

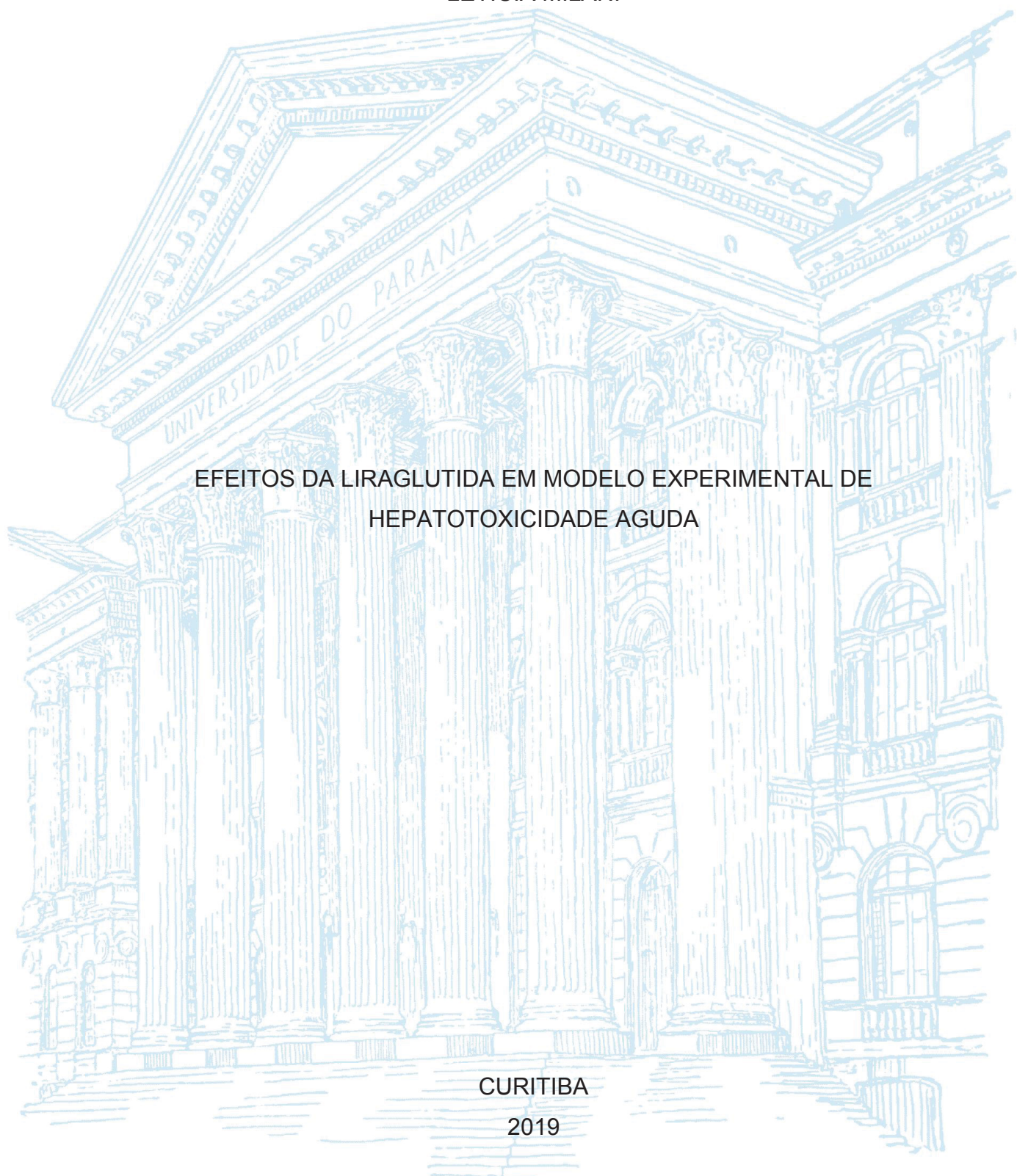
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA MILANI

EFEITOS DA LIRAGLUTIDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HEPATOTOXICIDADE AGUDA

CURITIBA

2019



LETÍCIA MILANI

EFEITOS DA LIRAGLUTIDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
HEPATOTOXICIDADE AGUDA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco.

CURITIBA
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Milani, Letícia

Efeitos da liraglutida em modelo experimental de hepatotoxicidade aguda. / Letícia Milani. – Curitiba, 2019.
67 p.: il.

Orientadora: Alexandra Acco

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Doença hepática induzida por substâncias e drogas 2. Liraglutida 3. Estresse oxidativo I. Título II. Acco, Alexandra III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.31



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LETICIA MILANI**, intitulada: **EFEITOS DA LIRAGLUTIDA EM MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATOTOXICIDADE AGUDA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2019.


ALEXANDRA ACCO
Presidente da Banca Examinadora


MAÍRA MELLO REZENDE VALLE
Avaliador Externo (UFPR-DFISIO)


ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Avaliador Interno (UFPR)

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação tem os principais resultados apresentados na forma de artigo científico, sendo constituída, portanto, por uma revisão de literatura, um artigo científico e considerações finais. Este formato está de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar a sabedoria necessária para o desempenho deste trabalho, bem como permitir meu convívio com pessoas inspiradoras.

Aos meus pais, Silvana e João, meu enorme agradecimento pelo apoio e carinho desde o início da vida, depositando confiança em minha capacidade e tornado minha trajetória sólida. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter pais tão especiais. Agradeço também à minha irmã, Sintia, pelo apoio e troca de conhecimentos.

Agradeço meu companheiro e namorado, Diego, pela alegria que traz a minha vida. Obrigada pela compreensão e força durante mais essa etapa, acompanhando até mesmo meus finais de semana de experimentos.

A minha orientadora Professora Dr^a Alexandra Acco, primeiramente pelo aceite em trabalhar comigo. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos com dedicação a mim e minhas colegas, agregando referências profissionais e pessoais para nosso crescimento.

Agradeço às minhas colegas do Laboratório de Farmacologia e Metabolismo, pelo trabalho e descontração, mesmo durante os momentos críticos, tornando esse período mais divertido. Obrigada também aos amigos de outros laboratórios pelo convívio diário e compartilhamento de experiências.

Agradeço aos professores e servidores técnicos do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição e conhecimento científico.

Aos servidores do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, especialmente Gilmara e Luana, pela ajuda e colaboração.

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

A doença hepática aguda é um problema de saúde global que se desenvolve quando ocorre exposição abusiva a uma droga ou agente químico. O tratamento efetivo dos casos de hepatotoxicidade ainda é limitado e estudos envolvendo novas possibilidades terapêuticas são necessários. A liraglutida, um análogo do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), demonstrou reduzir o acúmulo de gordura e o estresse oxidativo em doenças hepáticas crônicas. Assim, este estudo objetivou investigar o potencial hepatoprotetor e terapêutico da liraglutida frente a um modelo de hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Camundongos Swiss machos foram submetidos a dois protocolos: 1) Pré-tratamento (efeito hepatoprotetor): consistiu no tratamento intraperitoneal prévio com liraglutida (0,057 ou 0,118 mg/kg) ou veículo (água destilada), uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos, e nos dias 6 e 7 de tratamento os animais foram desafiados com CCl₄ a 2% (i.p.; 5 mL/kg); 2) Tratamento tardio (efeito terapêutico): iniciou com o desafio por CCl₄ a 5% (i.p.; 5 mL/kg) seguido do tratamento com liraglutida (0,057 mg/kg) ou veículo por apenas 1 dia. As doses de liraglutida foram calculadas por alometria interespecífica utilizando as doses indicadas para humanos, 0,6 e 1,2 mg/kg, respectivamente. Em ambos os protocolos, anestesia seguida de eutanásia foi realizada 24 horas após o último tratamento, e amostras de sangue, bile e fígado foram coletadas. Biomarcadores de lesão hepática, estresse oxidativo, metabolismo e histologia foram investigados. Além disso, foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar a atividade sequestrante da liraglutida *per se* utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Ambos os protocolos de tratamento com liraglutida atenuaram a hepatotoxicidade do CCl₄, demonstrando seu potencial protetor e curativo, respectivamente. Esses efeitos podem ser atribuídos à preservação do sistema antioxidante celular, uma vez que foram observados níveis aumentados de GSH e da atividade da SOD, e redução na peroxidação lipídica no fígado. A liraglutida também manteve os níveis de glicogênio hepático, indicando preservar o metabolismo frente à lesão. *In vitro*, o análogo de GLP-1 exibiu moderada atividade sequestradora de radicais livres. Tais resultados demonstram o potencial hepatoprotetor e terapêutico da liraglutida, que pode ser atribuído à redução do estresse oxidativo e suporte do metabolismo hepático.

Palavras-chaves: CCl₄; GLP-1; hepatotoxicidade; liraglutida; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Acute liver disease is a current global health problem and develops when an abusive exposure to a drug or chemical agent occurs. Effective treatment for hepatotoxicity cases is limited and studies involving compounds that may promote hepatoprotective and therapeutic effects are necessary. Liraglutide, a glucagon-like peptide (GLP-1) analogue, demonstrated to reduce hepatic fat accumulation and oxidative stress in chronic liver diseases. This study aimed to investigate the hepatoprotective and therapeutic potential of liraglutide against an acute model of hepatotoxicity in mice, induced by carbon tetrachloride (CCl₄). Swiss male mice were submitted to two different protocols: 1) Pretreatment (hepatoprotective effect): consisted of the previous intraperitoneal treatment with liraglutide (0.057 or 0.118 mg/kg) or vehicle (distillate water), once a day, for 7 consecutive days, and on 6th and 7th days of treatment the animals were challenged with i.p 2% CCl₄ (5 mL/kg); 2) Late treatment (therapeutic effect): started with the challenge by 5% CCl₄ (5 mL/kg) followed by the treatment with liraglutide (0.057 mg/kg) or vehicle for only 1 day. Liraglutide doses were calculated by interspecific allometry using the doses indicated for human beings, 0.6 and 1.2 mg/kg, respectively. In both protocols the anesthesia followed by euthanasia was performed 24 h after the last treatment, and samples of blood, liver and bile were collected. Biomarkers of liver damages, hepatic oxidative stress, metabolism and histology were investigated. In addition, an *in vitro* assay was performed to evaluate the scavenging activity of liraglutide *per se* using the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test. Both treatment protocols with liraglutide attenuated the hepatotoxicity induced by CCl₄, demonstrating its protective and curative potential. These effects may be attributed to the preservation of the cellular antioxidant system, since increased levels of GSH and SOD activity, and reduction of lipid peroxidation were observed. Liraglutide also preserved hepatic glycogen levels, indicating maintenance of the liver metabolism in CCl₄ injury. *In vitro*, the GLP-1 analogue exhibited moderated radical scavenging activity. Our results demonstrated the hepatoprotective and therapeutic potential of liraglutide, which may be attributed to the reduction of oxidative stress and metabolism support.

Keywords: Acute liver injury; CCl₄; GLP-1; liraglutide; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microestrutura do tecido hepático e as divisões em lóbulos.....	17
Figura 2 – Metabolismo hepático de xenobióticos podendo promover a detoxicação (A) ou formação de metabólitos reativos com posterior lesão tecidual (B).....	18
Figura 3 – A intoxicação por paracetamol e outras drogas como importantes causa de insuficiência hepática aguda na América e Europa.....	20
Figura 4 – Sistema antioxidante e espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o processo de estresse oxidativo via metabolização hepática de drogas.....	25
Figura 5 – Metabolismo hepático e mecanismo de toxicidade do CCl ₄	27

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 – Experimental design in mice that were challenged with CCl ₄ and received liraglutide pretreatment (A) or late treatment (B).....	36
Figure 2 – Relative weight of the liver in mice that were subjected to CCl ₄ -induced liver injury, expressed as a percentage of body weight.....	41
Figure 3 –Biochemical parameters in mice that were subjected to CCl ₄ -induced acute liver injury and treated with water, liraglutide, or N-acetylcysteine.....	42
Figure 4 – Histological images of liver sections (HE staining) from representative mice from the experimental groups.....	44
Figure 5 –Effects of liraglutide on hepatic oxidative stress in CCl ₄ -induced hepatic injury.....	45

Figure 6 – Free radical scavenging activity of liraglutide in the DPPH assay.....	46
Figure 7 – Effects of liraglutide on hepatic and biliary lipids.....	48
Figure 8 – Liraglutide hepatic effects against CCl ₄ acute injury.....	52
Figure S1 – Body weight evolution in experimental time.....	60
Figure S2 – Measurement of the antioxidant enzymes hepatic activity.....	60

LISTA DE TABELAS
ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 – Histopathological parameters observed in CCl₄-induced liver injury.....43

Table 2 – Hepatic metabolites evaluation after CCl₄-induced liver injury.....47

Table S1 - Absolute liver weight after CCl₄-induced liver injury in mice.....58

Table S2 – Organs relative weight after CCl₄-induced liver injury in mice.....59

Table S3 – Hematological parameters after CCl₄-induced liver injury in mice.....59

LISTA DE SIGLAS

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

ANOVA: Análise estatística de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato aminotransferase

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT: Catalase

CCl₄: Tetracloreto de carbono

CCl₃: Radical triclorometil

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CHOL: Colesterol total

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CYP450: Citocromo P450

DILI: Lesões hepáticas induzida por drogas (Drug Induced Liver Injury)

DPPH: *2,2-diphenil-1-picrilhidrazil*

EROS: Espécies reativas de oxigênio

Fas: Receptor superficial de morte celular

FDA: Food and Drug Administration

GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon-1

GPx: Glutaciona peroxidase

GR: Glutaciona redutase

GSH: Glutaciona reduzida

GST: Glutaciona-S-transferase

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HE: Hematoxilina e eosina

IR: Isquemia e reperfusão

LFC: Conteúdo hepático de lipídeos

LPO: Peroxidação lipídica

MTX: Metotrexato

NAC: N-acetilcisteína

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NAFLD: Doença hepática gordurosa não-alcoólica (Non-alcoholic Fatty Liver Disease)

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH[•]: Radical hidroxila

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SEM: Erro padrão da média

SINITOX: Sistema nacional de informações toxico-farmacológicas

SOD: Superóxido dismutase

TG: Triglicerídeos

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE ABREVIATURAS

µl: microlitro

µg: micrograma

cm³: centímetro cúbico

dl: decilitro

Fig.: figura

g: grama

h: hora

i.p.: intraperitoneal

kg: quilograma

l: litro

mg: miligrama

min: minuto

ml: mililitro

nm: nanômetro

p.o.: via oral

s: segundo

Veh: Veículo

SUMÁRIO

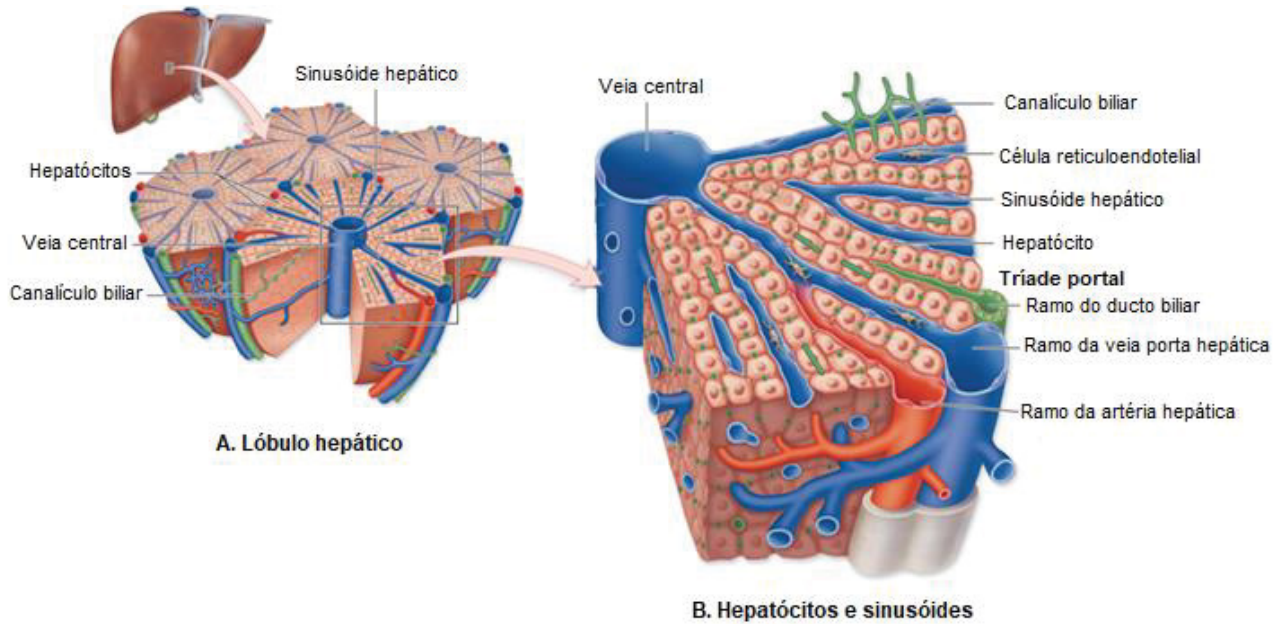
1 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 O Fígado	16
1.2 Lesões hepáticas induzida por drogas	18
1.3 Estresse oxidativo	23
1.4 Modelos de hepatotoxicidade <i>in vivo</i>	25
1.5 Liraglutida.....	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 ARTIGO CIENTÍFICO	31
Abstract.....	32
3.1 Introduction	33
3.2 Material and methods.....	34
3.3 Results	40
3.4 Discussion.....	49
3.5 References.....	53
3.6 Supplementary material	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
5 REFERÊNCIAS	62

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O Fígado

O fígado, glândula abdominal anexa ao sistema digestivo, corresponde ao segundo maior órgão do corpo humano, pesando entre 1,0 e 1,5 kg. Sua estrutura é constituída por quatro lobos: esquerdo, direito, caudado e quadrado, os quais são internamente compostos por milhares de pequenas unidades funcionais denominadas lóbulos (Figura 1). Os lóbulos hepáticos apresentam um formato hexagonal e são constituídos em sua maioria por células denominadas hepatócitos, os quais compõem cerca de 80% da massa total do órgão e encontram-se dispostos radialmente a partir da veia central (SEELEY et al., 2003). Entre as placas de hepatócitos são formados os sinusóides capilares (Figura 1), pequenos vasos responsáveis por conectar e conduzir o sangue rico em nutrientes e oxigênio do espaço porta em direção à veia central (STENVALL et al., 2014). Acopladas às células endoteliais dos sinusóides capilares encontram-se também importantes células de defesa hepática, as células de Kupffer, que atuam como macrófagos residentes e são capazes de liberar mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio quando ativas (DIXON et al., 2013). Entre as paredes endoteliais dos sinusóides capilares e a membrana dos hepatócitos há o espaço de Disse, o qual abriga em seu lúmen as células estreladas ou células de Ito, que por sua vez exercem função de armazenamento do retinol, quando em seu estado quiescente. No entanto, quando em condições de estresse passam para seu estado ativo e desempenham um papel maléfico, produzindo matriz extracelular em elevadas quantidades, fato que pode contribuir e agravar o desenvolvimento de algumas doenças hepáticas, principalmente aquelas acompanhadas de fibrose (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017). Todos esses componentes atuam em conjunto para manter a homeostase do fígado, permitindo com que ele exerça suas atividades de maneira adequada, mas quando ativados demasiadamente podem exercer uma papel importante e acelerar a progressão de doenças hepáticas.

