

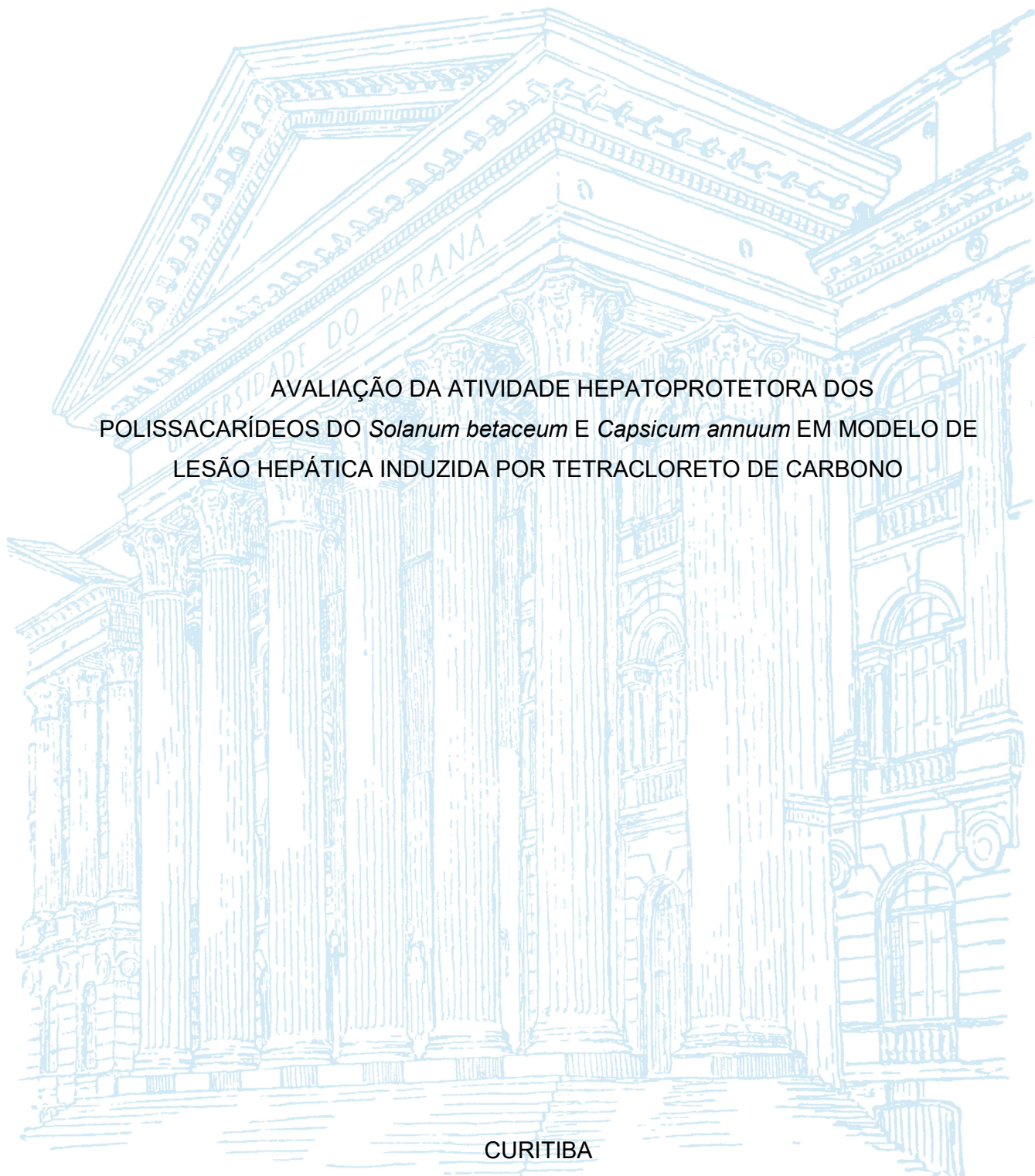
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA CAROLINE SANTA CLARA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS
POLISSACARÍDEOS DO *Solanum betaceum* E *Capsicum annuum* EM MODELO DE
LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO

CURITIBA

2018



RAFAELA CAROLINE SANTA CLARA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DOS
POLISSACARÍDEOS DE *Solanum betaceum* E *Capsicum annuum* EM MODELO DE
LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR TETRACLORETO DE CARBONO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alexandra Acco
Co-orientadora: Msc. Letícia Milani

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, força que rege o universo e me permitiu chegar aonde cheguei. Iluminou meu caminho, clareou meus pensamentos e colocou sabedoria ante as minhas ações. O mérito pode ser meu, mas a glória é toda dEle. À Nossa Senhora de Aparecida, “minha mãe”, de luz que faz milagres. O retorno prometido acontecerá porque minha graça foi alcançada. Obrigada, obrigada e obrigada.

À minha avó Ivete, que em vida me ensinou – sem saber – a ser uma mulher forte, madura, responsável e íntegra. De bondade e empatia infinitas, que do além-céu você possa sentir minha eterna gratidão. Esse momento é nosso!

Aos meus pais Rafael e Déborapelo apoio incondicional, companheirismo, compreensão e amor inegáveis. Qualquer texto seria pouco para explicitar o quanto eu sou grata por tê-los e quão genuíno e puro é meu amor por vocês.

À minha irmã Rayssa, a razão da minha vida. Amor sem tamanho, afeto sem limites. Não seria capaz de imaginar minha caminhada até aqui sem você. Obrigada por me dar tanto suporte.

Aos meus familiares tão amados. Madrinhas, padrinhos, tios, tias, primos, primas e avós. Em especial, meu muito obrigada à Evelyn, madrinha Leia, padrinho Gilmar. Minhas grandes referências de família. Extensão da minha casa e complemento de amor de pai, mãe e irmã. Obrigada!

À minha melhor amiga Paula. Unimo-nos ao acaso, mas certamente não foi ele que nos manteve tão próximas durante todos esses anos. Minha gratidão pela nossa amizade, meu orgulho pela pessoa que você é. Obrigada pelo apoio incondicional. Ao meu melhor amigo Edgar, por todo o apoio, admiração e carinho. Obrigada por me permitir dividir momentos únicos e especiais com você.

As minhas amigas de longa data Raquel, Vivian, Victória e Raphaella, pelo apoio e companheirismo no ano mais turbulento do ensino médio e por estarem comigo até agora. Sem vocês seria muito mais difícil e muito mais sem graça.

