, S.; YANG, Z.; LIANGPUNSAKUL, S. Alcohol metabolizing enzymes, microsomal ethanol oxidizing system, cytochrome P450 2E1, catalase, and aldehyde dehydrogenase in alcohol-associated liver disease. *Biomedicines*, v. 8, n. 3, p. 50, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8030050>.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LEFKOWITCH, J. H. Morphology of alcoholic liver disease. *Clinics in Liver Disease*, v. 9, n. 1, p. 37–53, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2004.11.001>.

LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol and Alcoholism*, Oxford, v. 24, n. 3, p. 197-211, 1989. DOI: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a044050.

LI, S.; TAN, H.-Y.; WANG, N.; ZHANG, Z.-J.; LAO, L.; WONG, C.-W.; FENG, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 26087–26124, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>.

LOUVET, A.; MATHURIN, P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 12, n. 4, p. 231–242, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.35>.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).

MACKOWIAK, B.; FU, Y.; MACCIONI, L.; GAO, B. Alcohol-associated liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 134, n. 3, e176345, 2024. DOI: 10.1172/JCI176345.

MAHESHWARI, S. *et al.* Imaging of alcohol-associated liver disease. *AJR. American Journal of Roentgenology*, v. 222, n. 1, p. e2329917, 2024. DOI: <https://doi.org/10.2214/AJR.23.29917>.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Doença hepática alcoólica: fisiopatologia e tratamento. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 48, n. 2, p. 140–147, 2011.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE BLOC'H, J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Berlin, v. 92, n. 3, p. 272-283, 2008. DOI: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.

OSNA, N. A.; RASINENI, K.; GANESAN, M.; DONOHUE JUNIOR, T. M.; KHARBANDA, K. K. Pathogenesis of alcohol-associated liver disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 12, n. 6, p. 1492–1513, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.05.004>.

PAPALIMPERI, A. H.; ATHANASELIS, S. A.; MINA, A. D.; PAPOUTSIS, I. I.; SPILIOPOULOU, C. A.; PAPADODIMA, S. A. Incidence of fatalities of road traffic accidents associated with alcohol consumption and the use of psychoactive drugs: a 7-year survey (2011–2017). *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 18, p. 2299–2306, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7787>.

PATEL, R.; MUELLER, M. Alcohol-associated liver disease. In: *StatPearls*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>. Acesso em: 18 maio 2026.

PLATE, A. Y. A.; CRANKSHAW, D. L.; GALLAHER, D. D. The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. *Anesthesia & Analgesia*, v. 101, n. 4, p. 1063–1064, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000166791.30963.EF>.

KREBS, H. A.; FREEDLAND, R. A.; HEMS, R.; STUBBS, M. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochemical Journal*, v. 112, n. 1, p. 117–124, 1969. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj1120117>.

RABELO, A. C. S.; ANDRADE, A. K. L.; COSTA, D. C. The role of oxidative stress in alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Nutrients*, v. 16, n. 8, p. 1174, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu16081174>.

REHM, J.; MATHERS, C.; POPOVA, S.; THAVORNCHAROENSAP, M.; TEERAWATTANON, Y.; PATRA, J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet*, v. 373, n. 9682, p. 2223–2233, 2009. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60746-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60746-7).

SEITZ, H. K. *et al.* Alcohol-related liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, p. 16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0014-7>.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress. In: FINK, G. (ed.). *Encyclopedia of Stress*. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2007. p. 45–48. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>.

SINGAL, A. K.; BATALLER, R.; AHMED, M.; KAMATH, P. S.; SHERLOCK, S. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 114, n. 2, p. 175–194, 2019. DOI: 10.14309/ajg.0000000000000078.

SENIOR, J. R. Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury—past, present, and future. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 92, n. 3, p. 332–339, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.108>.

TAN, H. K.; YATES, E.; LILLY, K.; DHANDA, A. D. Oxidative stress in alcohol-related liver disease. *World Journal of Hepatology*, v. 12, n. 7, p. 332–349, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i7.332>.

TESCHKE, R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects. *Biomedicine*, v. 6, n. 4, p. 106, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicine6040106>.

THEISE, N. D. Histopathology of alcoholic liver disease. *Clinical Liver Disease*, v. 2, n. 2, p. 64–67, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/cld.172>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders*. Geneva: World Health Organization, 2024.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health*, v. 29, n. 4, p. 245–254, 2006.

ZLOCH, Z. Temporal changes of the lipid peroxidation in rats after acute intoxication by ethanol. *Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences*, v. 49, n. 5–6, p. 359–362, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-1994-5-613>.

ANEXO A



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
OURO PRETO**

UFOP

PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Universidade Federal de Ouro Preto

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da associação do consumo crônico de etanol no curso temporal da hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.", protocolada sob o CEUA nº 5848080524 (ID 001011), sob a responsabilidade de **Daniela Caldeira Costa Calsavara e equipe; Maria Laura da Cruz Castro ; Wanderson Geraldo de Lima ; Julio César da Silva Batista** - 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 13/06/2024.

We certify that the proposal "Investigation of the association of chronic ethanol consumption in the time course of paracetamol-induced hepatotoxicity.", utilizing 222 Isogenics mice (222 males), protocol number CEUA 5848080524 (ID 001011), under the responsibility of **Daniela Caldeira Costa Calsavara and team; Maria Laura da Cruz Castro ; Wanderson Geraldo de Lima ; Julio César da Silva Batista** - 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 06/13/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica) e Treinamento

Vigência da Proposta: de 05/2024 a 01/2028 Área: Ciências Biológicas

Origem: Centro de Ciência Animal

Espécie: Camundongos isogênicos

Linhagem: C57BL/6

sexo: Machos

idade: 8 a 12 semanas

Quantidade: 222

Peso: 20 a 30 g

UFOP



PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Ouro Preto, 15 de junho de 2024

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