FIGURA 1: MICROESTRUTURA DO TECIDO HEPÁTICO E AS DIVISÕES EM LÓBULOS.

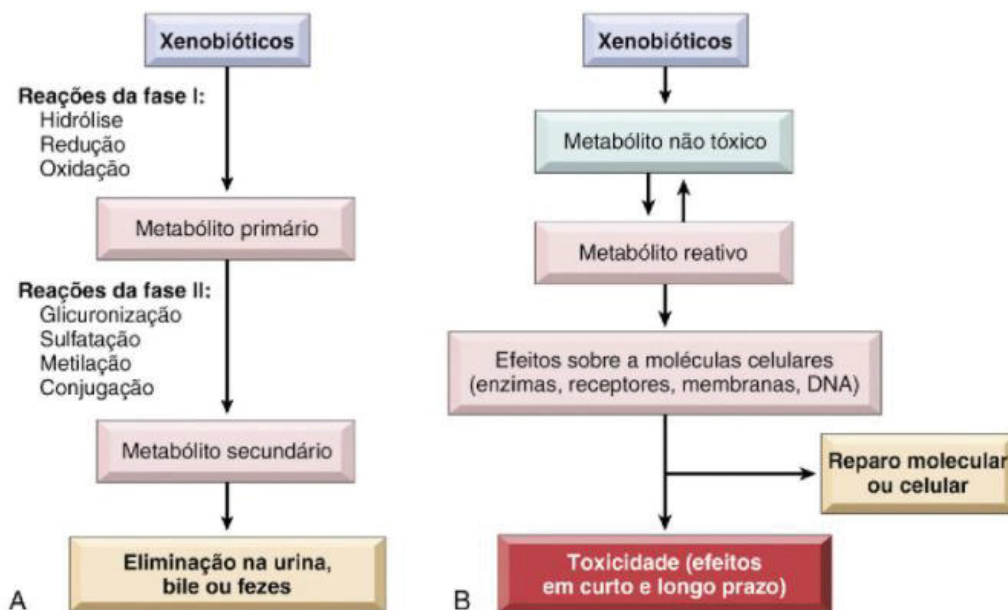


FONTE: Adaptado de Mescher (2010).

As funções exercidas pelo fígado somam mais de 250, mas o órgão tem como objetivo primordial realizar o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, sendo essencial para a manutenção do equilíbrio corporal e proteção contra agentes intoxicantes. Assim, é considerado a primeira linha de defesa do organismo, visto que trata-se de um dos primeiros órgãos a manter contato com substâncias ingeridas oralmente (BANDEIRA, 2017). A biotransformação das substâncias é essencial para que metabólitos inativos mais polares sejam gerados e posteriormente excretados, ocorrendo classicamente em duas etapas, denominadas fase I e fase II. As reações de fase I, também conhecidas como reações de funcionalização, ocorrem principalmente via sistema CYP450, no retículo endoplasmático dos hepatócitos, e envolvem principalmente mecanismos de oxidação, redução e hidrólise. O processo é responsável por promover a introdução ou exposição de grupos funcionais polares às moléculas, utilizando NAD ou NADP⁺ como cofatores (BRUNTON et al., 2012). No entanto, a etapa pode resultar na formação de compostos ainda mais tóxicos do que a molécula original. Já nas reações de fase II, também denominadas reações de biossíntese, ocorre a conjugação do produto original ou de seus metabólitos gerados na fase anterior com moléculas polares, como ácido glicurônico e glutathione (GSH), formando complexos inativos e altamente polares (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2009).

Sendo assim, as reações de biotransformação executadas pelo fígado são consideradas vias de desintoxicação do organismo, uma vez que conferem uma maior polaridade aos compostos e metabólitos, facilitando a excreção, principalmente via renal. No entanto, nem sempre produzem efeitos benéficos ao organismo, uma vez que em alguns casos podem produzir como subproduto metabólitos tóxicos e levar à formação de precursores instáveis para espécies reativas, os quais resultarão em posterior lesão tecidual (Figura 2) (SINGH et al., 2011). Devido à elevada importância deste órgão na homeostase corporal, qualquer lesão pode resultar em sérios problemas, de caráter agudo ou crônico, como esteatose, hepatite e carcinoma hepático.

FIGURA 2: METABOLISMO HEPÁTICO DE XENOBIÓTICOS PODENDO PROMOVER A DETOXIFICAÇÃO (A) OU FORMAÇÃO DE METABÓLITOS REATIVOS COM POSTERIOR LESÃO TECIDUAL (B).



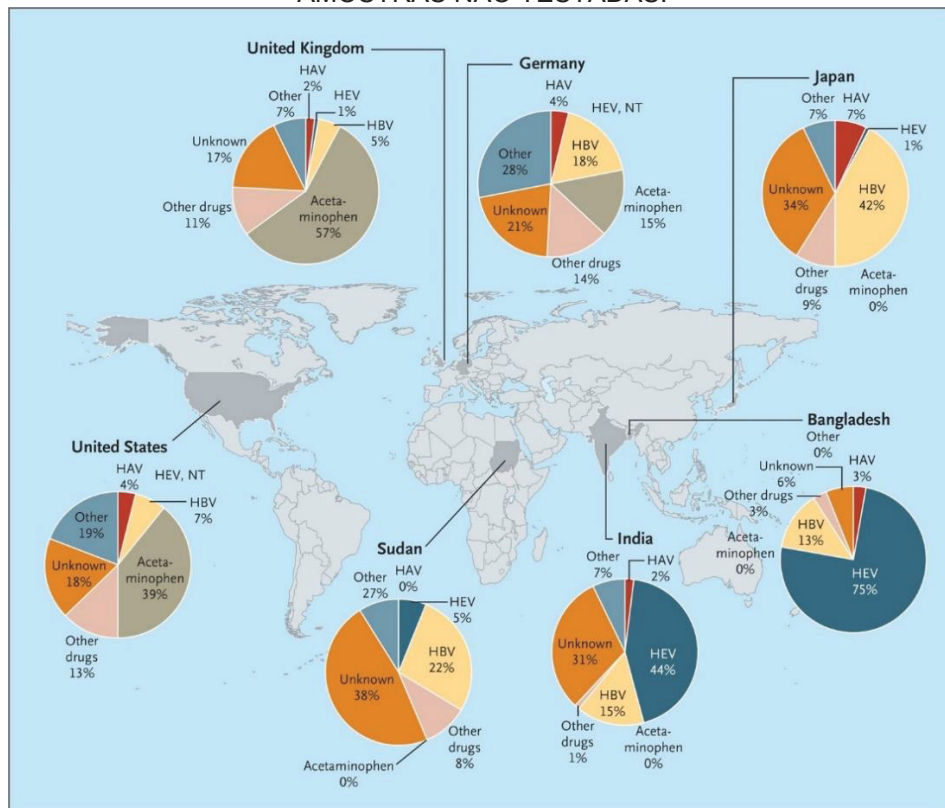
FONTE: Adaptada de Kumar et al. (2016).

1.2 Lesões hepáticas induzida por drogas

As lesões hepáticas induzida por drogas (DILI), denominação derivada do inglês “Drug Induced Liver Injury”, são consideradas potenciais complicações que podem ser causadas por diferentes agentes como plantas, compostos químicos e drogas de uso terapêutico, e consistem atualmente na principal reação adversa envolvida no insucesso de ensaios clínicos (CHAN; BENET, 2017). Essas lesões

resultam do efeito direto da substância sobre as células hepáticas ou do efeito de produtos reativos formados durante a etapa de biotransformação da substância administrada, provocando a ruptura do equilíbrio intracelular dos hepatócitos e contribuindo para o acúmulo de toxinas e alterações genéticas. A classificação das DILI é realizada com base em sua previsibilidade, sendo denominada intrínseca quando esperada, devido à elevada dose ou administração combinada de medicamentos pelo paciente, e idiossincrática quando aleatória e não dependente da dose (ROBLES-DÍAZ et al., 2016). No Brasil, é elevada a incidência de intoxicação por medicamentos, sendo considerada a principal causa de intoxicação segundo estatísticas do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas e estando presente com frequência entre as causas de insuficiência hepática aguda. Somente em 2016, foram contabilizados 27.261 casos de intoxicações por medicamentos, dado correspondente a 35% do total de casos nacionais (SINITOX, 2016). No contexto internacional, por sua vez, o número de lesões hepáticas ocasionadas por drogas também é bastante elevado (Figura 3) e a importância delas é tamanha que em 2004 o U.S. Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) foi criado, consistindo de uma rede com experientes hepatologistas e voltada a resolver os desafios desses quadros de intoxicação. O sistema é apto a auxiliar na criação de registros bem caracterizados dos pacientes, bem como em apresentar em seu conteúdo estudos diagnósticos, epidemiológicos e mecanísticos que auxiliam os profissionais de saúde (HAYASHI, 2016). Outra importante iniciativa nesse contexto, foi o desenvolvimento do website LiverTox[®] pelo governo americano, o qual provém informações atualizadas e precisas de diagnóstico, causas, frequência e padrões de lesões atribuídas a medicações prescritas e não prescritas (BJORNSSON, 2016). Estatísticas propostas pelo LiverTox[®] revelam que 53% das drogas de uso clínico já ocasionaram pelo menos um caso reportado de DILI, e dentre essas, 48 drogas são responsáveis por causar mais de 50 casos descritos de lesões hepáticas. Como consequência, diversos são os casos de óbitos associados às intoxicações medicamentosas, sendo contabilizada nos últimos anos no Brasil uma média de 0,20% de mortes associadas a tal circunstância (SINITOX, 2016). Tais dados podem ser justificados em parte pelo aumento no número de acidentes envolvendo medicamentos, bem como pela crescente prática da automedicação pela população, que segundo dados reportados pelo SINITOX (2016), foi responsável por desenvolver mais de 800 casos de intoxicação.

FIGURA 3: A INTOXICAÇÃO POR PARACETAMOL E OUTRAS DROGAS COMO IMPORTANTES CAUSAS DE INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA NA AMÉRICA E EUROPA. LEGENDA: HAV, VÍRUS DA HEPATITE A; HBV, VÍRUS DA HEPATITE B; HEV, VÍRUS DA HEPATITE E; NT: AMOSTRAS NÃO TESTADAS.



FONTE: Bernal and Wendon (2013).

Diversos são os mecanismos descritos e envolvidos em processos de lesões hepáticas promovidas por agentes químicos e medicamentos, podendo estes exercer efeitos diretos ou indiretos sobre as estruturas celulares (LICATA, 2016). Dentre esses mecanismos destacam-se: reações de alta energia no citocromo P450, comprometendo a homeostase do cálcio com a ruptura de fibrilas intracelulares e rompimento de hepatócitos (BERTOLAMI, 2005), disfunção de proteínas transportadoras relacionadas com o fluxo de ácidos (ROTH; LEE, 2017), reações imunes geradas pela formação de metabólitos das drogas formados no fígado (DARA et al. 2016), hepatotoxicidade promovida por células T com inflamação adicional mediada por neutrófilos (ADAMS et al., 2010), apoptose mediada por resposta imune via TNF- α e Fas (LICATA, 2016) e estresse oxidativo gerado por dano a organelas intracelulares (KIM; NAISBITT, 2016). Segundo trabalho de Suk e Kim (2012) os mecanismos de lesões hepáticas agudas ocorrem em três etapas consecutivas que interligam os mecanismos acima citados. Inicialmente há indução de estresse celular

pelo agente causal, desencadeando reações imunológicas e promovendo a segunda etapa com a alteração da permeabilidade mitocondrial, enquanto a terceira e última envolve a morte celular por apoptose ou necrose. Frente a tais mecanismos são gerados padrões de lesões hepáticas, que incluem comprometimentos vasculares, esteatose, granuloma, hepatite e neoplasia, os quais posteriormente, podem resultar em morte celular por apoptose ou necrose (YUAN; KAPLOWITZ, 2013). O grau de comprometimento do fígado nestes casos dependerá tanto de fatores associados ao paciente, como também daqueles ligados ao ambiente e ao agente causal, especialmente da dose e tempo de exposição. Seguindo estas variações, a intensidade das lesões pode ser comumente caracterizada como subclínica, aguda ou crônica. No entanto, existem ainda outros métodos de classificação do grau de lesão hepática, como o disponibilizado pelo LiverTox[®], onde a variação ocorre de suave a fatal, de acordo com os níveis de biomarcadores avaliados.

Os sinais e sintomas da hepatotoxicidade são fatores que influenciam no difícil diagnóstico e conseqüente elevação no número de casos graves, uma vez que são considerados variados e pouco específicos. O paciente pode manifestar febre baixa, hipoproteinemia, náuseas, dor abdominal e icterícia, dependendo do tempo e evolução do quadro de intoxicação (DAVID; HAMILTON, 2010). No entanto, sabe-se que a maioria dos pacientes envolvidos em um quadro de DILI é assintomática ou manifesta tais sintomas quando o grau de lesão já está severo (GARCÍA-CORTÉS et al., 2018). Por isso, seu diagnóstico precoce requer uma abordagem completa do paciente, envolvendo desde uma anamnese minuciosa até exames laboratoriais de baixa e alta complexidade, quando necessários. Fatores como alimentação, alcoolismo, histórico familiar e uso de drogas nos últimos meses devem ser investigados para identificação da possível causa, juntamente com exame físico, onde anomalias como icterícia e hepatomegalia poderão ser detectadas (LIVERTOX, 2018). De maneira complementar, exames sanguíneos são realizados para verificar possíveis elevações no conteúdo de enzimas hepáticas e bilirrubinas séricas, sendo as aminotransferases os indicadores mais requeridos em casos de lesão no fígado (KIM et al., 2008). As aminotransferases estão presentes em grandes concentrações no interior dos hepatócitos e são liberadas para o sangue quando há rompimento da membrana celular, refletindo uma importante redução na massa funcional hepática. Atualmente, sabe-se que a alanina aminotransferase (ALT) é um preditivo mais específico de dano hepático, uma vez que sua presença é predominante no fígado,

enquanto a aspartato aminotransferase (AST) encontra-se distribuída em altas quantidades também em outros tecidos, como coração e músculos (MARRONE et al., 2017; MCGILL, 2016). No entanto, ambas são mensuradas para fim diagnóstico, juntamente com outras enzimas de caráter hepático como a fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamiltanspeptidase (GGT). Exames de imagem e biópsia, por sua vez, não apresentam caráter mandatório para diagnósticos de DILI e são aplicados apenas em casos mais difíceis e específicos, como para diferenciar de hepatite autoimune (CHALASANI et al., 2014). Com a finalidade de reunir todos os dados coletados do paciente e fornecer um diagnóstico mais exato de DILI, desenvolveu-se em 1993 um sistema de diagnóstico por meio de atribuição de pontos denominado “Método de Avaliação da Causalidade Roussel Uclaf” (RUCAM), no qual a pontuação atingida pelo paciente reflete a probabilidade da lesão hepática ser devida a uma medicação específica (TESCHKE; DANAN, 2016; LIVERTOIX, 2017).

Uma vez confirmada a toxicidade por droga, o tratamento é outro desafio, pois não existem terapias específicas para esses casos. A medida inicial e principal é a retirada do agente causal, realizada em conjunto com um acompanhamento constante por meio da mensuração sérica das transaminases, ALP e bilirrubinas (YU et al., 2017). Em grande parte dos casos, as DILI iniciam sua resolução alguns dias após cessar o agente causal, mas em casos de lesões persistentes pode-se optar pelo uso de algumas substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes como medida auxiliar. Na literatura encontramos “antídotos” bem estabelecidos para uso terapêutico em casos específicos de DILI, como a N-acetilcisteína em overdoses de paracetamol ou lesões colestatias (GIORDANO et al., 2014). Apesar dessas alternativas, em alguns casos a lesão persiste por meses e torna-se crônica (LIVERTOIX, 2018), evoluindo rapidamente para um quadro de insuficiência hepática, onde o paciente pode necessitar do transplante de fígado, que, embora radical, é a única terapia eficiente para o estágio (DINIZ, 2016; STINE; LEWIS, 2016). Diante dos severos graus de lesões hepáticas associados a fármacos e agentes químicos, e da ausência de fármacos específicos que possam impedir ou mesmo reverter tais lesões, faz-se necessário buscar novas terapias. A carência de terapias associada aos severos danos hepatocelulares resultam hoje em um índice de mortalidade superior a 10%, podendo esse número chegar a 80% quando referente aos casos de insuficiência hepática aguda (ROBLES-DIAZ et al., 2014; BJÖRNSSON; BJÖRNSSON, 2017).