Aos amigos que a Biomedicina me trouxe: Juliana, Isabela, Bruno, Bruna, Ana Paula, Gabriela, Gabriel, Heloize e Bruna. Conviveram comigo em um dos meus momentos mais difíceis e ainda assim estiveram lá por mim. Sem vocês eu não teria chegado até essa etapa, obrigada por serem quem são! À minha grande amiga Pâmela, pela enorme compatibilidade de hábitos, costumes, gastos excessivos na papelaria e na padaria também. Sem você a graduação seria menos organizada e muito menos produtiva. Obrigada!

À minha orientadora Alexandra, pela paciência e todo o conhecimento transmitido. Obrigada por confiar em mim e me dar a oportunidade de fazer ciência. Às minhas colegas de laboratório Cláudia, Eliana, Natália, Carol e Claudinha, por me ensinarem tudo o que sei e por compartilharem da rotina do laboratório. A companhia de vocês tornou tudo muito mais fácil e prazeroso. Um agradecimento especial para a Liziane, sua compreensão e parceria foram essenciais nesse processo. Conte sempre comigo, IC!

À Universidade Federal do Paraná por ter oferecido toda a estrutura necessária para minha formação como pessoa e profissional. Sinto imenso orgulho de ter percorrido o incansável caminho do conhecimento nesta instituição.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o projeto.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

As DILI (Hepatotoxicidade induzida por drogas, do inglês *Drug-Induced Liver Injury*) representam uma grande parcela das lesões hepáticas encontradas na rotina clínica e têm números crescentes no mundo. São a maior causa de insuficiência hepática aguda e grande parte dos casos culmina em medidas extremas como o transplante de fígado. Diante da dificuldade de diagnóstico, mecanismos complexos e tratamentos limitados, há demanda de pesquisas por novas estratégias terapêuticas. Desse modo, os polissacarídeos têm seu papel estudado como uma alternativa terapêutica, uma vez que já há dados sobre suas atividades antibacteriana, antiparasitária, antitumoral e anti-inflamatória. Este projeto teve como objetivo avaliar o potencial hepatoprotetor de polissacarídeos extraídos do tamarillo, *Solanum betaceum* e do pimentão, *Capsicum annuum* frente à toxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl_4) em camundongos Swiss machos. Animais tratados receberam polissacarídeos do pimentão (P100, 100 mg/kg) ou do tamarillo (T50, 50 mg/kg), enquanto os controles receberam água (veículo). Outros dois grupos receberam apenas P100 e T50, para avaliar a toxicidade destes compostos *per se*. Os tratamentos ocorreram por gavagem, uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos. No 6° e 7° dias os animais foram desafiados com CCl_4 a 2% via i.p., sendo eutanasiados no 8° dia para coleta de material biológico (sangue e fígado). A bioquímica plasmática demonstrou que o CCl_4 elevou significativamente os marcadores de lesão hepática alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enquanto houve redução ($p < 0.05$) nos grupos tratados com o P100 (71% para ALT e 57% para AST) e com o T50 (60% para ALT e 67% para AST), quando comparados ao grupo veículo, indicando uma provável atividade hepatoprotetora dos compostos. Nos ensaios de estresse oxidativo realizados em homogenato de fígado, a taxa de peroxidação lipídica (LPO), o nível de glutatona reduzida (GSH) e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona-S-transferase (GST) se mantiveram estatisticamente semelhantes para todos os grupos. Quanto aos dados de hemograma, na série vermelha houve redução significativa no volume plaquetário dos grupos tratados em relação ao naíve e a análise da série branca demonstrou que os animais tratados com T50 e desafiados com CCl_4 tiveram aumento na quantidade total de linfócitos e leucócitos (47% e 31%, respectivamente, $p < 0.05$), direcionando os estudos para a investigação de parâmetros inflamatórios. Destes, foram avaliados a atividade enzimática da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO) e produção de nitritos (NO), onde NAG e MPO tiveram valores estatisticamente iguais para todos os grupos. Já os níveis de NO representaram um aumento de 28% no grupo P100 + CCl_4 em relação ao grupo veículo. Constatou-se, diante dos resultados, que houve validação do modelo de lesão hepática por tetracloreto de carbono, entretanto não foi possível considerar o estresse oxidativo e a inflamação como mecanismos de ação principais da atividade dos polissacarídeos. Devido aos dados obtidos dos polissacarídeos *per se*, estudos adicionais serão necessários para elucidar a atividade hepatoprotetora dos polissacarídeos estudados, bem como compreender melhor estas e outras vias de transdução e lesão celular que ainda poderiam ser investigadas.

Palavras-chave: Hepatotoxicidade. Polissacarídeos. Tamarillo. Pimentão. Tetracloreto de Carbono. Inflamação.

ABSTRACT

The DILI (Drug – Induced Liver Injury) represents a large portion of the liver lesions found in the clinical routine and has increasing numbers in the world. DILI are the major cause of acute liver failure, has no specific treatment, and most cases culminate in liver transplantation. Given the difficulty of diagnosis, complex mechanisms and limited treatments, there is a demand for research for new therapeutic strategies. Polysaccharides have been studied as an alternative, since their antibacterial, antiparasitic, antitumor and anti-inflammatory activities has been reported. This project aims to evaluate the hepatoprotective potential of polysaccharides extracted from tamarillo, *Solanum betaceum* and sweet green pepper, *Capsicum annuum*, against carbon tetrachloride (CCl₄) toxicity in male Swiss mice. Treated animals received sweet green pepper (P100, 100 mg/kg) or tamarillo (T50, 50 mg/kg) polysaccharides, while controls received water (vehicle). Two other groups received only P100 and T50 to assess the toxicity of these compounds *per se*. Treatments occurred by gavage, once a day, for 7 consecutive days. On days 6th and 7th the animals were challenged with 2% CCl₄ via i.p., and euthanized on the 8th day for collection of biological material (blood and liver). Plasma biochemistry showed that CCl₄ significantly increased the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), while there was a reduction ($p < 0.05$) in the P100 (71% for ALT and 57% for AST) and T50 (60% for ALT and 67% for AST) treated groups, when compared to the vehicle group. The amount of hepatic proteins, reduced by CCl₄ was normalized by polysaccharides, indicating a likely hepatoprotective activity of the compounds. In hepatic lipid peroxidation (LPO), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) data, markers of oxidative stress, any significant differences were found. Corroborating these data, the *in vitro* test with DPPH also did not show the polysaccharide free radical scavenging activity. Regarding the hematology, a significant difference was found only in the platelet volume; whereas the animals treated with T50 and challenged with CCl₄ had an increase in the total amount of lymphocytes and leukocytes (47% and 31% respectively, $p < 0.05$). The enzymatic activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and myeloperoxidase (MPO), and nitrite production (NO) were evaluated. NO levels increased 28% in the P100 + CCl₄ group compared to the vehicle group. The results showed that the model of liver injury by CCl₄ was validated, and that the polysaccharides reduced the plasma enzymes that indicate hepatic injury. However, it was not possible to consider oxidative stress and inflammation as the main mechanisms of action of these polysaccharides. Further studies are necessary to understand the target mechanisms of the polysaccharides.

Keywords: Hepatotoxicity. Polysaccharides. Tamarillo. Sweet Green Pepper. Carbon Tetrachloride. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AFLD	– <i>AlcoholicFattyLiverDisease</i> (doença hepática alcoólica)
AINEs	– Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALF	– Acuteliverfailure
ALT	– Alanina aminotransferase
ANOVA	– Análise de variância
AST	–Aspartatoaminotransferase
ATC	– Ácido tricloroacético
BHG	– Hemoglobina
BHT	– hidroxitoluenobutilado
C-Cl	–Ligação carbono – clorina
CDNB	– 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno
Cl ⁻	–Íon cloreto
Cat	–Catalase
CCl ₃ •	– Radical triclorometil
CCl ₃ COO	– Radical peroxitricloromeril
CCl ₄	– Tetracloroeto de carbono
CEUA	– Comissão de ética no uso de animais
CYP	– Citocromo P450
CYP2E1	– Enzima do citocromo P450, família2, subfamília E, membro 1
DILI	– <i>Druginducedliverinjury(ies)</i> (lesão(ões) hepática(s) induzida(s) por drogas)
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DPPH	– 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
DTNB	– 5,5-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzoico)
e ⁻	– Elétron
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	– Espécies reativas de oxigênio
EUA	– Estados Unidos da América
FA	– Fosfatase alcalina
GPx	– Glutationaperoxidase
GSH	– Glutathiona reduzida
GSSG	– Glutationadissulfeto

GST	– Glutathione S-transferase
H ⁺	– Íon hidrogênio
H ₂ O	– Água
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
H ₂ O _d	– Água destilada
HCl	– Ácido clorídrico
HCT	– Hematócrito
HSC	– Células hepáticas estreladas
KC	– Células de Kupffer
LPO	– Peroxidação lipídica
LPS	– Lipopolissacarídeo
MCH	– Hemoglobina corpuscular média
MCHC	– Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	– Volume corpuscular médio
MPV	– Volume médio de plaquetas
MPO	– Mieloperoxidase
NAC	– N-acetilcisteína
NAFLD	– <i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i> (doença hepática gordurosa não-alcoólica)
NAG	– N-acetil-β-D-glucosaminidase
Need	– Naftiletlenodiamina
NO	– Óxido nítrico
O ₂	– Oxigênio molecular
O ₂ •	– Ânion superóxido
OH•	– Radical hidroxila
OONO•	– Peroxinitrito
PBS	– Tampão fosfato-salino
pH	– Potencial hidrogeniônico
PCT	– Plaquetócrito
PLT	– Plaquetas
RBC	– Glóbulos vermelhos
RDW	– Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
SOD	– Superóxido dismutase
TMB	– Tetrametilbenzidina

Tris –Trisaminometano
Tris-EDTA – Tris ácido etilenodiamino tetra-acético
Tris-HCl – Tris hidrocloreto
VEH – Veículo
Via i.p. – Via intraperitoneal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 FÍGADO E METABOLISMO DE FÁRMACOS.....	19
2.2 HEPATOTOXICIDADE E DILI.....	20
2.3 TETRACLORETO DE CARBONO	21
2.3.1 Mecanismo de toxicidade	21
2.3.2 Modelos experimentais.....	23
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
2.5 INFLAMAÇÃO E DILI	26
2.6 POLISSACARÍDEOS	27
2.6.1 Solanum betaceum	27
2.6.2 Capsicum annum	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 POLISSACARÍDEOS	29
3.2 ANIMAIS.....	29
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.4 BIOQUÍMICA SÉRICA E HEMOGRAMA	31
3.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO	31
3.5.1 Determinação da atividade oxidante in vivo pelo método DPPH.....	31
3.5.2 Homogeneização do tecido hepático	30
3.5.3 Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH).....	30
3.5.4 Ensaio da atividade enzimática da Catalase (CAT)	31
3.5.5 Ensaio da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)	33
3.5.6 Ensaio da atividade enzimática da Glutathiona-S-Transferase (GST)	33
3.5.7 Mensuração da taxa de Peroxidação Lipídica (LPO)	33
3.5.8 Quantificação de proteínas totais	34
3.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	34
3.6.1 Homogeneização do tecido hepático.....	34
3.6.2 Atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO).....	35

3.6.3 Atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG).....	35
3.6.4 Medida do índice indireto da produção de NO (nitrito)	35
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Bioquímica plasmática	37
4.2 Hemograma.....	39
4.3 Parâmetros de estresse oxidativo	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO .41
4.4 Parâmetros inflamatórios.....	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A função central do metabolismo é a principal motivação da grande susceptibilidade do fígado aos efeitos tóxicos das drogas. A hepatotoxicidade induzida por drogas, ou DILI (*Drug Induced Liver Injury*) corresponde a 13% dos casos de falência hepática aguda (ou ALF, do inglês *Acute Liver Failure*) nos Estados Unidos (BELL; CHALASANI, 2009), além de ser a causa mais comum de reação adversa reportada na clínica (ANDRADE; ORTEGA-ALONSO; LUCENA, 2016; BELL; CHALASANI, 2009; ONAKPOYA; HENEGHAN; ARONSON, 2016; RASCHI; DE PONTI, 2017). Esses eventos também possuem importância na indústria farmacêutica, uma vez que as DILI são as principais causas de monitoramento de efeitos adversos pós-comercialização e o maior motivo de retirada de medicamentos do mercado (KAPLOWITZ, 2005).

O dano hepático induzido por drogas possui vários fenótipos, que são diferentes entre si em relação à sintomatologia, gravidade e grau de avanço. Os primeiros estágios são as hepatites, que podem ser agudas, colestásicas, hepatocelulares ou então uma junção das duas primeiras, caracterizando a hepatite mista. Há também a esteatose, que consiste no acúmulo de gordura no tecido, que pode ser alcoólica (denominada *Alcoholic Fatty Liver Disease - AFLD*) ou não alcoólica (*Non-alcoholic Fatty Liver Disease - NAFLD*). O estágio seguinte é o desenvolvimento de fibrose, posteriormente o tecido hepático é substituído por tecido conjuntivo - portanto, afuncional - estabelecendo a cirrose, um dos graus mais avançados de dano hepático. Neste estágio, a lesão já é irreversível. Caso o agente causador da lesão não seja retirado, há grandes riscos de evolução para o hepatocarcinoma celular (LiverTox, 2017).