1.3 Estresse oxidativo

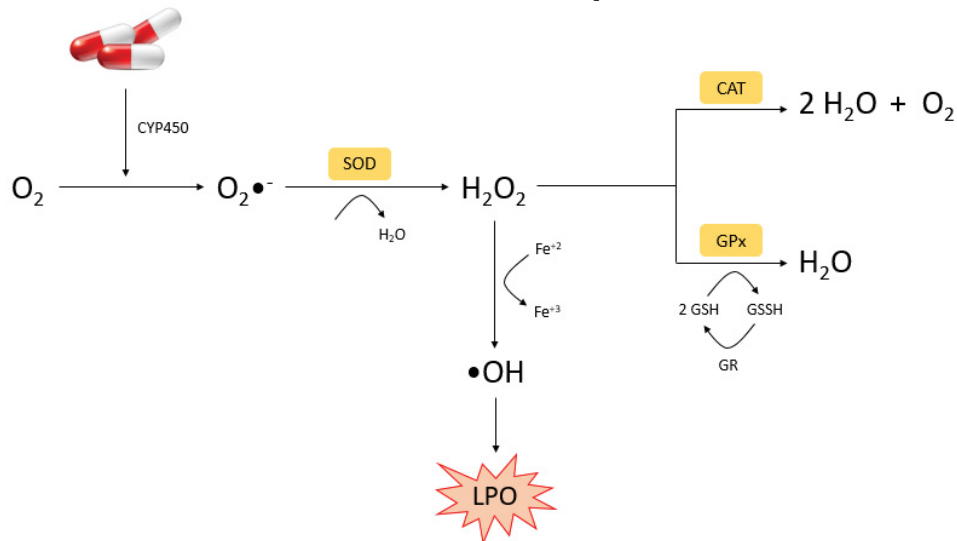
Dentre os inúmeros mecanismos envolvidos no desenvolvimento das lesões hepáticas induzidas por drogas, o estresse oxidativo encontra-se entre os mais frequentes (BATTINO; GIAMPIERI, 2018), sendo definido como um estado de desequilíbrio entre as quantidades de substâncias oxidantes formadas e os antioxidantes presentes no organismo (YOSHIOKA et al., 2016). Portanto, é um processo bem caracterizado pela formação excessiva de diversos radicais livres, principalmente das espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais apresentam em sua estrutura um ou mais elétrons desemparelhados (LI et al., 2015) capazes de se conectar a alvos celulares, como proteínas e fosfolipídios de membrana, com objetivo de estabilização da molécula (BANDEIRA, 2017). Dentre essas espécies reativas de oxigênio destacam-se o radical superóxido (O_2^{\bullet}), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formados a partir da redução progressiva do oxigênio molecular (APEL; HIRT, 2004). Assim, ao se ligarem às estruturas celulares promovem alterações significativas, que incluem desde danos proteicos até danos ao material genético. A peroxidação lipídica (LPO), caracterizada pela oxidação dos fosfolipídios de membrana e resultando em perda de fluidez e comprometimento celular, é uma das consequências mais representativas do processo de estresse oxidativo (HAUCK; BERNLOHR, 2016). Além disso, a deterioração ou redução da atividade de proteção das substâncias antioxidantes também contribui para o processo (PISOSCHI; POP, 2015), estando todos esses fatores associados ao favorecimento de diversas enfermidades, dentre elas as doenças neurodegenerativas e as neoplasias (BARBOSA et al., 2010).

Mesmo sob condições de normalidade, as células hepáticas produzem demasiadamente radicais livres, através do processo metabólico de oxidação, o qual é responsável por contribuir para a produção energética celular (SIRAKI et al., 2018). No entanto, a presença de componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema antioxidante endógeno consegue atrasar ou inibir a ação dessas espécies reativas, impossibilitando a promoção de danos celulares. O sistema glutatona, por exemplo, é um dos componentes antioxidantes mais estudados atualmente e que apresenta um papel primordial nesse processo de homeostase, realizando a defesa celular de maneira dependente de NADH (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). Sua composição abrange o tripeptídeo glutatona (GSH) e uma matriz de enzimas funcionalmente relacionadas, incluindo a glutatona S-transferase (GST), a glutatona peroxidase

(GPx) e a glutathione redutase (GR). Estes componentes são utilizados, em conjunto com LPO, como biomarcadores do processo de estresse oxidativo (CHENG et al., 2017). De maneira complementar, há a atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que integram a primeira linha de defesa antioxidante enzimática celular (AGUILAR et al., 2016). Enquanto a superóxido dismutase (SOD) está envolvida no desarranjo de ânions superóxido, através da sua conversão em H_2O_2 e O_2 , a enzima catalase (CAT) atua na neutralização do H_2O_2 formado, produzindo como metabólitos H_2O e O_2 , conforme mostrado na Figura 4 (LUBRANO; BALZAN, 2015). A presença desses componentes antioxidantes enzimáticos no fígado é elevada, portanto, a quantificação de suas atividades no tecido é um importante critério de avaliação do dano celular por esse mecanismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A indução do estresse oxidativo envolve tanto fatores internos do indivíduo, geralmente relacionados a processos metabólicos, bem como fatores externos, como a variação de temperatura e contato excessivo com compostos químicos (STOCKER, KEANEY, 2004). Diversos fármacos presentes no mercado atualmente, quando metabolizados via sistema CYP450, formam radicais instáveis em excesso, que quando não combatidos podem iniciar o processo de estresse oxidativo (BANERJEE et al., 2016). Portanto, casos de hepatotoxicidade promovida pelo uso abusivo de medicamentos são caracterizados pelo elevado índice de estresse oxidativo. Assim, aumentaram os estudos em busca de novas substâncias antioxidantes que apresentem algumas características essenciais, como a capacidade de extinguir especificamente ou contribuir para a eliminação de espécies reativas, e efeito positivo na expressão de genes que codificam substâncias antioxidantes (BARREIROS et al., 2006). Tais substâncias poderiam ser empregadas em uma gama de enfermidades que têm o estresse oxidativo como fator patogênico, dentre elas as doenças hepáticas, o diabetes e o câncer.

FIGURA 4: SISTEMA ANTIOXIDANTE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) GERADAS DURANTE O PROCESSO DE ESTRESSE OXIDATIVO VIA METABOLIZAÇÃO HEPÁTICA DE DROGAS. LEGENDA - O_2 : OXIGÊNIO MOLECULAR; $O_2^{\bullet-}$: ÂNION SUPERÓXIDO; H_2O_2 : PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO; H_2O : ÁGUA; OH^{\bullet} : ÂNION HIDROXILA; FE: FERRO; SOD: SUPERÓXIDO DISMUTASE; CAT: CATALASE; GSH: GLUTATIONA REDUZIDA; GPX: GLUTATIONA PEROXIDASE; GR: GLUTATIONA REDUTASE; GSSH: GLUTATIONA OXIDADA; LPO: LIPOPEROXIDAÇÃO.



FONTE: Adaptado de Ojha et al. (2011).

1.4 Modelos de hepatotoxicidade *in vivo*

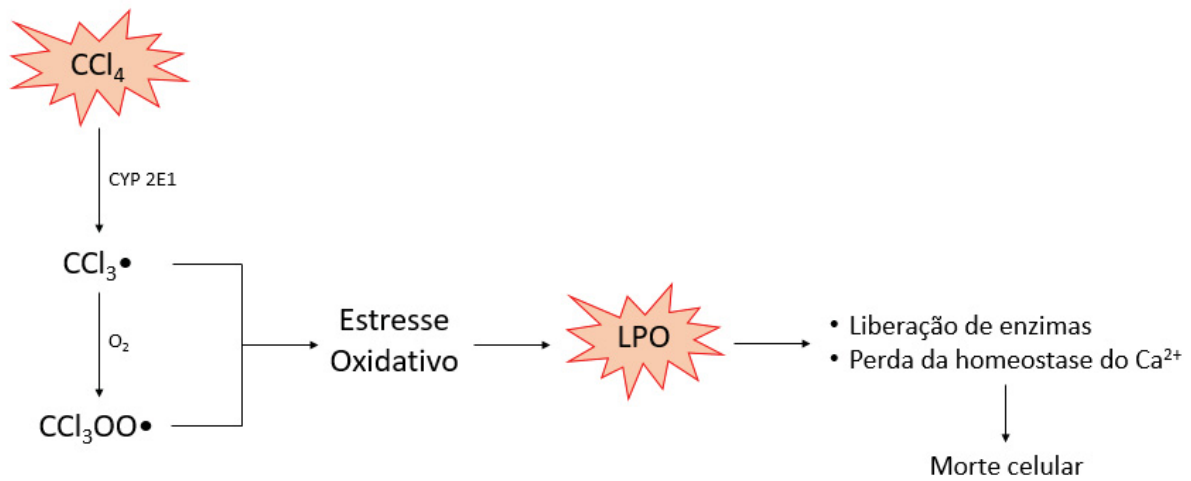
O desenvolvimento laboratorial de modelos experimentais adequados é fundamental para o estudo e compreensão de diversas patologias. Tratando-se da hepatotoxicidade induzida por drogas, encontramos atualmente na literatura alguns modelos de experimentação animal já bem estabelecidos, como aqueles induzidos pelo paracetamol (APAP) e tetracloreto de carbono (CCl_4), ambos passíveis de serem realizados tanto em ratos quanto em camundongos.

O paracetamol, medicamento analgésico de livre comercialização, é responsável por induzir a forma mais conhecida e estudada de dano ao tecido hepático, ocorrendo este em indivíduos adultos após a administração de doses superiores a 10 g (LORENZONI et al., 2014). Quando administrado em doses terapêuticas, sua metabolização hepática ocorre principalmente via reações de fase II, as quais através da conjugação com glucuronatos e sulfatos formam subprodutos não tóxicos, posteriormente secretados através da urina. Nessas condições, apenas uma pequena parcela do paracetamol (10%) é metabolizada via citocromo P450, principalmente pelas enzimas CYP1A2 e 3A4, formando baixas quantidades de um metabólito reativo denominado n-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI). O NAPQI

apresenta grande afinidade pelas estruturas celulares, mas consegue ser rapidamente eliminado quando em baixas concentrações, através da atuação do sistema glutathiona, não sendo capaz de desenvolver assim dano celular (YOON et al., 2016). Já em condições de overdose do paracetamol, a saturação da principal via de metabolismo é observada, assim como um consequente desvio desse processo para o sistema CYP450. Como resultado tem-se uma abundante síntese do NAPQI e em concomitante a depleção dos níveis de glutathiona (GSH), promovendo um acúmulo da molécula reativa no citoplasma e favorecendo sua interação covalente com as estruturas dos hepatócitos (LIVERTOX, 2018).

Outro modelo muito utilizado para estudos de doenças hepáticas agudas é aquele induzido pelo tetracloreto de carbono (CCl_4), solvente sintético utilizado nas indústrias como agente refrigerante e para realização de limpeza a seco. O primeiro estudo envolvendo a promoção de hepatotoxicidade pelo CCl_4 foi realizado por Cameron e Karunaratne (1936) e até os dias atuais este modelo vem sendo reproduzido em laboratório para estudo do tecido hepático, compondo um dos modelos mais delineados da literatura. Seus efeitos tóxicos também estão relacionados com o metabolismo hepático, o qual ocorre principalmente via sistema CYP450. Sendo assim, sua biotransformação pela CYP2E1 resulta na produção de radicais triclorometil ($\text{CCl}_3\bullet$), os quais apresentam alta capacidade de se ligar às estruturas celulares na tentativa de reestabelecer sua estabilidade, comprometida pelo elétron desemparelhado presente em sua estrutura (RITESH et al., 2015). Além desse dano inicial, o radical triclorometil também apresenta grande capacidade de reagir com o oxigênio molecular, promovendo a formação do radical triclorometil peróxido ($\text{CCl}_3\text{OO}\bullet$), o qual está fortemente associado à peroxidação lipídica das membranas. Diante disso, sabe-se que a principal consequência da toxicidade induzida pelo CCl_4 é o rompimento das membranas celulares, ocasionando perda da sua integridade e interferindo de maneira negativa na homeostase do Ca^{2+} (RECKNAGEL et al., 1989), conforme representado na figura 5. O aumento de cálcio intracelular é considerado um evento crítico para a célula, uma vez que é capaz de inativar organelas e enzimas celulares, colaborando com o desenvolvimento do estresse oxidativo e o início da morte celular (BRAILSFORD et al., 2001). Além disso, com o avanço do quadro de peroxidação lipídica, ocorre também o extravasamento de enzimas hepáticas para a corrente sanguínea, como é o caso das aminotransferases e fosfatases (OZER et al., 2008).

FIGURA 5: METABOLISMO HEPÁTICO E MECANISMO DE TOXICIDADE DO CCL₄. LEGENDA - CCL₄: TETRACLORETO DE CARBONO; CYP: CITOCROMO; CCL₃•: RADICAL TRICLOROMETIL; O₂: OXIGÊNIO MOLECULAR; CCL₃OO•: RADICAL TRICLOROMETIL PERÓXIDO; LPO: LIPOPEROXIDAÇÃO; CA: CÁLCIO.



FONTE: Adaptado de Vieira (2014).

Um terceiro modelo para estudo da hepatotoxicidade ainda não totalmente elucidado, é aquele induzido pelo metotrexato (MTX), medicamento antimetabólito utilizado no tratamento de artrite reumatoide e quadros oncológicos. Seu mecanismo de toxicidade hepática vem sendo bastante discutido e acredita-se que esteja fortemente relacionado com a desregulação da defesa antioxidante celular, causando danos pelo desenvolvimento do estresse oxidativo. Fato esse justificado pela redução na síntese da metionina, molécula fundamental para a produção de enzimas antioxidantes (MAHMOUD et al., 2017). De maneira complementar, promove também redução nas reservas hepáticas de folato, resultando na inibição da síntese dos nucleotídeos timidilato e purina, e comprometendo assim a síntese dos ácidos nucleicos e a recuperação celular diante do tratamento agressivo (BATH et al., 2014). Existem ainda aqueles estudos que indicam uma possível participação dos mediadores inflamatórios, como TNF- α e óxido nítrico, intensificando o desequilíbrio redox e o quadro de lesão tecidual (ABO-HADED et al., 2017). Devido a todas essas características e mecanismos em comum estes modelos são considerado fidedignos de muitas DILI provocadas por fármacos de uso clínico, as quais se desenvolvem por mecanismos muito semelhantes a estes apresentados (CORRÊA-FERREIRA et al., 2017).

1.5 Liraglutida

A liraglutida consiste em um recente fármaco hipoglicemiante, análogo sintético do hormônio GLP-1 (glucagon), utilizado para o controle do diabetes tipo 2. Foi aprovado e registrado pelo FDA e ANVISA no ano de 2010 para uso em adultos, sendo atualmente disponibilizado sob nome comercial de Victoza[®]. O medicamento se apresenta em um sistema de aplicação injetável, conhecido como caneta, onde o paciente pode administrar três diferentes doses, sendo elas 0,6, 1,2 ou 1,8 mg/kg. Alguns anos após a regularização do Victoza[®], a empresa detentora do registro (Novo Nordisk), lançou no mercado uma nova versão do fármaco, denominada Saxenda[®], disponibilizando aos usuários a alternativa de administrar doses maiores, de 2,4 ou 3,0 mg/kg. O mecanismo de ação da liraglutida se inicia com a ligação da molécula ao receptor de GLP-1 endógeno, ativando-o e potencializando a secreção da insulina de maneira dependente de glicose pelas células beta pancreáticas. Efeitos adicionais podem ser observados após a administração desta incretina sintética, como o aumento na massa de células beta pancreáticas e a redução do peso corporal. Após a administração, a droga circula no organismo em quantidades bem acima da endógena, e também permanece durante mais tempo na circulação sanguínea, promovendo dessa forma um atraso no esvaziamento gástrico com promoção de saciedade (LEE et al., 2012). As ações da liraglutida de maneira indireta também diminuem a glicotoxicidade e a lipotoxicidade (ação dos lipídeos no desenvolvimento da resistência à insulina), proporcionando uma melhora na condição das células beta pancreáticas. Diante disso, observam-se duas características importantes para o sucesso da atividade da liraglutida no organismo: sua elevada homologia à incretina humana (97%) e seu prolongado tempo de ação, devido à resistência da estrutura à atuação da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), responsável pelo seu metabolismo (VICTOZA, 2014).

Diversos estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos dos agonistas de GLP-1 em pacientes com esteatose hepática, reduzindo significativamente os níveis de enzimas hepáticas no sangue e aumentando a autofagia de hepatócitos lesados em pacientes com diabetes tipo 2 (SKRSYPCSAK; LOCATELLI, 2013). Esse efeito secundário no tecido hepático, conhecido como efeito idiossincrático, foi também reportado por Petit et al. (2017), em estudo clínico realizado com pacientes diabéticos, onde os autores observaram os efeitos do tratamento por seis meses com 1,2 mg/dia de liraglutida sobre o conteúdo de gordura hepática (LFC). Os dados

apontam uma redução significativa do LFC em pacientes com diabetes tipo 2 não-controlada, motivada pela redução do peso corporal. Além disso, a possível atuação hepatoprotetora da liraglutida também já foi avaliada frente ao modelo de lesão hepática por isquemia e reperfusão (IR) em ratos, no qual a droga apresentou potencial anti-inflamatório, antioxidante e inibidor da apoptose (ABDELSAMEEA et al., 2016).

Apesar disso, ainda são escassos os dados sobre os efeitos preventivos e terapêuticos dos análogos GLP-1 contra toxicidade induzida por medicamentos e outros compostos químicos. Diante deste fato, bem como da facilidade de obtenção da liraglutida em farmácias comerciais e dos efeitos positivos acima citados sobre as células hepáticas, a liraglutida torna-se um interessante alvo de estudo frente a modelos de toxicidade hepática aguda. Além disso, vale destacar que casos de hepatotoxicidade promovidos pela liraglutida *per se* são provavelmente raros, por se tratar de um polipeptídeo metabolizado a aminoácidos pelas proteases teciduais e séricas, reduzindo seu potencial hepatotóxico direto (LIVERTOX, 2017).

Assim, a hipótese deste trabalho é que a liraglutida tem efeito benéfico sobre o fígado também diante de intoxicação aguda. Para testar esta hipótese, o CCl₄ foi usado como modelo de DILI em dois protocolos, para avaliar o efeito hepatoprotetor (pré-tratamento) e terapêutico (tratamento tardio) da liraglutida. Os possíveis mecanismos de ação da liraglutida foram investigados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito hepatoprotetor e terapêutico do hipoglicemiante liraglutida frente ao modelo de estudo de toxicidade hepática aguda induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a extensão dos danos hepáticos na presença do CCl₄, em grupos tratados ou não tratados com a liraglutida, através de marcadores plasmáticos da função hepática, como determinação de ALT, AST e ALP;
- b) Avaliar os danos histológicos causados pelo modelo de hepatotoxicidade do CCl₄, e o efeito hepático do tratamento com a liraglutida;
- c) Investigar os efeitos da liraglutida sobre o estresse oxidativo induzido pelo modelo através da mensuração de GSH, GST, SOD, CAT e LPO;
- d) Investigar a modulação de biomarcadores do metabolismo hepático como um possível mecanismo de ação da liraglutida, avaliando conteúdo lipídico, glicogênio, lactato e piruvato no tecido hepático;
- e) Acompanhar o peso ponderal e a glicemia dos animais durante o período de experimentação.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

The GLP-1 analogue liraglutide attenuates acute liver injury in mice

Letícia Milani^a, Claudia Martins Galindo^a, Natalia Mulinari Turin-Oliveira^a, Claudia Rita Corso^a, Eliana Rezende Adami^a, Maria Carolina Stipp^a, Olair Carlos Beltrame^b,
Alexandra Acco^a

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Corresponding author:

Alexandra Acco, Federal University of Paraná (UFPR), Biological Science Sector, Department of Pharmacology, Centro Politécnico, Cx. P. 19031, Curitiba – Paraná – Brazil, Zip Code 81531-980

Phone: +55 (41) 3361-1742; Fax: +55 (41) 3266-2042

E-mail: aleacco@ufpr.br

Running title: Liraglutide reduces acute liver injury

ABSTRACT

Aim: Introduction and Aim: Acute liver disease is a current health problem with few effective treatments. The present study investigated the hepatoprotective and curative potential of the glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity. **Methods:** Male Swiss mice were subjected to two protocols. The first protocol (Pretreatment) consisted of intraperitoneal (i.p.) treatment with liraglutide (0.057 and 0.118 mg/kg) or vehicle (distilled water) once daily for 7 days. On days 6 and 7, the animals were challenged with 2% CCl₄ (5 ml/kg, i.p.). The second protocol (Late treatment) began with an injection of 5% CCl₄ (5 ml/kg, i.p.) and subsequent treatment with liraglutide (0.057 mg/kg) or vehicle (distilled water) for 1 day. In both protocols, 24 h after the last administration, blood and bile were collected from anesthetized animals, followed by euthanasia and liver collection. Plasma and bile underwent biochemical analyses, and histopathological, oxidative stress, and metabolic parameters were evaluated in the liver. **Results:** Both liraglutide treatment protocols attenuated hepatotoxicity that was induced by CCl₄, decreasing plasma levels of hepatic enzymes, stimulating the hepatic antioxidant system, and decreasing centrilobular necrosis, hepatic glycogen, and lipid accumulation. CCl₄ tended to reduce bile lipid excretion, but liraglutide did not influence this parameter. **Conclusions:** The present results demonstrated the hepatoprotective and therapeutic effects of liraglutide, which may be attributable to a decrease in liver oxidative stress and the preservation of metabolism. Liraglutide may have potential as a complementary therapy for acute liver injury.

Keywords: Acute liver injury; CCl₄; hepatoprotection; liraglutide; oxidative stress; liver.

3.1 Introduction

Intense or chronic exposure to pollutants, alcohol, and drugs can disrupt normal liver function¹. Drug-induced liver injury can result in acute liver failure and is characterized as one of the most serious adverse effects of drugs. The incidence of drug-induced liver injury has steadily increased because of the substantial number of medications on the market and their abusive use². Hepatic damage that is promoted by drugs is directly associated with oxidative stress that results from excess free radicals that are generated through hepatic xenobiotic pathways³.

Carbon tetrachloride (CCl₄) is a toxic agent that is currently used as a well-established model of experimental hepatotoxicity based on its ability to promote centrilobular necrosis with fat deposition⁴. These alterations that are induced by CCl₄ are attributable to trichloromethyl radicals ($\bullet\text{CCl}_3$), reactive metabolites that are formed by hepatic metabolism via cytochrome P450 enzymes, mainly CYP2E1. Trichloromethyl radicals react rapidly with oxygen molecules, forming trichloromethyl peroxy radicals ($\bullet\text{OOCCl}_3$). Both are able to covalently bind to cellular structures, causing damage through oxidative stress and lipid peroxidation and consequently resulting in cellular death⁵.

Therapeutic strategies for the treatment of acute liver disease are still limited. Removal of the causal agent and the use of antioxidant substances are the main treatment modalities. Several compounds have been studied for clinical application in these cases. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogues comprise a recent class of antidiabetic drugs that mimic the effects of incretins and have been reported to have beneficial effects in some organs. GLP-1 analogues have been shown to not cause changes in blood glucose when administered in non-diabetic patients, thus supporting their use for the treatment of other disorders⁶. Liraglutide is a long-acting synthetic

analogue of GLP-1 with 97% homology to human GLP-1. Liraglutide was shown to prevent oxidative stress and improve hepatic cell apoptosis in models of chronic liver disease⁷ and hepatic glucolipotoxicity⁸, respectively. The cytoprotective effects of liraglutide have been related to the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2), a transcription factor that regulates the expression of redox homeostasis genes and is involved in the oxidative stress response and cellular defense mechanisms⁹. However, the involvement of GLP-1 analogues in acute liver disease is still unclear, and the therapeutic potential of liraglutide in such cases is still unclear. Most studies of liraglutide have only evaluated its preventive potential in chronic diseases. Thus, the present study investigated the protective and therapeutic effects of liraglutide on CCl₄-induced hepatotoxicity in mice and the underlying mechanisms and pathways that are involved in these actions.

3.2 Material and methods

3.2.1 Reagents

Liraglutide (Victoza®, Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) was commercially available. CCl₄ was purchased from Reagen (Rio de Janeiro, Brazil). DTNB (5,5'-dithiobis), reduced glutathione, glutathione reductase, amyloglucosidase, NAD⁺ and NADH were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Trichloroacetic acid, CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), pyrogallol and DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Bradford Bio-Rad™ Protein Assay was obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, EUA). Glucose Liquiform was obtained from Labtest (Lagoa Santa, Brazil). Hepatic enzymatic kits were purchase from Kovalent (São Gonçalo, Brazil).

3.2.2 *Hepatotoxicity induction and experimental design*

Adults male Swiss mice (*Mus musculus*), weighing 25 ± 5 g, were obtained from the vivarium of the Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil). The Ethics Committee for Animal Care of SCB/UFPR approved all of the experimental protocols (approval n°. 1101). The animals were maintained under controlled room temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) on a 12 h/12 h light/dark cycle with free access to food and water. Two different treatment protocols were employed to evaluate the protective and therapeutic potential of liraglutide against acute liver injury.

3.2.3 *Pretreatment with liraglutide*

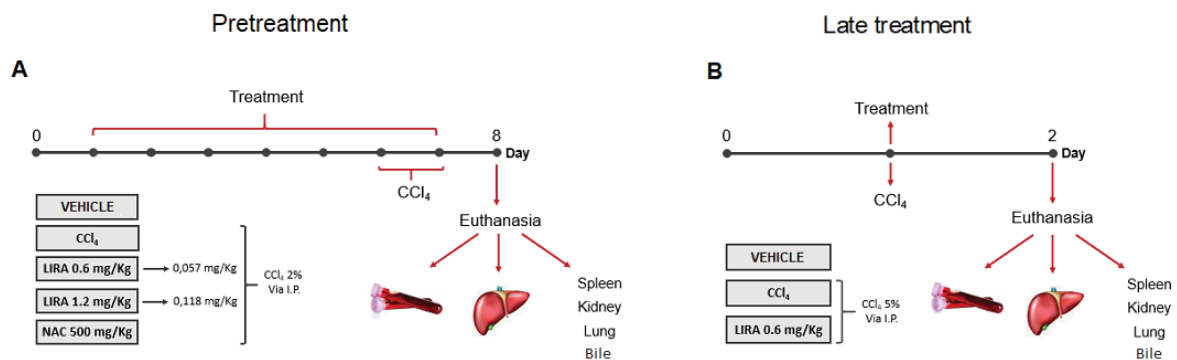
The animals were randomly divided into five groups ($n = 7-12/\text{group}$) and treated with the compounds or water once daily for 7 days. On days 6 and 7 of treatment, the animals were challenged with CCl_4 (2% in canola oil, 5 ml/kg, i.p.). The treated groups received liraglutide (0.057 and 0.118 mg/kg, i.p.) and injections of CCl_4 . Both doses of liraglutide were calculated by interspecific allometry¹⁰ based on doses that are indicated for humans (0.6 and 1.2 mg). The 0.057 and 0.118 mg/kg doses that were used in the present study are hereinafter referred to as the low dose (LD) and high dose (HD), respectively. The naive group received water and injections of canola oil. The vehicle group received water and was injected with CCl_4 . One additional positive control group was orally treated with N-acetylcysteine (500 mg/kg) and injected with CCl_4 . Glycemia was monitored during the experiment using a glycosometer (AccuCheck®). Twenty-four hours after the last injection of CCl_4 , the mice were fasted for 12 h and then intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. Blood samples were collected from the abdominal cava vein with heparinized syringes, and bile was collected from the gall bladder using ultra-fine insulin needles.

Bile was stored at -20°C until analysis. After euthanasia, liver samples were immediately collected and stored at -80°C for further analysis. A portion of the liver was fixed in Alfac solution for histological analysis. The spleen, kidneys, and lungs were removed and weighed to evaluate possible macroscopic alterations. The experimental protocol is shown in Fig. 1A.

3.2.4 Late treatment with liraglutide

The animals were divided into two groups ($n = 7-12/\text{group}$) and challenged with a single dose of CCl_4 (5% in canola oil, 5 ml/kg, i.p.). The treatment group received liraglutide (0.057 mg/kg, i.p.) or vehicle (distilled water) 1 h after the CCl_4 challenge. In this protocol, liraglutide was administered only at the LD. Glycemia was monitored during the experiment using a glycosometer (AccuCheck[®]), which did not show expressive variations along the treatment period. After 24 h of treatment, the mice were intraperitoneally anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine, and blood, bile, and liver samples were collected as described in the first experimental protocol. The spleen, kidneys, and lungs were also removed and weighed. The experimental protocol is shown in Fig. 1B.

FIGURE 1: EXPERIMENTAL DESIGN IN MICE THAT WERE CHALLENGED WITH CCl_4 AND RECEIVED LIRAGLUTIDE PRETREATMENT (A) OR LATE TREATMENT (B) ACCORDING TO THE PROTOCOLS THAT ARE DESCRIBED IN SECTIONS 2.2.1 AND 2.2.2.



SOURCE: THE AUTHOR.

3.2.5 *Biochemical analysis of blood and bile*

Plasma was obtained by centrifuging the blood samples at $3,400 \times g$ for 5 min. Plasma was used to measure biochemical markers of liver function, including the activity of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP), using commercial kits in an automatic analyzer (Mindray BS-200, Shenzhen, China). Liraglutide is a hypoglycemic drug; therefore, plasma glucose levels were also measured during treatment. The bile was diluted in 0.9% saline solution for volume adjustment (100 μ l) and subsequently analyzed for total cholesterol in an automatic analyzer (Mindray BS-200, Shenzhen, China).

3.2.6 *Hepatic histopathology*

Hepatic tissue was rapidly harvested from the animals and fixed in Alfac (90% ethyl alcohol, 40% formaldehyde, and glacial acetic acid) for 24 h. After being embedded in paraffin, 5 μ m sections were prepared, deparaffinized, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The analysis was blindly performed using an optical microscope. Necrosis, inflammation, and cellular ballooning were evaluated. Lesions were scored according to the adapted Knodel system: 0 (no lesions), 1 (mild lesions with necrosis in $\leq 1/3$ of tissue), 2 (moderate lesions with necrosis in $1/3$ to $2/3$ of tissue), and 3 (marked lesions with necrosis in $\geq 2/3$ of tissue)¹¹.

3.2.7 *In vitro and in vivo determination of liraglutide antioxidant activity*

3.2.7.1 *Determination of hepatic oxidative stress parameters*

Oxidative stress parameters were analyzed using hepatic tissue that was homogenized in potassium phosphate buffer. The pure homogenate was used to

determine the levels of reduced glutathione (GSH)¹² and lipoperoxidation (LPO)¹³. The liver homogenate was then centrifuged at $9,000 \times g$ for 20 min at 4°C, and the supernatant was used to measure the activity of hepatic glutathione S-transferase (GST)¹⁴, superoxide dismutase (SOD)¹⁵, and catalase (CAT)¹⁶. With the exception of GSH, the results are expressed as the amount of protein in the liver samples, determined using the Bradford method (1976)¹⁷. All of the techniques were performed in 96-well microplates and read in a spectrophotometer (Synergy HT – Biotek, Winooski, VT, USA).

3.2.7.2 Determination of *in vitro* free radical scavenging activity of liraglutide

The antioxidant potential of liraglutide *in vitro* was analyzed using the method of Chen et al. (2004)¹⁸, with modifications. The technique consists of measuring the reactivity of liraglutide at different concentrations (1, 3, 10, 30, 100, 300, and 1000 µg/ml) with the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Ascorbic acid solution (50 µg/ml) was used as the positive control, and distilled water was used as the negative control. Absorbance was read in a microplate spectrophotometer before and 5 min after the addition of DDPH.

3.2.8 Hepatic glycogen determination

Hepatic glycogen levels were measured according to Kepler and Decker (1974)¹⁹, with modifications. Briefly, frozen hepatic samples were homogenized in 0.6 N perchloric acid, and basal glucose levels were determined using a commercial kit (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Afterward, the homogenates underwent glycogen hydrolysis using 0.2 M amyloglucosidase and maintained in a 40°C water bath for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 0.6 N perchloric acid and centrifuged

at $7,600 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatants were used to determine the final glucose levels. Both assays were read at 505 nm. Glycogen levels were calculated as the difference between the basal and final glucose levels. The results are expressed as $\mu\text{mol/g}$ of tissue.

3.2.9 *Lactate and pyruvate analysis*

Frozen hepatic samples were homogenized in 0.6 N perchloric acid as described above and centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C for 10 min. The supernatant was used to measure hepatic lactate and pyruvate levels^{20,21}. Both metabolites were determined using standard enzymatic techniques based on NAD^+ reduction and NADH oxidation, respectively. The microplates were read at 340 nm. The results are expressed as $\mu\text{mol/g}$ of tissue.

3.2.10 *Hepatic lipid contents analysis*

Tissue gravimetry was performed to determine the influence of liraglutide on total liver lipid content according to Folch et al. (1957)²², with modifications. Briefly, the liver samples were lyophilized and then mixed with hexane. The mixtures were heated to 80°C for 2 h, and the supernatant was transferred to a second glass tube for natural evaporation. This procedure was repeated three times. The lipid content was weighed and suspended in 99.50% chloroform and 99.50% isopropanol for the determination of hepatic total cholesterol and triglycerides using commercial kits with an automatic analyzer. The results are expressed as mg/g of tissue.