O diagnóstico da DILI ainda se baseia na exclusão de outras enfermidades, análise da sintomatologia e das alterações dos marcadores bioquímicos. A retirada da droga e descontinuidade do tratamento são os meios mais eficazes de prevenir a cronificação do quadro (RASCHI; DE PONTI, 2017). Ainda assim, a real situação não é completamente documentada, uma vez que o registro de dados na clínica esbarra na etiologia da DILI, no seu caráter idiossincrático e na dificuldade de estimar a prevalência e incidência da doença (LICATA et al., 2017), bem como a complexidade dos mecanismos celulares que envolvem a fisiopatologia da doença. Uma anamnese adequada, avaliação do histórico de doenças hepáticas e

conhecimento da posologia adequada das prescrições se fazem necessárias para um melhor entendimento da epidemiologia da DILI (RASCHI; DE PONTI, 2017), bem como para conduzir corretamente o tratamento, que é muito limitado, e que foi objeto de estudo deste trabalho.

1.1 JUSTIFICATIVA

A exposição constante a substâncias, suas possíveis interações e o próprio processo de metabolização fazem do fígado um importante alvo de diferentes mecanismos de toxicidade. Já se tem conhecimento de várias hepatotoxinas, como fármacos ou produtos naturais, porém ainda assim os tratamentos são bastante limitados, sendo o transplante de fígado a única alternativa nos casos de maior gravidade. Isto ressalta a necessidade de estudar novas estratégias terapêuticas. Dada a importância biológica já conhecida dos polissacarídeos e a necessidade de um aprofundamento no conhecimento do seu potencial terapêutico, especificamente foram estudados os polissacarídeos do pimentão, *Capsicum annuum*, e do tamarillo, *Solanum betaceum*. Estes compostos foram escolhidos por conta dos resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa no âmbito de outras atividades biológicas, como a ação antineoplásica (ADAMI et al., 2018). A proposta foi avaliar se há atividade terapêutica atribuída a estes polissacarídeos sobre o fígado, por meio de investigação de parâmetros de estresse oxidativo, parâmetros inflamatórios, hematologia e bioquímica plasmática após lesão em modelo de DILI induzida. A atribuição de mais funções biológicas, bem como o entendimento das vias pelas quais elas acontecem é de grande relevância.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o possível efeito hepatoprotetor dos polissacarídeos extraídos dos frutos de *Solanum betaceum* e *Capsicum annuum* frente ao modelo de toxicidade hepática do tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- a) Avaliar a efetividade do modelo experimental de toxicidade hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) a 2%.
- b) Analisar as alterações provocadas pelo CCl₄ e a resposta dos tratamentos com os polissacarídeos nos marcadores plasmáticos como transaminases, fosfatase alcalina e hemograma.
- c) Avaliar as alterações provocadas pelo CCl₄ no estresse oxidativo, por meio de determinação de atividades enzimáticas (SOD, CAT e GST), da taxa de peroxidação lipídica (LPO) e de glutathiona reduzida (GSH), e a modulação dos polissacarídeos nestes parâmetros.
- d) Avaliar as alterações provocadas pelo CCl₄ na resposta inflamatória, por meio da quantificação de nitritos, determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase e mieloperoxidase (MPO) e o papel modulador dos polissacarídeos nesses parâmetros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FÍGADO E METABOLISMO DE FÁRMACOS

O metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, que se refere ao processo de transformação estrutural de uma molécula por meio de atividade enzimática (SHEHU, 2017), constitui uma das funções mais importantes do fígado. Em meio a um *pool* de atividades que abrangem o armazenamento de nutrientes e vitaminas, absorção e excreção de metabólitos, ponto central do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras (PANDIT; SACHDEVA; BAFNA, 2012), há uma função desintoxicante relacionada à depuração de substâncias como drogas e xenobióticos (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017). Esse é um processo farmacocinético essencial para a eliminação do princípio ativo, finalizando assim o efeito terapêutico de fármacos. Entretanto, os produtos finais podem ser tanto fármacos ativos (provenientes dos pró-fármacos), metabólitos secundários mais hidrofílicos que a molécula original, que irão direto para a fase de excreção, e metabólitos tóxicos, os quais produzem reações indesejadas ao organismo.

O metabolismo de xenobióticos é classificado em duas fases: (a) fase I, ou fase de hidrólise e oxidação, que tem como objetivo interferir na estrutura da molécula, expondo ou inserindo determinado grupamento funcional para que a hidrossolubilidade seja maior; isto facilita a eliminação da substância ou então, a conjugação que ocorre na (b) fase II do metabolismo, que recebe este nome por promover a formação de uma ligação covalente entre o metabólito e um componente endógeno (glutathione, aminoácidos ou ácido glicurônico, por exemplo), para inativação do composto e eliminação subsequente (BUXTON; BENET, 2012). Estas reações ocorrem em alguns órgãos, dos quais, indubitavelmente, o fígado é o mais importante.

A toxicidade de um produto do metabolismo pode ocorrer devido a fatores estruturais da molécula, induzidas ou não por reações do sistema enzimático citocromo P450 (CYP). Essas enzimas são pertencentes a uma superfamília de hemoproteínas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e compostos endógenos, a fim de convertê-los em metabólitos mais polares (WU et al., 2018; XU et al., 2017). Estas enzimas possuem atividades diferentes que variam de acordo com o substrato envolvido e a alteração molecular a ser feita. Apresentam principalmente atividade

de monooxidase, peroxidase e oxigênio-redutase, sendo esta última a de maior interesse para este trabalho (item 2.3.1), pois é dessa forma que o CCl_4 é metabolizado (GOEPTAR; SCHEERENS; VERMEULEN, 1995). A associação medicamentosa com indutores ou inibidores enzimáticos também pode interferir na biotransformação da substância e, conseqüentemente, na ação terapêutica ou tóxica do metabólito. Isso altera a distribuição e o tempo de ação de fármacos no organismo, gerando reações além do limiar terapêutico.