3.2.11 Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The results are presented as the mean \pm SEM. Group differences were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post hoc* test or unpaired two-tailed Student's *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

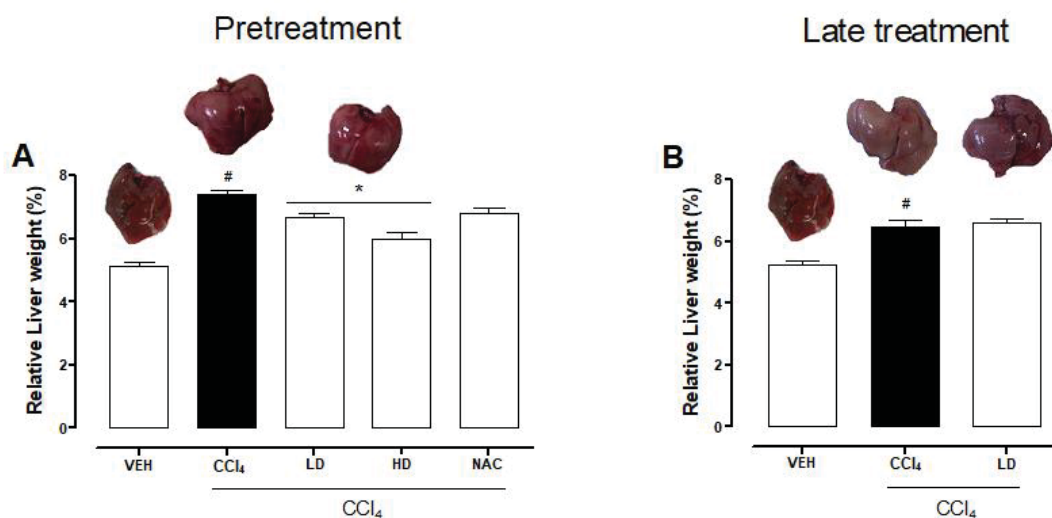
3.3 Results

3.3.1 Liraglutide attenuated hepatic alterations

Hepatic damage caused by CCl₄ was measured based on relative liver weight, and plasma hepatic biomarkers were quantitatively analyzed. All groups that were challenged with CCl₄ presented an increase in absolute (Supplementary Table. S1) and relative liver weight compared with the vehicle group. Pretreatment with liraglutide at the HD (0.118 mg/kg) partially prevented the increase in relative liver weight (Fig. 2A), whereas this effect was not observed with the late treatment protocol (Fig. 2B). The CCl₄ model did not change significantly the animals body weight, promoting a modest reduction in all groups after toxin application. Liraglutide present similar results and did not promote significantly alterations on body weight (Supplementary Figure S1). The weight of the spleen, kidneys, and lungs did not differ between groups (Supplementary Table S2). Increases in the activity of plasma hepatic enzymes (ALT, AST, and ALP) were detected in the groups that received CCl₄, confirming tissue damage. The groups that were treated with liraglutide with both protocols exhibited significant reductions of ALT, AST, and ALP activity. Liraglutide pretreatment decreased plasma levels of ALT by approximately 39% (Fig. 3A). Late treatment with liraglutide decreased plasma levels of ALT by 56% (Fig. 3D). Similarly, plasma AST

levels decreased by ~41% and 59% with the pretreatment and late treatment protocols, respectively (Fig. 3B, E). The levels of ALP were slightly decreased by both treatment protocols, but these decreases were not statistically significant (Fig. 3C, G). The two doses of liraglutide presented similar effectiveness. Therefore, the LD (0.057 mg/kg) was used for the late treatment protocol and subsequent analyses. These results with liraglutide treatment were better than with N-acetylcysteine treatment (i.e., the positive control), which reduced plasma transaminases by ~43%.

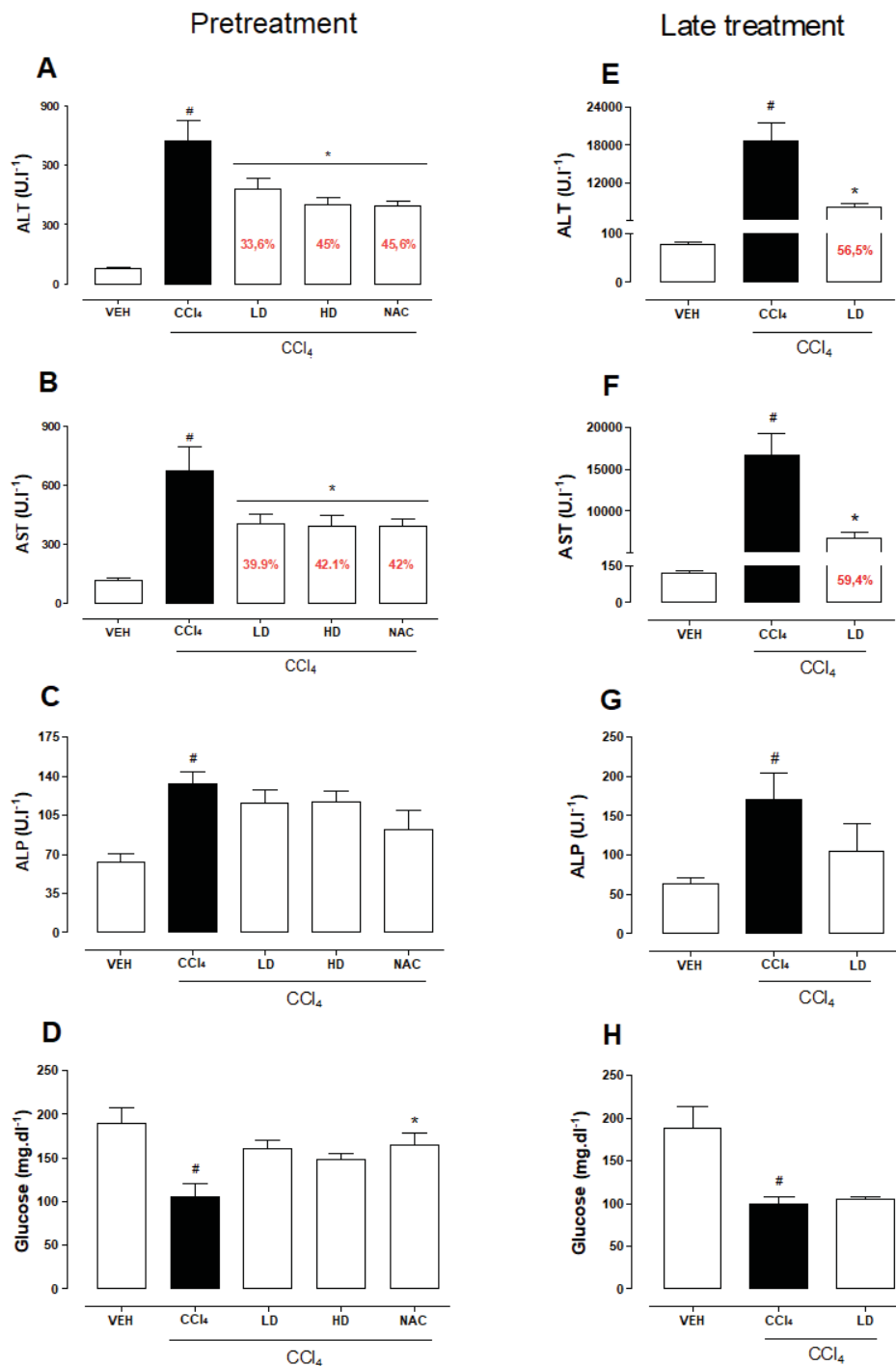
FIGURE 2: RELATIVE WEIGHT OF THE LIVER IN MICE THAT WERE SUBJECTED TO CCL₄-INDUCED LIVER INJURY, EXPRESSED AS A PERCENTAGE OF BODY WEIGHT. GROUPS: VEH (DISTILLED WATER + CANOLA OIL), CCL₄ (DISTILLED WATER + CCL₄), LD (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), HD (HIGH DOSE OF 0.118 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), NAC (500 MG/KG N-ACETYLCYSTEINE + CCL₄). THE DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. THE ANALYSES WERE PERFORMED USING ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S POST HOC TEST. #*P* < 0.05, COMPARED WITH VEHICLE GROUP; **P* < 0.05, COMPARED WITH CCL₄ GROUP.



SOURCE: THE AUTHOR.

CCL₄ administration reduced blood glucose levels by 44% and 47% with the pretreatment and late treatment protocols, respectively. The groups that received pretreatment with liraglutide but not late treatment exhibited a tendency to maintain normal blood glucose levels, similar to N-acetylcysteine treatment (Fig. 3C, F). No group differences in hemograms were observed (Supplementary Table S3).

FIGURE 3: BIOCHEMICAL PARAMETERS IN MICE THAT WERE SUBJECTED TO CCL₄-INDUCED ACUTE LIVER INJURY AND TREATED WITH WATER, LIRAGLUTIDE, OR N-ACETYLCYSTEINE. (A) ALT WITH PRETREATMENT PROTOCOL. (B) AST WITH PRETREATMENT PROTOCOL. (C) ALP WITH PRETREATMENT PROTOCOL. (D) GLUCOSE WITH PRETREATMENT PROTOCOL. (E) ALT WITH LATE TREATMENT PROTOCOL. (F) AST WITH LATE TREATMENT PROTOCOL. (G) ALP WITH LATE TREATMENT PROTOCOL. (H) GLUCOSE WITH LATE TREATMENT PROTOCOL. GROUPS: VEH (DISTILLED WATER + CANOLA OIL), CCL₄ (DISTILLED WATER + CCL₄), LD (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), HD (HIGH DOSE OF 0.118 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), NAC (500 MG/KG N-ACETYLCYSTEINE + CCL₄). THE DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. THE ANALYSES WERE PERFORMED USING ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S *POST HOC* TEST. #*P* < 0.05, COMPARED WITH VEHICLE GROUP; **P* < 0.05, COMPARED WITH CCL₄ GROUP.



SOURCE: THE AUTHOR.

3.3.2 Hepatic Liraglutide attenuated hepatic histopathological lesions

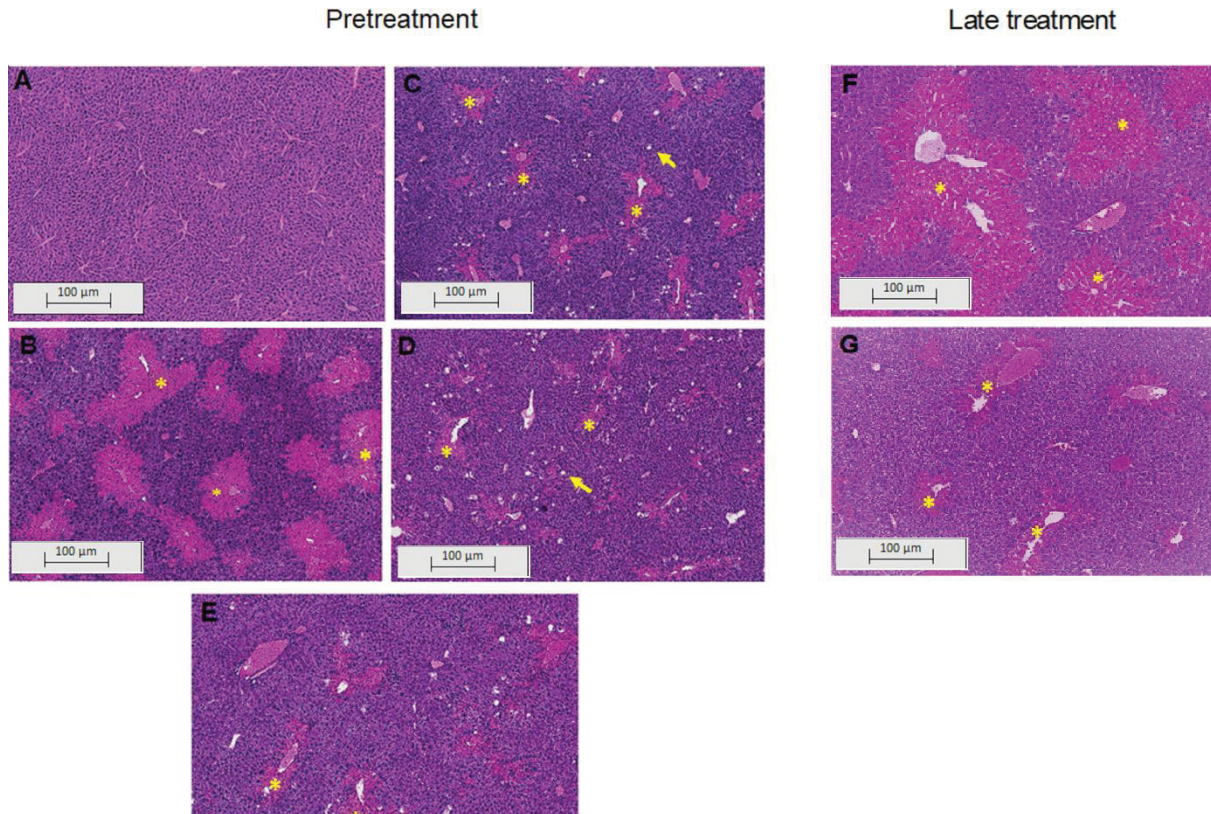
The analysis of hepatic tissue showed that CCl₄ induced necrosis to a significant degree around the central vein (Fig. 4B, F). A mild degree of hepatocyte ballooning was detected at the interface between healthy and injured tissue. Mild lymphoplasmacytic infiltrates were also observed. Animals that were treated with liraglutide with both protocols exhibited a lower degree of necrosis that was classified as mild (Fig. 4C, D, G). The degree of hepatocyte ballooning and lymphoplasmacytic infiltrates were moderate in all of the groups that received CCl₄ (Table 1).

Table 1. Histopathological parameters observed in CCl₄-induced liver injury.

Parameters	Pretreatment					Late treatment		
	VEH	CCl ₄	LD	HD	NAC	VEH	CCl ₄	LD
Centrilobular necrosis	0	2	1	1	1	0	2	1
Inflammatory cells infiltrate	0	1	0	1	1	0	1	1
Ballooning	0	1	1	1	1	0	1	1

Groups: VEH (distillate water + canola oil); CCl₄ (distillate water + CCl₄); LD (liraglutide 0.057 mg/kg + CCl₄); HD (liraglutide 0.118 mg/kg + CCl₄) and NAC (500 mg/kg + CCl₄). Grade of parameters was adapted from Knodel et al.¹²: Centrilobular necrosis (0 – none; 1 – ≤1/3; 2 – 1/3 to 2/3; 3 – ≥ 2/3), Inflammatory infiltrate (0 – none; 1 – mild; 2 – moderate; 3 – marked) and Ballooning (0 – none; 1 – mild; 2 – moderate; 3 – marked).

FIGURE 4: HISTOLOGICAL IMAGES OF LIVER SECTIONS (HE STAINING) FROM REPRESENTATIVE MICE FROM THE FOLLOWING GROUPS: (A) VEH (DISTILLED WATER + CANOLA OIL), (B) CCL₄ PRETREATMENT (DISTILLED WATER + CCL₄), (C) LD PRETREATMENT (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), (D) HD PRETREATMENT (HIGH DOSE OF 0.118 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄), (E) NAC PRETREATMENT (500 MG/KG N-ACETYL-CYSTEINE + CCL₄), (F) CCL₄ LATE TREATMENT (DISTILLED WATER + CCL₄), (G) LD LATE TREATMENT (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCL₄). *, CENTRIOLOBULAR NECROSIS; →, BALLOONING HEPATOCYTES. SCALE BAR = 100 μM.



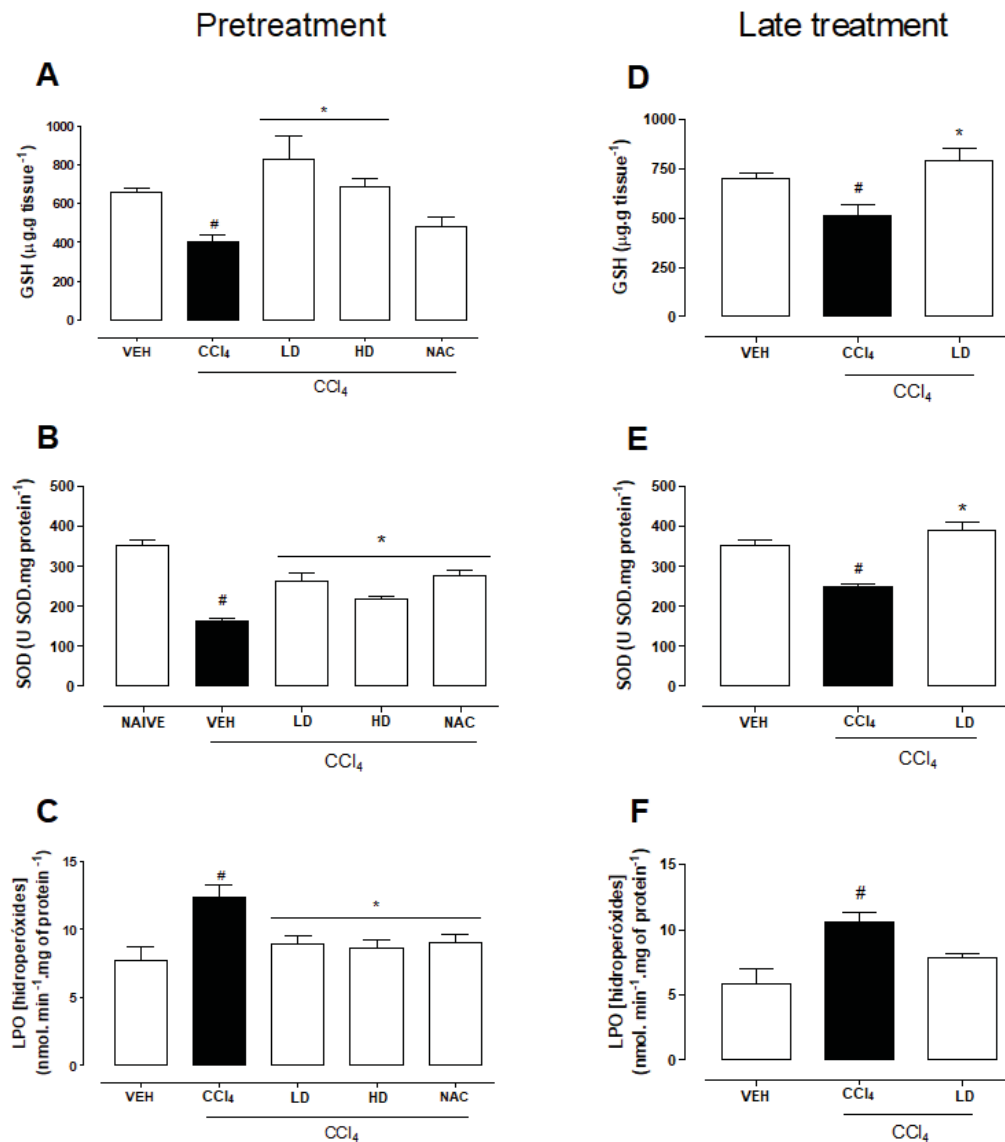
SOURCE: THE AUTHOR.

3.3.3 *Liraglutide improves liver antioxidant status in vivo*

Hepatic redox homeostasis was altered by CCl₄, reflected by reductions of GSH levels and SOD activity (Fig. 5). Liraglutide treatment before and after CCl₄-induced hepatic injury preserved GSH levels (Fig. 5A, D) and SOD activity (Fig. 5B, E) at levels that were similar to normal (vehicle-treated) and N-acetylcysteine-treated animals. No changes in GST or CAT activity were observed in injured liver, except for GST activity in the post-treatment protocol, which presented a significant reduction with CCl₄ intoxication (Supplementary Figure 2). After CCl₄ administration, LPO levels increased by 60% and 81% with the liraglutide pretreatment and late treatment protocols,

respectively. Pretreatment with liraglutide decreased LPO levels by 28% (Fig. 5C), similar to N-acetylcysteine treatment. Late treatment with liraglutide partially reduced LPO levels compared with the CCl₄ group (Fig. 5F).

FIGURE 5: EFFECTS OF LIRAGLUTIDE ON HEPATIC OXIDATIVE STRESS IN CCl₄-INDUCED HEPATIC INJURY. (A) GLUTATHIONE LEVELS WITH PRETREATMENT. (B) SUPEROXIDE DISMUTASE WITH PRETREATMENT. (C) LIPOPEROXIDATION LEVELS WITH PRETREATMENT. (D) GLUTATHIONE LEVELS WITH LATE TREATMENT. (E) SUPEROXIDE DISMUTASE WITH LATE TREATMENT. (F) LIPOPEROXIDATION LEVELS WITH LATE TREATMENT. GROUPS: VEH (DISTILLED WATER + CANOLA OIL), CCl₄ (DISTILLED WATER + CCl₄), LD (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCl₄), HD (HIGH DOSE OF 0.118 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCl₄), NAC (500 MG/KG N-ACETYLCYSTEINE + CCl₄). THE DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. THE ANALYSES WERE PERFORMED USING ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S POST HOC TEST. #*P* < 0.05, COMPARED WITH VEHICLE GROUP; **P* < 0.05, COMPARED WITH CCl₄ GROUP.

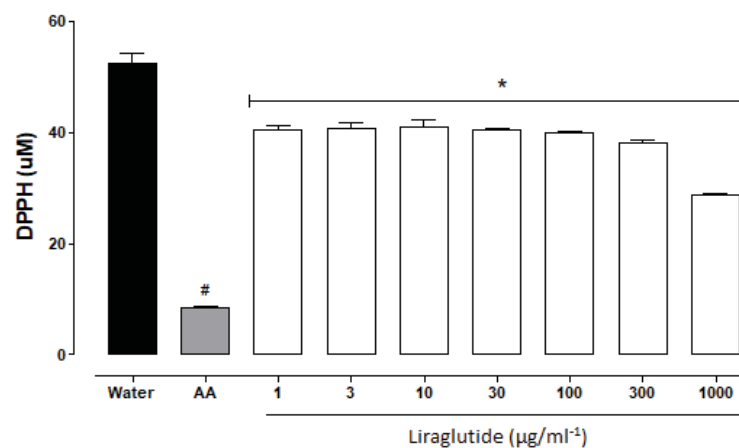


SOURCE: THE AUTHOR.

3.3.4 Liraglutide exerted moderate radical scavenging activity in vitro

All of the liraglutide concentrations had similar and moderate free radical scavenging activity (Fig. 6), although the degree of the antioxidant activity of liraglutide was not as intense as ascorbic acid. The highest liraglutide concentration (1000 µg/ml) reduced DPPH radicals by 43%; the other concentrations reduced DPPH radicals by ~23%.

FIGURE 6: FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF LIRAGLUTIDE IN THE DPPH ASSAY. DISTILLED WATER AND ASCORBIC ACID (AA) WERE USED AS NEGATIVE AND POSITIVE CONTROLS, RESPECTIVELY. THE DATA ARE EXPRESSED AS THE MEAN ± SEM OF A TRIPLICATE ASSAY. THE ANALYSES WERE PERFORMED USING ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S TEST. # $P < 0.05$, COMPARED WITH NEGATIVE CONTROL; * $P < 0.05$, COMPARED WITH POSITIVE GROUP.



SOURCE: THE AUTHOR.

3.3.5 Hepatic metabolites were partially normalized by liraglutide

The groups that were challenged with CCl₄ exhibited a significant reduction of glycogen levels. Pretreatment with liraglutide maintained hepatic glycogen at levels that were similar to normal control animals (Table 2). However, no effect was observed with the liraglutide late treatment protocol. CCl₄-induced hepatic injury only caused significant increases in hepatic lactate and pyruvate concentrations with the late treatment protocol compared with vehicle-treated animals. Pretreatment with liraglutide increased the levels of these metabolites even further, especially at the HD, in which

lactate increased by 36% and pyruvate increased by 77% compared to CCl₄ group. The opposite was observed with the late treatment protocol, in which a 37% decrease in pyruvate levels was observed in relation to CCl₄ group (Table 2).

Table 2. Hepatic metabolites evaluation after CCl₄-induced liver injury.

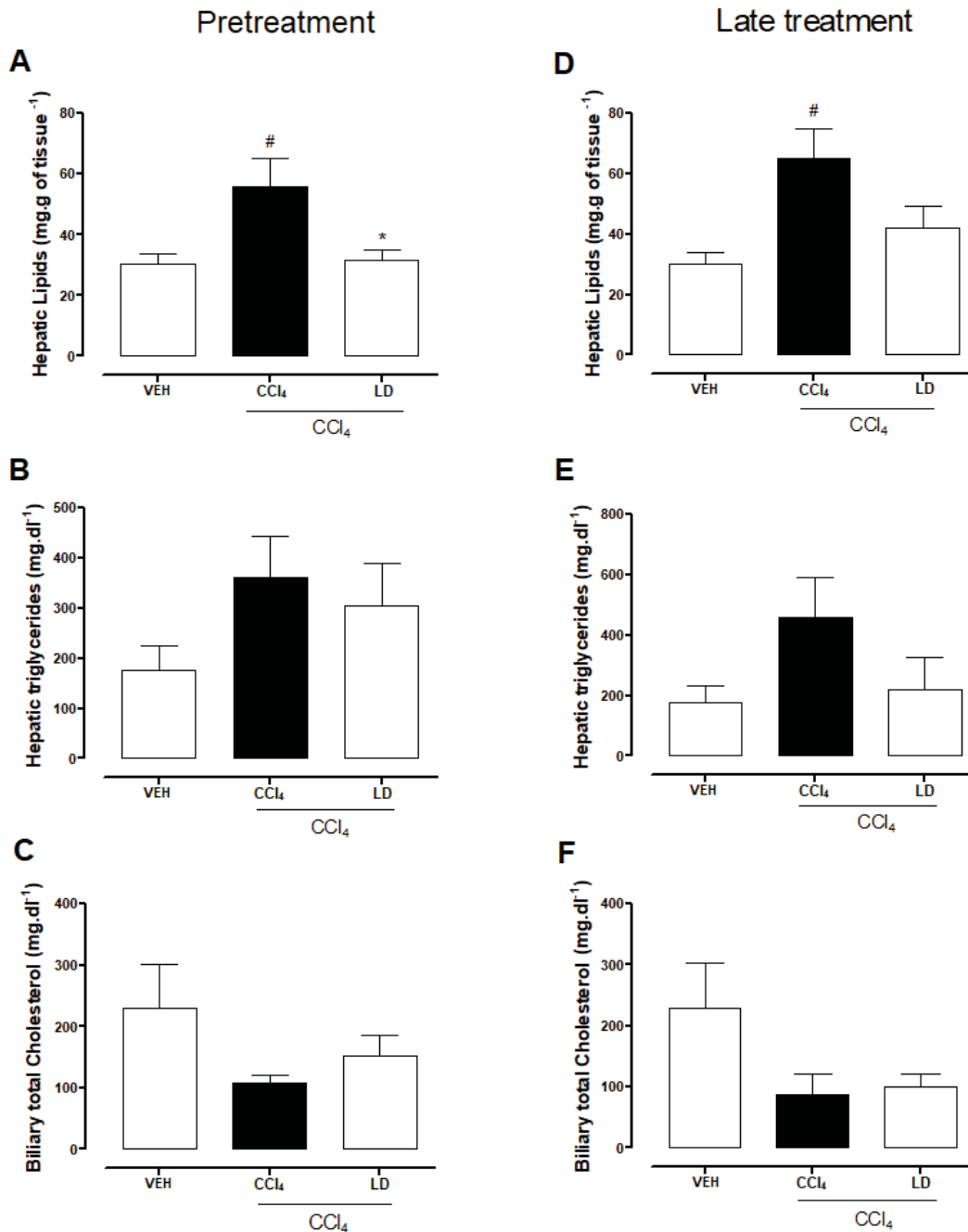
	Pretreatment				Late treatment		
	VEH	CCl ₄	LD	HD	VEH	CCl ₄	LD
Glycogen (μmol.g ⁻¹)	18.8 ± 0.93	15.1 ± 3.94 [#]	19.2 ± 1.01 [*]	19.4 ± 1.54 [*]	18.8 ± 0.93	15.3 ± 3.52 [#]	17.9 ± 2.27
Lactate (μmol.g ⁻¹)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.02 [*]	0.21 ± 0.02 [*]	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.01 [#]	0.18 ± 0.02
Pyruvate (μmol.g ⁻¹)	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.15 ± 0.02 [*]	0.06 ± 0.01	0.17 ± 0.02 [#]	0.11 ± 0.02 [*]

Groups: VEH (distillate water + canola oil); CCl₄ (distillate water + CCl₄); LD (liraglutide 0.057 mg/kg + CCl₄); HD (liraglutide 0.118 mg/kg + CCl₄) and NAC (500 mg/kg + CCl₄). Data were expressed the mean ± SEM and the analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. ^{#,*} represent significant differences between groups and vehicle or CCl₄, respectively, at *p* < 0.05. Glycogen, lactate and pyruvate were expressed in μmol.g of tissue⁻¹.

3.3.6 Liraglutide reduced hepatic fat accumulation

The gravimetric analysis showed the significant accumulation of hepatic lipids in the CCl₄ group compared with the vehicle group with both treatment protocols (Fig. 7A, D). Pretreatment with liraglutide at the LD reduced lipid accumulation (Fig. 7A). Late treatment with liraglutide reduced fat accumulation by 36%, but this reduction was not significant compared with the CCl₄ group (Fig. 7D). Both hepatic triglycerides (Fig. 7B, E) and total cholesterol (data not shown) increased in the CCl₄ group. Liraglutide treatment reduced the concentrations of these lipids, but the reductions were not statistically significant. A tendency toward a reduction of cholesterol excretion in bile was observed in all of the groups that received CCl₄, but no group differences were observed (Fig. 7C, D).

FIGURE 7: EFFECTS OF LIRAGLUTIDE ON HEPATIC AND BILIARY LIPIDS. (A) HEPATIC GRAVIMETRIC ANALYSIS WITH PRETREATMENT. (B) HEPATIC TRIGLYCERIDE ANALYSIS WITH PRETREATMENT. (C) BILIARY TOTAL CHOLESTEROL ANALYSIS WITH PRETREATMENT. (D) HEPATIC GRAVIMETRIC ANALYSIS WITH LATE TREATMENT. (E) HEPATIC TRIGLYCERIDE ANALYSIS WITH LATE TREATMENT. (F) BILIARY TOTAL CHOLESTEROL ANALYSIS WITH LATE TREATMENT. GROUPS: VEH (DISTILLED WATER + CANOLA OIL), CCl₄ (DISTILLED WATER + CCl₄), LD (LOW DOSE OF 0.057 MG/KG LIRAGLUTIDE + CCl₄). THE DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. THE ANALYSES WERE PERFORMED USING ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S TEST. #*P* < 0.05, COMPARED WITH VEHICLE GROUP; **P* < 0.05, COMPARED WITH CCl₄ GROUP.



SOURCE: THE AUTHOR.

3.4 Discussion

The present results showed that liraglutide exerted protective and therapeutic actions against acute hepatotoxicity. Liraglutide decreased plasma ALT, AST, and ALP levels and liver necrosis when administered both before and after CCl₄-induced liver injury. These results indicate a hepatic action of liraglutide and corroborate previously published studies that used models of nonalcoholic steatohepatitis and ischemia-reperfusion injury^{7,23,24}. A previous study showed that exenatide, the GLP-1 analogue precursor, exerted beneficial actions against hepatic oxidative stress and steatosis in metabolic disease²⁵. Thus, the present study investigated the possible mechanisms of the protective and therapeutic effects of liraglutide against CCl₄-induced hepatic injury.

Trichloromethyl radicals that are overproduced by the hepatic metabolism of CCl₄ were shown to negatively influence cellular antioxidant balance, promoting lipid peroxidation, causing GSH depletion, and reducing antioxidant enzyme activity^{26,27}. GLP-1 analogues, including liraglutide, have been reported to be possible synthetic therapeutic alternatives to reduce oxidative stress and consequently attenuate cell death in gastric²⁸, neuronal²⁹, renal³⁰, and hepatic cells in chronic disorders^{7,8,23}. The present study found that liraglutide decreased LPO levels and increased GSH levels and SOD activity in a mouse model of acute hepatic injury. GSH is important for protecting cells against toxicity that is caused by peroxides and other free radicals³¹. Superoxide dismutase is an antioxidant enzyme that interacts with superoxide radicals (O₂^{•-}) and promotes their neutralization through H₂O₂ formation, which is subsequently eliminated by other enzymes³². The hepatic effects of liraglutide in the present study are similar to hepatoprotective effects of N-acetylcysteine, which was shown to maintain redox balance by modulating GSH³³. The antioxidant potential of liraglutide was also demonstrated *in vitro* (Fig. 6). Overall, these data suggest that liraglutide

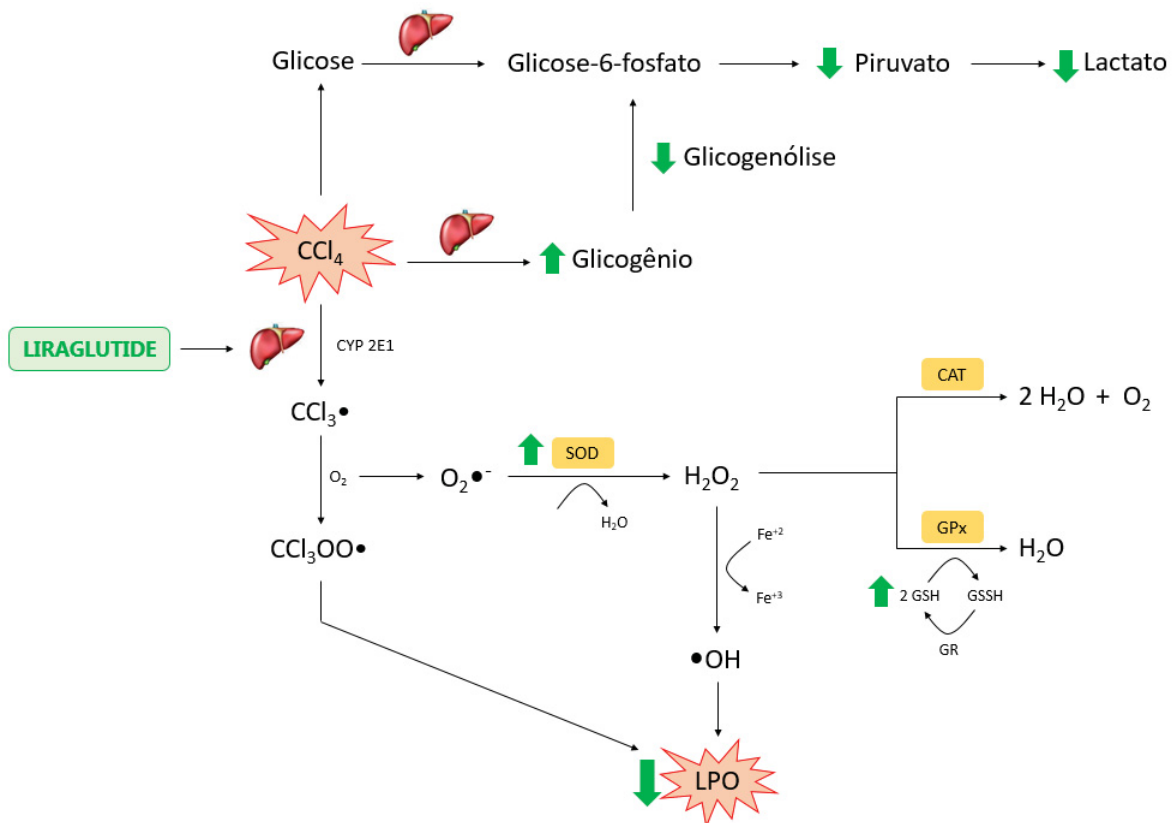
modulates the hepatic redox system through two mechanisms: (1) preserving the activity of hepatic antioxidant components and (2) neutralizing free radicals that are generated during the disease process.