2.2 HEPATOTOXICIDADE E DILI

As possíveis origens das DILI dependem das características do indivíduo, do fármaco em questão e da dose administrada. Intrinsecamente, são tempo e dose dependentes. Acontecem por características inerentes ao composto administrado, podendo causar lesões diretas ou indiretas e geralmente agudas. Possuem maiores taxas de incidência e podem ser reproduzidas em laboratório para fins experimentais, como é o caso do tetracloreto de carbono (CCl_4) e clorofórmio (JORGE, 2006). Já a hepatotoxicidade idiossincrática considera as particularidades do indivíduo, mais especificamente a variabilidade genética na codificação de genes que atuam em pontos centrais do metabolismo, bem como suas interações com fatores ambientais. Estes configuram os casos mais preocupantes, pois não há como prever cada resposta e prevenir efeitos indesejados (LEISE; POTERUCHA; TALWALKAR, 2014).

Terapias baseadas em 'polifarmácia' também são fatores de risco importantes (DA SILVA, 2013; HUNT et al., 2014) devido às possíveis interações medicamentosas e alterações metabólicas que estas podem trazer. O uso de substâncias indutoras de CYP, como rifampicina, isoniazida e etanol (DA SILVA, 2013), pode acelerar o metabolismo e a geração de possíveis metabólitos tóxicos de outras drogas. Da mesma forma, a associação de dois ou mais fármacos potencialmente tóxicos aumenta exponencialmente as chances de dano (AHMAD, 2016; LAMMERT et al., 2010). Exemplos de classes de drogas que já possuem hepatotoxicidade conhecida são: fármacos para tratamento da tuberculose (rifampicina, isoniazida, piranizamida), anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's – paracetamol ou acetaminofeno, benozaprofeno, diclofenaco), drogas antiretrovirais (ritonavir, lamivudine), antihiperlidêmicos (estatinas) e anestésicos (halotano,

clorofórmio, óxido nitroso) (PANDIT; SACHDEVA; BAFNA, 2012; RASCHI; DE PONTI, 2017). Das citadas, o paracetamol é uma das mais bem estudadas (BLACK, 1984; LARSON, 2007; MONTRIEF; KOYFMAN; LONG, 2018; PRESCOTT et al., 1971; RUMACK, 2002; SUBRAMANYA et al., 2018; TOGHILL et al., 1969), assim como a associação amoxicilina-clavulonato (LEISE; POTERUCHA; TALWALKAR, 2014). Destas, amoxicilina-clavulonato é o agente mais comumente descrito, com 1 caso para cada 2300 pacientes. Ainda, azatioprina e infliximab figuram entre as de alto risco à indução de hepatotoxicidade (BJÖRSSON, 2016). Várias drogas estão associadas a, pelo menos, um caso de óbito. Em linhas gerais, embora haja divergências e particularidades químicas, acredita-se que a maioria das que induzem toxicidade desencadeie dano mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, inibição do transporte biliar ou ativação de respostas imunes (LiverTox, 2016; ABBAS et al., 2012).

Ademais, há diversos fatores que estão envolvidos no âmbito individual dos pacientes, como idade, gênero, hábitos de vida (etilismo, obesidade), predisposição genética, entre outros (AHMAD, 2016; LICATA et al., 2017). Dados na literatura demonstram que no sexo feminino (LEISE et al., 2014), a lesão do tipo hepatocelular e os níveis elevados de bilirrubina são considerados fatores de risco, enquanto que o registro de doença hepática pré-existente está relacionada com uma maior mortalidade (RASCHI; DE PONTI, 2017). No que diz respeito à idade, em crianças o padrão de lesão mais comum é o hepatocelular, causado principalmente por drogas que induzem disfunção mitocondrial. Em idosos, o dano principal é o tipo colestático e está relacionado à lipofilicidade dos compostos e excreção biliar (AHMAD, 2016; HUNT et al., 2014).

2.3 TETRACLORETO DE CARBONO

2.3.1 Mecanismo de toxicidade

Dentre os exemplos de xenobióticos supracitados, o de escolha desse projeto é o tetracloreto de carbono (CCl_4). Substância desenvolvida industrialmente, é um solvente químico para óleos, gorduras e resinas, além de uso em procedimentos de lavagem a seco (EPA Air Toxics, 2016). Também teve uso documentado como anti-

helmíntico na clínica veterinária (HALL, 1921;GOEPTAR; SCHEERENS; VERMEULEN, 1995). Porém, por ser uma hepatotoxina já conhecida há décadas, suas aplicações diretas foram descontinuadas visando diminuir os casos de intoxicação ocupacional e acidental. O uso como droga experimental, entretanto, é bastante comum e possibilitou elucidar algumas variáveis presentes nas DILI.

É sabido que o grau de lesão é dose e duração-dependente, já que o CCl_4 pode ser absorvido por diversas vias (pele, trato respiratório e intestinal), porém o metabolismo principalmente hepático é o que causa maiores danos ao fígado. Isso se deve ao fato de que o mecanismo do CCl_4 é a geração de radicais livres decorrentes do processo de alterações estruturais que ocorrem durante a fase I de biotransformação, catalisada pelas enzimas do citocromo P450 (VILLENEUVE; PICHETTE, 2004). Dentre essas enzimas, localizadas no retículo endoplasmático dos hepatócitos, principalmente a CYP2E1 age modificando a molécula do tetracloreto através de sua atividade oxidativa promovendo uma dehalogenação redutiva(FAUTREL et al., 2014; RECKNAGEL et al., 1989). Ocorre a ligação do CCl_4 ao sítio catalítico da enzima, onde uma alteração dos spins do grupamento heme resultam na inserção de um elétron na ligação C-Cl, às custas de um íon cloro (Cl^-) (BHADAURIA; NIRALA; SHUKLA, 2007), o que culmina na geração do radical $\text{CCl}_3\cdot$ (triclorometil; Figura 1). Essa redução causa um desemparelhamento de elétrons na camada de valência da molécula, tornando-a extremamente reativa a componentes endógenos como ácidos graxos, membranas e organelas. Também pode haver interação com outros íons e átomos decorrentes do metabolismo celular. Neste caso, o oxigênio molecular (O_2), formando mais um metabólito potencialmente tóxico, o radical peroxitriclorometil ($\text{CCl}_3\text{COO}\cdot$)(BHADAURIA; NIRALA; SHUKLA, 2007; KHAN; KHAN; SAHREEN, 2012; RECKNAGEL; DOLAK, 1989). Isso caracteriza a fase de iniciação da peroxidação lipídica (LPO), definida pelo dano aos fosfolipídios de membrana, provocando desbalanço no fluxo de íons ao longo da bicamada lipídica das células. Essa fase ocorre quando ácidos graxos são atacados por alguma molécula capaz de abstrair um átomo de hidrogênio. Seguindo a reação inicial, tanto $\text{CCl}_3\cdot$ quanto $\text{CCl}_3\text{COO}\cdot$ podem lesar as membranas celulares, propagando a reação em cadeia que caracteriza a LPO. Os processos seguintes, divididos entre as fases de propagação e terminação, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), acabam por aumentar exponencialmente os danos a outras biomoléculas, que podem ser proteínas, aminoácidos, organelas