The liver is an integral organ for metabolism. Several metabolites were analyzed in the present study to evaluate the effects of liraglutide. Toxicity that was induced by CCl₄ decreased plasma glucose levels. Liraglutide treatment with both protocols maintained glucose levels similar to vehicle-treated animals (Fig. 3C, F). The decrease in plasma glucose levels could indicate a greater liver energy demand³⁴. A significant decrease in hepatic glycogen levels also occurred after CCl₄ exposure (Table 2), suggesting intense rates of glycolysis and glycogenolysis that compensate for blood hypoglycemia, which has been associated with hepatic failure^{35,36}. Higher levels of lactate and pyruvate in liver homogenates that resulted from glycolysis were also observed after CCl₄ administration (Table 2). Similar hepatic metabolism results were reported in a previous study that evaluated acetaminophen-induced lesion³⁵. Liraglutide, despite being a hypoglycemic drug, exerted a protective effect and maintained blood glucose levels similar to control animals. This finding is related to its glucose state-dependent action, in which it exerts effects only when glycemia levels are high. This supports the possibility of using liraglutide for other therapeutic purposes without affecting glycemia³⁷. However, this normoglycemic effect was not observed when liraglutide was administered after hepatic injury. Animals that were pretreated with liraglutide maintained hepatic glycogen at levels that were similar to vehicle-treated animals. Pretreatment with liraglutide preserved hepatic glycometabolism, which was also reported in a previous study in diabetic mice³⁸. Valverde et al. (1994) performed an *in vitro* assay and found that incretins, including GLP-1, increased glycogen synthesis³⁹.

Pretreatment with liraglutide also suppressed hepatic lipid accumulation that was caused by CCl₄^{40,41}. Mice with nonalcoholic fatty liver disease that were treated with liraglutide exhibited an improvement in hepatic lipid congestion⁴², as well as the benefits of liraglutide in human patients with type 2 diabetes who developed steatosis⁴³, thus supporting our findings. However, these interesting gravimetric results were not reproduced in the differentiated lipid analysis in liver tissue, in which only discrete changes in hepatic triglycerides and total cholesterol were observed. Liraglutide administration has been previously reported to be a therapeutic alternative to reverse high triglyceride levels in nonalcoholic fatty liver disease^{44,45}. Liraglutide-treated animals in the present study exhibited lower levels of triglycerides, but this decrease was not statistically significant. Other lipids that are present in the liver are likely altered by CCl₄ and liraglutide. Further studies of various lipids should be performed to clarify this issue. Interestingly, liraglutide does not appear to interfere with the bile excretion of cholesterol. Liraglutide may reduce steatosis by improving lipolysis or attenuating lipogenesis rather than by increasing lipid excretion from the liver to bile.

In conclusion, the present study found hepatoprotective and therapeutic effects of liraglutide against acute CCl₄-induced hepatic injury. The mechanism of action of liraglutide appears to be related to the modulation of oxidative stress and hepatic metabolism (Figure 8). These effects appear to be independent of dose, in which both doses that were tested in the present study exerted similar effects. Overall, liraglutide may have potential as a complementary therapy for the treatment of drug-induced liver injury.

FIGURE 8: LIRAGLUTIDE HEPATIC EFFECTS AGAINST CCL4 ACUTE INJURY. LEGEND – CCL₄: CARBON TETRACHLORIDE; CCL₃•: TRICHLOROMETIL RADICAL; CYP: CYTOCHROME; O₂: MOLECULAR OXYGEN; CCL₃OO•: TRICHLOROMETIL PEROXIDE RADICAL; LPO: LIPOPEROXIDATION; O₂•⁻: SUPEROXIDE ANION; H₂O₂: HYDROGEN PEROXIDE; H₂O: WATER; OH•: HYDROXYL ANION; FE: IRON; SOD: SUPEROXIDE DISMUTASE; CAT: CATALASE; GSH: REDUCED GLUTATHIONE; GPX: GLUTATHIONE PEROXIDASE; GR: GLUTATIONA REDUCTASE; GSSH: OXIDIZED GLUTATHIONE.



SOURCE: THE AUTHOR.

Acknowledgements

This study was financed by CAPES (Finance Code 001) and CNPq (no. 037977/2015-3). The authors thank Rafaela Santa Clara, Liziane Malaquias, and Gabriele Seko for assistance with the experiments and Prof. Jurandir Comar for providing enzymes. The authors thank CTAF-UFPR for the histological images.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

3.5 References

- 1 Ingawalea DK, Mandlikb SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004; 37: 118–133.
- 2 Lu RJ, Zhang Y, Tang FL, Zheng ZW, Fan ZD, Zhu SM, Qian XF, Liu NN. Clinical characteristics of drug-induced liver injury and related risk factors. *Exp Ther Med* 2016; 12: 2606–2616.
- 3 Aralbaeva AN, Mamataeva AT, Zhaparkulova NI, Utegalieva RS, Khanin M, Danilenko M, Murzakhmetova MK. A composition of medicinal plants with an enhanced ability to suppress microsomal lipid peroxidation and a protective activity against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 1283–1291.
- 4 Ritesh KR, Suganya A, Dileepkumar HV, Rajashekar Y, Shivanandappa T. A single acute hepatotoxic dose of CCl₄ causes oxidative stress in the rat brain. *Toxicol Rep* 2015; 2: 891–895.
- 5 Recknagel RO, Glende Junior EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 1989; 43: 139–154.
- 6 Holscher C. Potential role of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection. *CNS Drugs* 2012; 2: 871–882.
- 7 Gao H, Zeng Z, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W, Xu L. The glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide inhibits oxidative stress and inflammatory response in the liver of rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Pharm Bull* 2015; 38: 694–702.

- 8 Guo J, Li C, Yang C, Li B, Wei J, Lin Y, Ye P, Hu G, Li J. Liraglutide reduces hepatic glucolipotoxicity-induced liver cell apoptosis through NRF2 signaling in Zucker diabetic fatty rats. *Mol Med Rep* 2018; 17: 8316–8324.
- 9 Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2: An update. *Free Radic Biol Med* 2014; 66: 36–44.
- 10 Pachaly JR, Brito HFV. Interspecific allometric scaling. In: Fowler EM, Cubas SZ, eds. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Ames: Iowa State University Press, 2001; 475-481.
- 11 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431–435.
- 12 Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 1192-1205.
- 13 Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff, SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Lipids* 1991; 26: 853–856.
- 14 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130–7139.
- 15 Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 1998; 45: 41–45.
- 16 Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121–126.

- 17 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- 18 Chen FA, Wu AB, Chen CY. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem* 2004; 86: 479–484.
- 19 Kepler D, Decker K. Glycogen: Determination with amyloglucosidase. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press Inc, 1974; 1126–1131.
- 20 Gutmann I, Wahlefeld W. L-(+)-Lactate: Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press Inc, 1974; 1464–1472.
- 21 Czok R, Lamprecht W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press Inc, 1974; 1446–1448.
- 22 Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497–509.
- 23 Abdelsameea AA, Abbas NAT, Raouf SMA. Liraglutide attenuates partial warm ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2017; 390: 311– 319.
- 24 Olaywi M, Bhatia T, Anand S, Singhal S. Novel anti-diabetic agents in non-alcoholic fatty liver disease: a mini-review. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013; 12: 584–588.
- 25 Wang Z, Hou L, Huang L, Guo J, Zhou X. Exenatide improves liver mitochondrial dysfunction and insulin resistance by reducing oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 486: 116–123.

- 26 Jayesh K, Helen LR, Vysakh A, Binil E, Latha MS. *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. fruit mitigates CCl₄ induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 327–333.
- 27 Alam MF, Safhi MM, Anwer T, Siddiqui R, Khan G, Moni SS. Therapeutic potential of Vanillylacetone against CCl₄ induced hepatotoxicity by suppressing the serum marker, oxidative stress, inflammatory cytokines and apoptosis in Swiss albino mice. *Exp Mol Pathol* 2018; 105: 81–88.
- 28 Mubarak HA, Mahmoud MM, Shoukry HS, Merzeban DH, Sayed SS, Rashed LA. Protective effects of melatonin and glucagon-like peptide-1 receptor agonist (liraglutide) on gastric ischaemia-reperfusion injury in high-fat/sucrose-fed rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018; 1–9.
- 29 Sharma MK, Jalewa J, Hölscher C. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress. *J Neurochem* 2014; 128: 459–471.
- 30 Chen P, Shi X, Xu X, Lin Y, Shao Z, Wu R, Huang L. Liraglutide ameliorates early renal injury by the activation of renal FoxO1 in a type 2 diabetic kidney disease rat model. *Diabetes Res Clin Pract* 2017; 137: 173–182.
- 31 Cao L, Waldon D, Teffera Y, Roberts J, Wells M, Langley M, Zhao Z. Ratios of biliary glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH): a potential index to screen drug-induced hepatic oxidative stress in rats and mice. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 2635–2642.
- 32 Bresciani G, Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem* 2015; 68: 87–130.
- 33 Andrade KQ, Moura FA, Santos JM, Araújo ORP, Santos JCF, Goulart MOF. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 30269–30308.

- 34 Soni MG, Mehendale HM. Hepatic failure leads to lethality of chlordecone-amplified hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Fundam Appl Toxicol* 1993; 21: 442–450.
- 35 Coen M, Ruepp SU, Lindon JC, et al. Integrated application of transcriptomics and metabolomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 93–10.
- 36 Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol* 2011; 54: 773–794.
- 37 Dong S, Gu Y, Wei G, Si D, Liu C. Determination of liraglutide in rat plasma by a selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to a pharmacokinetics study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2018; 1091: 29-35.
- 38 Chen LN, Lyu J, Yang XF, Ji WJ, Yuan BX, Chen MX, Ma X, Wang B. Liraglutide ameliorates glycometabolism and insulin resistance through the upregulation of GLUT4 in diabetic KKAy mice. *Int J Mol Med* 2013; 32: 892–900.
- 39 Valverde I, Morales M, Clemente F, et al. Glucagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Letters* 1994; 349: 313–316.
- 40 Yashi R, Igarashi O, Kiyose C. Protective effects of vitamin E analogs against carbon tetrachloride-induced fatty liver in rats. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 47: 148–154.
- 41 Lee HY, Marahatta A, Bhandary B, Kim HR, Chae HJ. 4-Phenylbutyric acid regulates CCl₄-induced acute hepatic dyslipidemia in a mouse model: A mechanism-based PK/PD study. *Eur J Pharmacol* 2016; 777: 104–112.

- 42 He Q, Sha S, Sun L, Zhang J, Dong M. GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 476: 196–203.
- 43 Petit JM, Cercueil JP, Loffroy R, Denimal D, Bouillet B, Fourmont C, Chevallier O, et al. Effect of liraglutide therapy on liver fat content in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: The Lira-NAFLD Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 102: 407–415.
- 44 Rubenstein B, Rubinstein D. The effect of carbon tetrachloride on hepatic lipid metabolism. *Can J Biochem* 1964; 42: 1263-1273.
- 45 Weinstein I, Dishmon G, Helmberg M. Hepatic lipid metabolism in carbon tetrachloride poisoning. *Biochem Pharmacol* 1966; 15: 851–871.

3.6 Supplementary material

Table S1: Absolute liver weight after CCl₄-induced liver injury in mice.

Absolute Liver Weight (g)		
	Pretreatment	Post treatment
VEH	1.48 ± 0.06	1.32 ± 0.07
CCl ₄	2.10 ± 0.06 [#]	1.63 ± 0.07 [#]
LD	1.79 ± 0.07 [*]	1.60 ± 0.06
HD	1.54 ± 0.07 [*]	
NAC	1.66 ± 0.08 [*]	

Groups: NAIVE (distillate water + canola oil); VEH (distillate water + CCl₄); LD (liraglutide 0.057 mg/kg + CCl₄); HD (liraglutide 0.118 mg/kg + CCl₄) and NAC (500 mg/kg + CCl₄). Data were expressed the mean ± SEM and analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. ^{#,*} represent significant differences between groups and naive and vehicle, respectively, at $p < 0.05$. Data were shown in percentage of organs weight related to the body weight.

Table S2: Organs relative weight after CCl₄-induced liver injury in mice.

Organs (%)	Pretreatment					Late treatment	
	VEH	CCl ₄	LD	HD	NAC	CCl ₄	LD
Spleen	0.37 ± 0.06	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.50 ± 0.16	0.50 ± 0.14
Kidney	1.28 ± 0.09	1.35 ± 0.06	1.45 ± 0.20	1.41 ± 0.19	1.30 ± 0.16	1.35 ± 0.13	1.43 ± 0.09
Lungs	0.63 ± 0.08	0.70 ± 0.08	0.70 ± 0.10	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.84 ± 0.21	0.93 ± 0.56

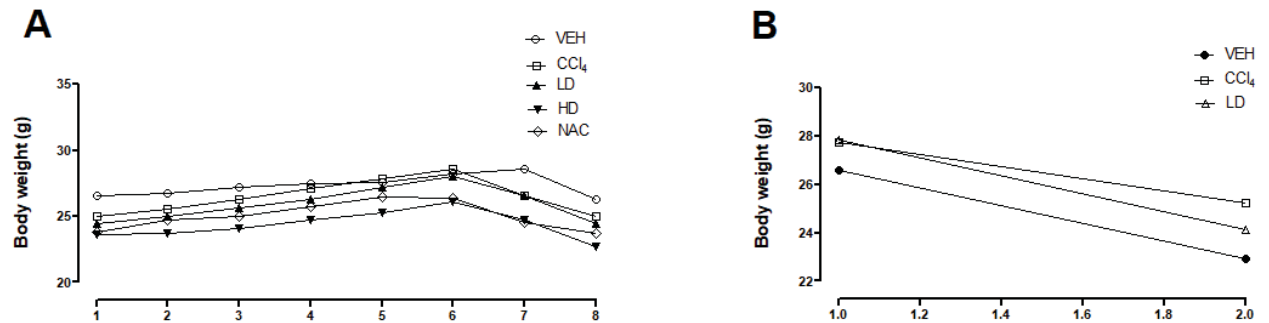
Groups: NAIVE (distillate water + canola oil); VEH (distillate water + CCl₄); LD (liraglutide 0.057 mg/kg + CCl₄); HD (liraglutide 0.118 mg/kg + CCl₄) and NAC (500 mg/kg + CCl₄). Data were expressed the mean ± SEM and analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. #.* represent significant differences between groups and naive and vehicle, respectively, at $p < 0.05$. Data were shown in percentage of organs weight related to the body weight.

Table S3: Hematological parameters after CCl₄-induced liver injury in mice.

Parameter	Pretreatment					Late treatment	
	VEH	CCl ₄	LD	HD	NAC	CCl ₄	LD
Red blood cells ($\times 10^6 \mu\text{l}^{-1}$)	8.32 ± 0.32	8.95 ± 0.43	8.66 ± 0.36	8.75 ± 0.87	8.91 ± 0.26	8.36 ± 0.70	7.78 ± 0.10
Hemoglobin (g.dl ⁻¹)	12.2 ± 0.48	12.9 ± 0.43	12.3 ± 0.44	12.6 ± 1.07	13.0 ± 0.51	12.7 ± 0.75	11.7 ± 0.69
Hematocrit (%)	38.5 ± 1.48	39.6 ± 2.10	38.6 ± 1.68	40.3 ± 4.32	42.5 ± 1.37	41.3 ± 2.54	37.3 ± 2.16
White blood cells ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	4.28 ± 2.87	6.21 ± 2.61	5.87 ± 1.36	5.73 ± 2.67	6.62 ± 2.27	5.14 ± 1.95	3.80 ± 0.98
Lymphocytes ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	2.20 ± 1.54	3.43 ± 1.42	3.33 ± 0.86	2.77 ± 0.89	3.50 ± 0.89	2.87 ± 1.37	1.85 ± 0.44
Monocytes ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	0.24 ± 0.26	0.43 ± 0.26	0.36 ± 0.11	0.27 ± 0.16	0.30 ± 0.10	0.27 ± 0.11	0.17 ± 0.05
Granulocytes ($\times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$)	1.84 ± 1.22	2.35 ± 1.29	2.18 ± 0.57	2.60 ± 1.65	2.72 ± 1.36	2.00 ± 0.72	1.77 ± 0.58

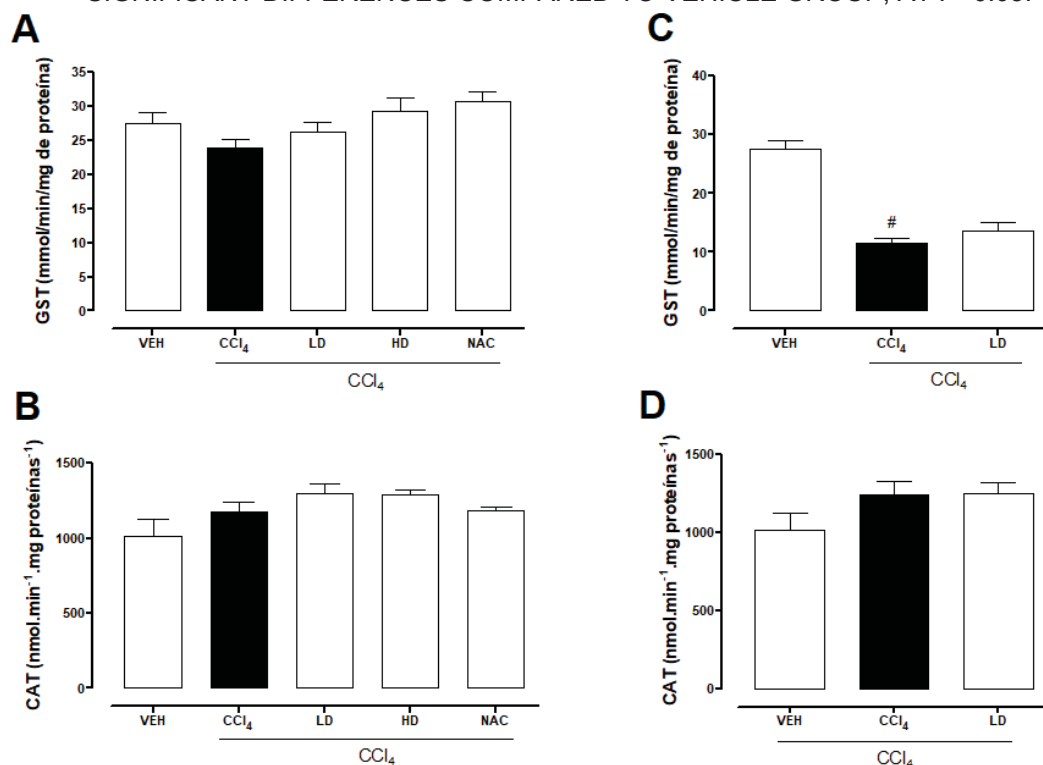
Groups: NAIVE (distillate water + canola oil); VEH (distillate water + CCl₄); LD (liraglutide 0.057 mg/kg + CCl₄); HD (liraglutide 0.118 mg/kg + CCl₄) and NAC (500 mg/kg + CCl₄). Data were expressed the mean ± SEM and analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. #.* represent significant differences between groups and naive and vehicle, respectively, at $p < 0.05$. Data were shown in percentage of organs weight related to the body weight.

FIGURE S1: ANIMALS BODY WEIGHT VARIATION IN GRAMS DURING THE EXPERIMENT PERIOD IN PRE-TREATMENT (A) AND POST-TREATMENT (B) PROTOCOLS. GROUPS: NAIVE (DISTILLATE WATER + CANOLA OIL); VEH (DISTILLATE WATER + CCL₄); LD (LIRAGLUTIDE 0.057 MG/KG + CCL₄); HD (LIRAGLUTIDE 0.118 MG/KG + CCL₄) AND NAC (500 MG/KG + CCL₄). DATA WERE ANALYZED BY TWO-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S TEST. *P* < 0.05 WAS USED TO SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS.



SOURCE: THE AUTHOR.

FIGURE S2: ANTIOXIDANT HEPATIC ENZYMES ACTIVITY IN PRE-TREATMENT (A, B) AND POST-TREATMENT (C, D). GROUPS: NAIVE (DISTILLATE WATER + CANOLA OIL); VEH (DISTILLATE WATER + CCL₄); LD (LIRAGLUTIDE 0.057 MG/KG + CCL₄); HD (LIRAGLUTIDE 0.118 MG/KG + CCL₄) AND NAC (500 MG/KG + CCL₄). DATA WERE EXPRESSED THE MEAN ± SEM AND ANALYSES WERE PERFORMED BY ONE-WAY ANOVA FOLLOWED BY BONFERRONI'S TEST. # REPRESENT SIGNIFICANT DIFFERENCES COMPARED TO VEHICLE GROUP, AT *P* < 0.05.



SOURCE: THE AUTHOR.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados reportados no presente trabalho demonstraram benéfica atuação hepática da liraglutida frente a um quadro agudo de toxicidade promovido pelo CCl₄, tanto em caráter preventivo como terapêutico. Além disso, pode-se destacar que os efeitos apresentados não são dose-dependentes, visto que ambas as doses testadas apresentaram resultados semelhantes. O análogo GLP-1 foi capaz de reduzir de maneira significativa as características macroscópicas de dano hepático, bem como as concentrações sanguíneas das enzimas indicativas de lesão tecidual. A análise histológica complementa esses dados, demonstrando redução da morte celular por necrose frente ao tratamento com a droga teste. O efeito promovido pela liraglutida pode ser atribuído, em parte, à modulação do sistema antioxidante, pois além de demonstrar uma moderada atividade sequestradora de radicais livres *in vitro*, a incretina sintética também preservou os níveis e atividade de importantes componentes do sistema redox. Por fim, a atuação da liraglutida na recuperação do metabolismo hepático comprometido em quadros de hepatotoxicidade também foi confirmada.

Diante disso, conclui-se que ambos os tratamentos com a liraglutida, tanto prévio como posterior à lesão, podem ser promissores em casos de intoxicação hepática aguda. Portanto, a liraglutida tem potencial como uma terapia segura em casos de DILI, e estudos complementares devem ser encorajados para elucidar seus efeitos hepatoprotetores e terapêuticos.

5 REFERÊNCIAS

- ABO-HADED, H. M.; ELKABLAWY, M. A.; AL-JOHANI, Z.; AL-AHMADI, O.; EL-AGAMY, D. S. Hepatoprotective effect of sitagliptin against methotrexate induced liver toxicity. **PLoS One**, v. 12, n. 3, 2017.
- ADAMS, D. H.; JU, C.; RAMAIAH, S. K.; UETRECHT, J.; JAESCHKE, H. Mechanisms of immune-mediated liver injury. **Toxicol Sci**, v. 115, n. 2, p. 307–321, 2010.
- AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. In: MORALES-GONZALEZ, J. A. **The Transcription Factor Nrf2**. Londres: IntechOpen, 2016.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- BANDEIRA, A. C. B. **Avaliação do efeito protetor do licopeno em um modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos C57BL/6**. Tese (Doutorado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.
- BANERJEE, S.; GHOSH, J.; SIL, P. C. Drug metabolism and oxidative stress: cellular mechanism and new therapeutic insights. **Biochem Anal Biochem**, v. 5, n. 1, p. 255–265, 2016.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BATH, R. K.; BRAR, N. K.; FOROUHAR, F. A.; WU, G. Y. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. **J Dig Dis**, v. 15, n. 10, p. 517 – 524, 2014.
- BATTINO, M.; GIAMPIERI, F. **Antioxidants in health and disease**. Basel: MDPI, 2018.
- BERNAL, W.; WENDON, J. Acute liver failure. **N Engl J Med**, v. 369, n. 26, p. 2525–34, 2013.
- BERTOLAMI, N. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arq Bras Cardiol**, v.85, n. 5, p.25–27, 2005.
- BJORNSSON, E. S. Hepatotoxicity by drugs: the most common implicated agents. **Int J Mol Sci**, v.17, n.2, p.224–230, 2016.

BJÖRNSSON, E. S.; BJÖRNSSON, H. K. Mortality associated with drug-induced liver injury (DILI). **Transl Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 114–117, 2017.

BRAILSFORD, C. S.; DOUIDAR, S. M.; SNODGRASS, W. R. Clinical hepatotoxicity. In: SULLIVAN JR, J. B.; KRIEGER, G. R. **Clinical Environmental Health and Toxic Exposures**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 233 – 247.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CAMERON, G. R.; KARUNARATNE, W. A. E. J. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver degeneration. **J Path Bact**, v. 42, 1936.

CHALASANI, N. P.; HAYASHI, P. H.; BONKOVSKY, H. L.; NAVARRO, V. J.; LEE, W. M.; FONTANA, R. J. ACG Clinical Guideline: The diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. **Am J Gastroenterol**, v. 109, n. 7, p. 950–966, 2014.

CHAN, R.; BENET, L. Z. Evaluation of DILI predictive hypotheses in early drug development. **Chem Res Toxicol**, v. 30, n. 4, p. 1017–1029, 2017.

CHENG, S. B.; LIU, H. T.; CHEN, S. Y.; LIN, P. T.; LAI, C. Y.; HUANG, Y. C. Changes of oxidative stress, glutathione, and its dependent antioxidant enzyme activities in patients with hepatocellular carcinoma before and after tumor resection. **PLoS One**, v. 12, n. 1, 2017.

CORRÊA-FERREIRA, M. L.; VERDAN, M. H.; DOS REIS LÍVERO, F. A.; GALUPPO, L. F.; TELLES, J. E.; ALVES STEFANELLO, M. E.; ACCO, A.; PETKOWICZ, C. L. Inulin-type fructan and infusion of *Artemisia vulgaris* protect the liver against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Phytomedicine**, v. 24, p. 68 – 76, 2017.

Cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 2, n. 2, p. 38–44, 2005.

DARA, L.; LIU, Z. X.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. **Liver Int**, v. 36, n. 2, p. 158–165, 2016.

DAVID, S.; HAMILTON, J. P. Drug-induced liver injury. **US Gastroenterol Hepatol Rev**, v. 6, p. 73–80, 2010.

DINIZ, V. Lesão hepática relacionada a fármacos. **Revista Pesquisa Médica**. 2016. Disponível em: <<http://www.revistapesquisamedica.com.br>>. Acesso em 4 dez. 2017.
DIXON, L. J.; BARNES, M.; TANG, H.; PRITCHARD, M. T.; NAGY, L. E. Kupffer Cells in the Liver. **Compr Physiol**, v. 3, n. 2, p. 785–797, 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

GARCÍA-CORTÉS, M.; ORTEGA-ALONSO, A.; LUCENA, M. I.; RAÚL, J. Drug-induced liver injury: a safety review. **Expert Opin Drug Saf**, v. 17, n. 8, p. 795–804, 2018.

GIORDANO, C.; RIVAS, J.; ZERVOS, X. An update on treatment of drug-induced liver injury. **J Clin Transl Hepatol**, v. 2, n. 2, p. 74–79, 2014.

HAUCK, A. K.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and lipotoxicity. **J Lipid Res**, v. 57, p. 1976–1986, 2016.

HAYASHI, P. H. Drug-Induced liver injury network causality assessment: criteria and experience in the united states. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 2, p. 201–211, 2016.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 2, n. 2, p. 38–44, 2005.

KIM, S. H.; NAISBITT, D. J. Update on advances in research on idiosyncratic drug-induced liver injury. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 8, n. 1, p. 3–11, 2016.

KIM, W. R.; FLAMM, S. L.; DI BISCEGLIE, A. M.; BODENHEIMER, H. C. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1363–1370, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças. In:_____. Elsevier. 9. ed. Rio de Janeiro: 2016. p. 424.

LEE, J.; HONG, S. W.; RHEE, E. J.; LEE, W. Y. GLP-1 receptor agonist and non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes Metab J**, v. 36, n. 4, p. 262 – 267, 2012.

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. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 26087–26124, 2015.

LICATA, A. Adverse drug reactions and organ damage: The liver. **Eur J Intern Med**, v. 28, p. 9–16, 2016.

LIVERTOX. Clinical and research information on drug-induced liver injury. 2018. Disponível em: <<http://livertox.nlm.nih.gov/ClinicalCourse.html>>. Acesso em: 04 dez. 2018.

LIVERTOX. Clinical and research information on drug-induced liver injury. 2017. Disponível em: <<https://livertox.nih.gov/rucam.html>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

LIVERTOX. Clinical and research information on drug-induced liver injury. 2018. Disponível em: <<https://livertox.nih.gov/Acetaminophen.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

LORENZONI, A. A.; LUSA, F. T.; CAVALLI, A. P.; GNOATO, C. V.; FERRARI, B.; GRACIANI, P. C.; BOHNEN, L. C.; SÁ, C. A.; CORRALO, V. S. Efeito protetor de

produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol. **Acta Ambient Catarin**, v. 11, p. 43 – 52, 2014.

LUBRANO, V.; BALZAN, S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. **World J Exp Med**, v. 5, n. 4, p. 218–224, 2015.

MAHMOUD, A. M.; HUSSEIN, O. E.; HOZAYEN, W. G.; ABD EL-TWAB, S. M. Methotrexate hepatotoxicity is associated with oxidative stress, and down-regulation of PPAR γ and Nrf2: Protective effect of 18 β -Glycyrrhetic acid. **Chem Biol Interact**, v. 270, p. 59 – 72, 2017.

MARRONE, G.; VACCARO, F. G.; BIOLATO, M.; MIELE, L.; LIGUORI, A.; ARANEO, C.; PONZIANI, F. R.; MORES, N.; GASBARRINI, A.; GRIECO, A. Drug-induced liver injury 2017: the diagnosis is not easy but always to keep in mind. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, n. 1, p. 122–134, 2017.

MCGILL, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 817–828, 2016.

MESCHER, A. Junqueira's Basic Pathology: Text and Atlas. In: _____. **McGraw-Hill**. 14. ed. Nova Iorque: 2010. p. 335.

OJHA, A.; YADUVANSHI, S. K.; SRIVASTAVA, N. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. **Pestic Biochem Physiol**, v. 99, p. 148–156, 2011.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194 – 205, 2008.

PETIT, J. M.; PETIT, J. M.; CERCUEIL, J. P.; LOFFROY, R.; DENIMAL, D.; BOUILLET, B.; FOURMONT, C.; CHEVALLIER, O.; DUVILLARD, L.; VERGÈS, B. Effect of liraglutide therapy on liver fat content in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: the lira-NAFLD study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 102, n. 2, p. 407 – 415, 2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55–74, 2015.

RITESH, K. R.; SUGANYA, A.; DILEEPKUMAR, H. V.; RAJASHEKAR, Y.; SHIVANANDAPPA, T. A single acute hepatotoxic dose of CCl₄ causes oxidative stress in the rat brain. **Toxicol Rep**, v. 2, p. 891 – 895, 2015.

ROBLES-DIAZ, M.; LUCENA, M. I.; KAPLOWITZ, N.; STEPHENS, C.; MEDINA-CÁLIZ, I.; GONZÁLEZ-JIMENEZ, A.; ULZURRUN, E.; GONZALEZ, A. F.; FERNANDEZ, M. C.; ROMERO-GÓMEZ, M.; JIMENEZ-PEREZ, M.; BRUGUERA, M.; PRIETO, M.; BESSONE, F.; HERNANDEZ, N.; ARRESE, M.; ANDRADE, R. J. Use of Hy's law and a new composite algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 109–118, 2014.

ROBLES-DÍAZ, M.; MEDINA-CALIZ, I.; STEPHENS, C.; ANDRADE, R. J.; LUCENA, M. I. Biomarkers in DILI: one more step forward. **Front. Pharmacol**, v. 7, n. 267, 2017.

ROTH, A. D.; LEE, M. Y. Idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): potential mechanisms and predictive assays. **Biomed Res Int**, v. 2017, 2017.

SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. Anatomy & Physiology. In: _____. **McGraw-Hills**. 8. ed. Nova Iorque: 2008. p. 889–903.

SINGH, A.; BHAT, T. K.; SHARMA, O. P. Clinical biochemistry of hepatotoxicity. **J Clin Toxicol**, v. 4, p. 1–19, 2011.

SINITOX - Sistema nacional de informação tóxico-farmacológica. Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana por agente e por região. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: < <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

SINITOX - Sistema nacional de informação tóxico-farmacológica. Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstância. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: < <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

SIRAKI, A. G.; KLOTZ, L. O.; KEHRER, J. P. Free radicals and reactive oxygen species. In: MCQUEEN, C (Ed.). **Comprehensive Toxicology**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 277-307.

SKRSYPCSAK, C. LOCATELLI, C. Efeitos da liraglutida sobre a glicemia e a obesidade: uma revisão bibliográfica. **Vita et Sanitas**, v. 7, p. 51 – 64, 2013.

STENVALL, A.; LARSSON, E.; STRAND, S. E.; JONSSON, B. A. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. **Phys Med Biol**, v. 59, n. 13, p. 3353–3371, 2014.

STINE, J. G.; LEWIS, J. H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 4, p. 517–536, 2016.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381–1478, 2004.

SUK, K. T.; KIM, D. J. Drug-induced liver injury: present and future. **Clin Mol Hepatol**, v. 18, n. 3, p. 249–257, 2012.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F. P. Metabolismo de fármacos. In: GOLAN DE, TASHIJIAN JR, ARMSTRONG EJ, ARMSTRONG AW. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 46–57.

TESCHKE, R.; DANAN, G. Diagnosis and management of drug-induced liver injury (DILI) in patients with pre-existing liver disease. **Drug Saf**, v. 38, n. 8, p. 729–744, 2016.

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 14, p. 397–411, 2017.

VICTOZA: Liraglutida. Luciane M. H. Fernandes. Araucária: Novo Nordisk, 2014. Bula de remédio.

VIEIRA, B. M. **Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos wistar**. 58 f. Dissertação (Mestrado em nutrição e saúde) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

YOON, E.; BABAR, A.; CHOUDHARY, M.; KUTNER, M.; PYRSOPOULOS, N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. **J Clin Transl Hepatol**, v. 4, p. 131 – 142, 2016.

YOSHIOKA, H.; FUKAYA, S.; MIURA, N.; ONOSAKA, S.; NONOGAKI, T.; NAGATSU, A. Suppressive effect of Kampo formula “juzen-taiho-to” on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 39, n. 9, p. 1564–1567, 2016.

YU, Y. G.; MAO, Y. M.; CHEN, C. W.; CHEN, J. J.; CHEN, J.; CONG, W. M.; DING, Y.; DUAN, Z. P.; FU, Q. C.; GUO, X. Y.; HU, P.; HU, X. Q.; JIA, J. D.; LAI, R. T.; LI, D. L.; LIU, Y. X.; LU, L. G.; MA, S. W.; MA, X.; NAN, Y. M.; REN, H. SHEN, T.; WANG, H.; WANG, J. Y.; WANG, T. L.; WANG, X. J.; WEI, L.; XIE, Q.; XIE, W.; YANG, C. Q.; YANG, D. L.; YU, Y. Y.; ZEN, M. D.; ZHANG, L.; ZHAO, X. Y.; ZHUAN, H. CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. **Hepatol Int**, v. 11, p. 221–241, 2017.

YUAN, L.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug induced liver injury. **Clin Liver Dis**, v. 17, n. 4, p. 507–518, 2013.