celulares, incluindo disfunção mitocondrial e danos ao retículo endoplasmático, o que culmina no aumento de cálcio extracelular e favorecimento da morte celular por necrose (FAUTREL et al., 2014; HEMMINGS et al., 2002) e o próprio DNA (ABBAS et al., 2010). Quando estas lesões hepatocelulares ocorrem, as enzimas citoplasmáticas ALT e AST são liberadas das células lesadas para o plasma (OZER et al., 2008). A elevação plasmática de fosfatase alcalina pode indicar também efeitos hepatobiliares e colestase induzidos pelo CCl_4 (OZER et al., 2008). Portanto, este modelo é fidedigno de muitas DILI provocadas por fármacos de uso clínico, como previamente atestado por nosso grupo (CORRÊA-FERREIRA et al., 2017), embora muitas variações sejam descritas no modelo quanto à dose e concentração do CCl_4 , tempo de tratamento e via de administração (oral ou intraperitoneal).

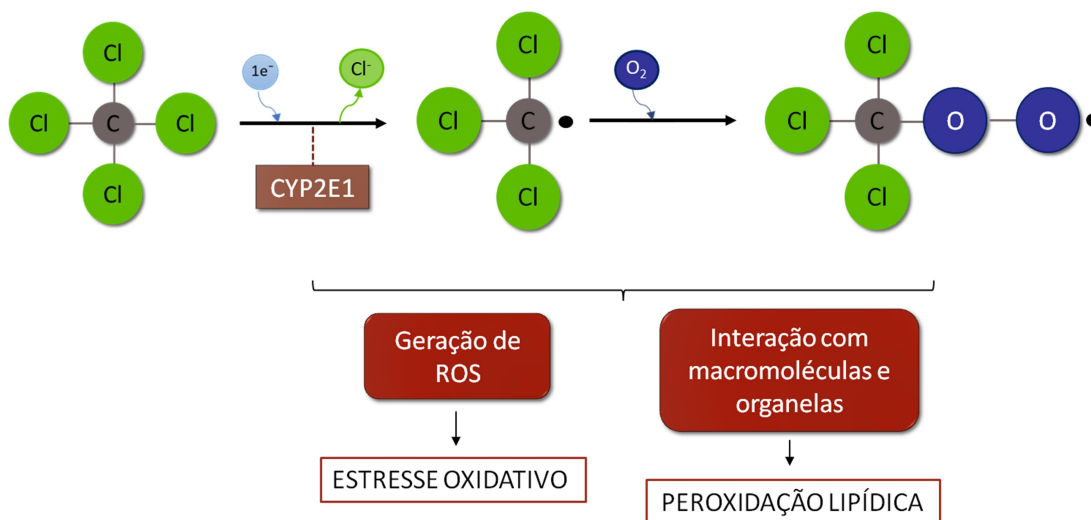


Figura 1: Mecanismo de modificações estruturais ocasionadas na molécula do tetracloreto de carbono e que ocasiona seu potencial hepatotóxico. (Cl: átomo cloro, C: átomo de carbono, e⁻: elétron, Cl⁻: íon cloro, O₂: oxigênio molecular, O: átomo oxigênio, CYP2E1: enzima 2E1 do citocromo P450, ROS: espécies reativas de oxigênio. FONTE: O autor (2018).

2.3.2 Modelos experimentais

Para que seja possível reproduzir lesões hepáticas em modelos animais, é preciso primeiramente considerar os diferentes estágios em que estas podem ocorrer. Experimentos que mimetizem condições mais tardias de lesão, como fibrose e cirrose, têm sido constantemente realizados a fim de estudar mais a fundo o carcinoma hepatocelular. Desse modo, a administração do agente tóxico, neste caso

o CCl_4 , ocorre durante semanas (CONSTANDINOU; HENDERSON; IREDALE, 2005; FUJII et al., 2010). Experimentos mais breves visam simular intoxicações agudas, que ocasionam os estágios mais iniciais da lesão hepática, como necrose centrilobular e esteatose (TAKAHASHI; FUKUSATO, 2017)). Nestes modelos, o desafio com o CCl_4 dura poucos dias e a eutanásia já é realizada na sequência. Em ambas, a administração do agente tóxico pode ser por via intravenosa, inalação ou gavagem, a depender do grau e da cronificação de lesão que se espera alcançar (SCHOLTEN et al., 2015; TAKAHASHI; FUKUSATO, 2017).

Há estudos reportando alterações gênicas expressivas em induções agudas (BULERA et al., 2001; JIANG et al., 2004) e efeitos nocivos mesmo a doses muito baixas, como 5–20 mg/kg diariamente ou então 40-80 mg/kg em dose única (KORSRUD; GRICE; MCLAUGHLAN, 1972). Essas evidências caracterizam a lesão hepática como um efeito crítico da exposição oral ao CCl_4 .

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como uma situação de desbalanço entre a geração de espécies reativas ou radicais livres e as defesas do organismo frente aos danos causados por tais espécies (ABBAS et al., 2010). Esses radicais são moléculas quimicamente reduzidas que contém elétrons desemparelhados na camada de valência. O número ímpar de elétrons torna essas espécies extremamente reativas, por conta das interações não-seletivas com outras moléculas do organismo na tentativa de estabilizar sua carga eletrônica. Existem diversas causas que podem levar à formação desses radicais, podendo ser elas exógenas (radiação ionizante, tabagismo, poluição e raios ultravioleta) ou então endógenas, decorrentes de processos biológicos normais do organismo (fosforilação oxidativa, processos inflamatórios, morte de micro-organismos e outras) (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Uma vez que um desses radicais é formado, o que ocorre é uma reação em cadeia, onde a perda de apenas um elétron aumenta a reatividade do radical, que passa a reagir com várias outras moléculas gerando uma série de radicais importantes no estresse oxidativo (Figura 2) e que têm implicações em diversas doenças. Diante disso, o organismo lança mão de enzimas cuja atividade catalítica tem o papel de remover elétrons das estruturas químicas dos radicais, a fim de torná-las moléculas não reativas. Exemplos são a catalase (CAT) e

a glutationaperoxidase (GPx), que dissociam o radical H_2O_2 , a superóxido dismutase (SOD) que age sobre o ânion superóxido, e a glutationa-S-transferase (GST) que catalisa reações de detoxificação por intermédio da glutationa reduzida (GSH), umas das principais biomoléculas da defesa antioxidante do organismo.

Não apenas radicais provenientes do oxigênio são formados e corroboram com a resposta de estresse oxidativo. Radicais associados ao nitrogênio também podem ser formados, como no caso do $\text{OONO}\cdot$ (peroxinitrito), que pode compor uma das etapas iniciais da peroxidação lipídica (LPO), resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados de membranas celulares. O resultado disso são alterações na permeabilidade, causando distúrbios no fluxo iônico, perda de seletividade, alterações no DNA, oxidação de ácidos graxos e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanas, colágeno e elastina, por exemplo) (MARTÍNEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009; WEIDINGER; KOZLOV, 2015).

Uma vez que o metabolismo e mecanismo de toxicidade do tetracloreto de carbono estão envolvidos na geração de radicais livres, a avaliação de parâmetros do estresse oxidativo se faz necessária, tanto para averiguar a lesão hepática induzida pelo modelo experimental, quanto para análise das respostas dos compostos a serem estudados, neste caso os polissacarídeos do pimentão e do tamarillo.

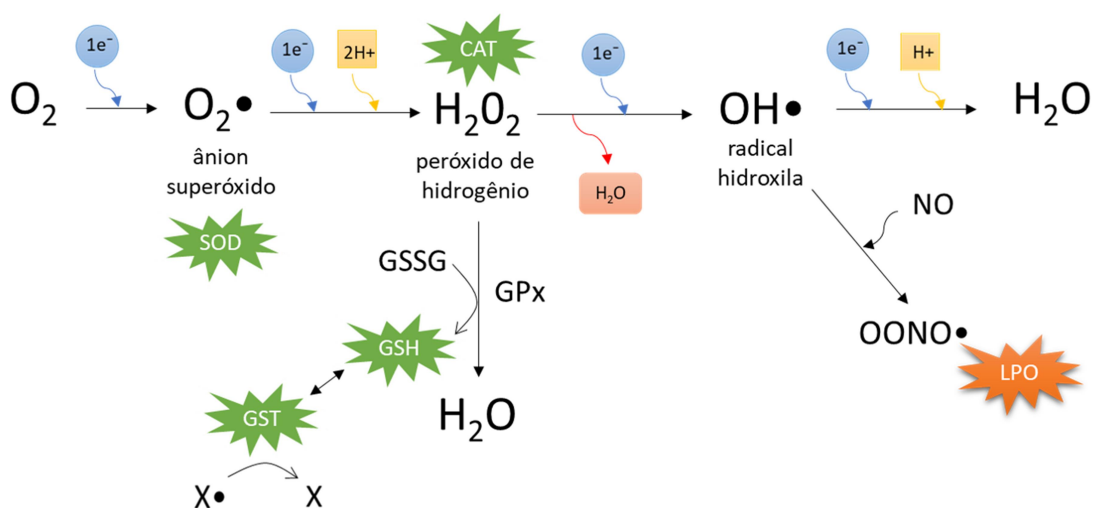


Figura 2: Radicais atuantes no estresse oxidativo e componentes do sistema antioxidante. (H^+ : íon hidrogênio, e^- : elétron, CAT: catalase, H_2O : água, SOD: superóxido dismutase, GSSG: glutionadissulfeto, GPx: glutationaperoxidase, GSH: glutationa reduzida, GST: glutationa-S-transferase, LPO: peroxidação lipídica, NO: óxido nítrico, $\text{OONO}\cdot$: peroxinitrito, O_2 : oxigênio)

molecular, O_2^\bullet : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, OH^\bullet : radical hidroxila, X: xenobiótico, X^\bullet : radical formado a partir do xenobiótico). FONTE: O autor (2018) baseado em CANTIN (2000).

2.5 INFLAMAÇÃO E DILI

A inflamação é uma resposta celular que também aparece quando uma lesão hepática ocorre. Aparece tanto nos estágios iniciais, quando a indução de lesão é aguda, porém quando persistente tem papel crucial na cronificação da lesão e a alteração irreversível do tecido hepático e suas funções fisiológicas normais (BIZZARO et al., 2018; DUFFIELD et al., 2005). Uma vez que há liberação de determinados mediadores como citocinas, interleucinas e mediadores pró-inflamatórios, acentua-se a diferenciação e proliferação das células hepáticas estelares (HSC), estimulando produção de matriz extracelular e colágeno do tipo 4, o que caracteriza a fibrose (FUJII et al., 2010; WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003). Outra célula hepática relacionada ao processo é a célula Kupffer (KC), os macrófagos residentes do fígado. Atua no potencial de regeneração hepático (PRITCHARD; APTE, 2015) e é responsável por funções importantes como a regulação das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos, proteínas e transportadores envolvidos em respostas de fase aguda, metabolismo de oxigênio e glicogenólise (BIZZARO et al., 2018; ROTH; GANEY, 2013; WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003). É ativada nos estágios iniciais da inflamação juntamente com plaquetas, leucócitos e hepatócitos (BAK et al., 2016). As KC ativadas culminam na formação de mais espécies reativas de oxigênio, proteases, citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (ROTH; GANEY, 2013; WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003), favorecendo o estresse oxidativo e também ativando as HSC. A figura 3 ilustra parte destes mecanismos.

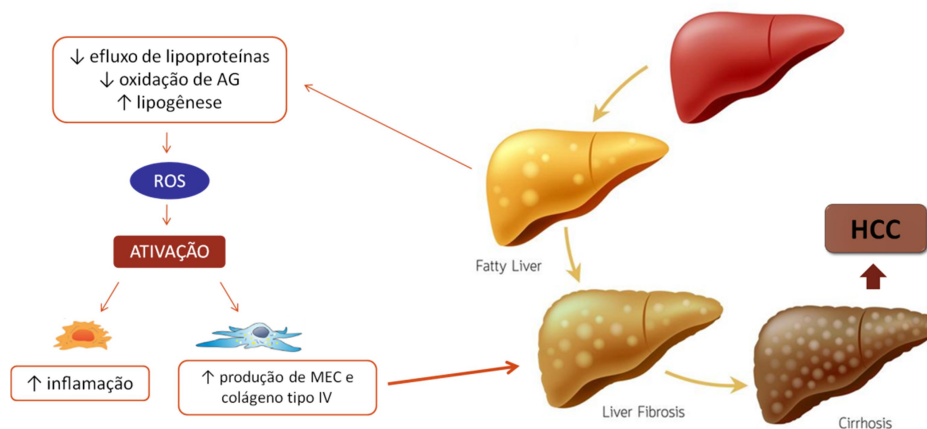


Figura 3: Células hepáticas e sua participação ativa no processo de cronificação de lesão hepática induzida por drogas. (AG: ácidos graxos, ROS: espécies reativas de oxigênio, MEC: matriz extracelular, HCC: carcinoma hepatocelular). FONTE: O autor (2018).

2.6 POLISSACARÍDEOS

2.6.1 *Solanum betaceum*

O tamarillo, fruto de onde é extraído um dos polissacarídeos utilizados nesse estudo, é da família Solenaceae, de origem tropical e comercialmente apresenta-se em três variedades: vermelho, alaranjado e amarelo (Figura 4). É rico principalmente em vitaminas B, C, E e minerais, fator importante na eficácia biológica de seus extratos (GARCÍA et al., 2016). Estudos prévios de colaboradores de nosso laboratório mostraram atividade anti-inflamatória e analgésica de polissacarídeos extraídos da poupa do tamarillo, contendo galactoarabinoglucuronoxilanae arabinogalactana, frente ao modelo de dor visceral induzido por formalina e ácido acético. O efeito antinociceptivo atribuído às frações isoladas sugere mecanismos anti-inflamatórios e serviu como um *screening* para investigação destes parâmetros. No entanto, não se conhece sua ação sobre o fígado, tampouco se seus compostos têm potencial hepaprotetor.

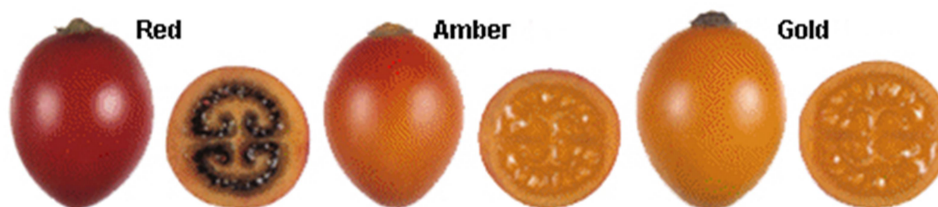


Figura 4: As três variações fenotípicas do *Solanum betaceum* que podem ser encontradas. Fonte: http://www.tamarillo.com/food_writers.

2.6.2 *Capsicum annuum*

O pimentão é um vegetal bastante conhecido na culinária mundial e é consumido com uma frequência considerável. Isso faz com que seja necessário saber mais sobre os nutrientes e potenciais biológicos dos alimentos consumidos ao redor do mundo. Apresenta-se em diferentes fenótipos (amarelo, verde e vermelho) (Figura 5), os quais possuem valores nutricionais similares. As atividades biológicas de seus polissacarídeos são pouco exploradas, mas estudos de nosso grupo de pesquisa demonstraram seus efeitos antineoplásicos por mediar resposta inflamatória e angiogênese (ADAMI et al., 2018). Assim como o tamarillo, o pimentão é rico em vitaminas A e E, além de outros antioxidantes (ascorbato e glutatona) (MATEOS et al., 2003). No entanto, não se conhece o potencial terapêutico ou nutracêutico desse vegetal em casos de hepatotoxicidade, objeto de estudo deste trabalho.

Nossa hipótese é que ambos os polissacarídeos, extraídos do pimentão e do tamarillo, possam exercer efeitos hepatoprotetores diante do modelo de estudo de toxicidade induzida pelo CCl_4 em camundongos.



Figura 5: As três variações fenotípicas do *Solanum betaceum* que podem ser encontradas. Fonte: <https://kookidee.nl/foodblog>.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Polissacarídeos

Os experimentos foram conduzidos com os polissacarídeos de *Capsicum annuum* e *Solanum betaceum* obtidos, caracterizados, extraídos e purificados pela equipe da Profa. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As caracterizações dos polissacarídeos foram previamente publicadas (DO NASCIMENTO et al., 2013, 2015, 2017).

3.2 Animais

Após experimentos piloto e de padronização, os camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso entre 30 e 35 g, tiveram resultados mais significativos no modelo proposto. Dessa forma, nesse experimento estes foram utilizados, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e em ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e legislações estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFPR, sob o protocolo 958.

3.3 Delineamento Experimental

Os camundongos permaneceram em ambientação por cinco dias, quando foram separados aleatoriamente em seis grupos com n=7 cada, conforme mostrado na tabela 1. A partir do dia 1, os animais foram pesados e tratados (via oral), uma vez ao dia, por sete dias consecutivos com os polissacarídeos (T 50 mg/kg ou P 100 mg/kg) ou água (NAIVE). No 6° e 7° dias houve o desafio com CCl₄ a 2% (via intraperitoneal, 0,17 ml por animal) para os grupos II, IV e VI, para indução de lesões hepáticas. Os demais receberam água destilada (H₂O_d) (via intraperitoneal, 0,17 ml por animal). Os grupos III e V, que receberam os polissacarídeos P100 e T50, respectivamente, não foram desafiados com CCl₄, para avaliar se os próprios polissacarídeos teriam algum efeito tóxico *per se*. As doses dos polissacarídeos foram escolhidas com base em dados prévios do nosso laboratório com os polissacarídeos em questão (ADAMI *et al.* 2018).

Tabela 1: Grupos definidos para o experimento e seus respectivos tratamentos.

	GRUPO	TRATAMENTO (via oral)	AGENTE TÓXICO OU VEÍCULO (via i.p.)
I	NAIVE	H ₂ O _d	0,17 ml H ₂ O _d
II	VEH	H ₂ O _d	0,17 ml CCl ₄ 2%
III	P100	P100	0,17 ml H ₂ O _d
IV	P100 + CCl ₄	P100	0,17 ml CCl ₄ 2%
V	T50	T50	0,17 ml H ₂ O _d
VI	T50 + CCl ₄	T50	0,17 ml CCl ₄ 2%

Legenda: VEH, veículo; P, polissacarídeos do pimentão; T, polissacarídeos do tamarillo; 50: 50 mg/kg; 100: 100 mg/kg; H₂O_d, água destilada.

No oitavo dia de experimento, os animais foram pesados e depois anestesiados com uma solução mista de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via i.p., com posterior coleta de materiais biológicos. O sangue foi colhido da veia cava abdominal para as análises da bioquímica plasmática e hemograma,

enquanto o fígado foi removido e devidamente armazenado para experimentos futuros de estresse oxidativo e resposta inflamatória. Rins, pulmão e baço foram extraídos para pesagem e cálculo do peso relativo (%). Após a abertura da cavidade torácica para retirar dos pulmões, se desfez a pressão negativa do tórax, levando os animais imediatamente a óbito. As informações sobre o tratamento e finalização do experimento estão compiladas na figura 6.

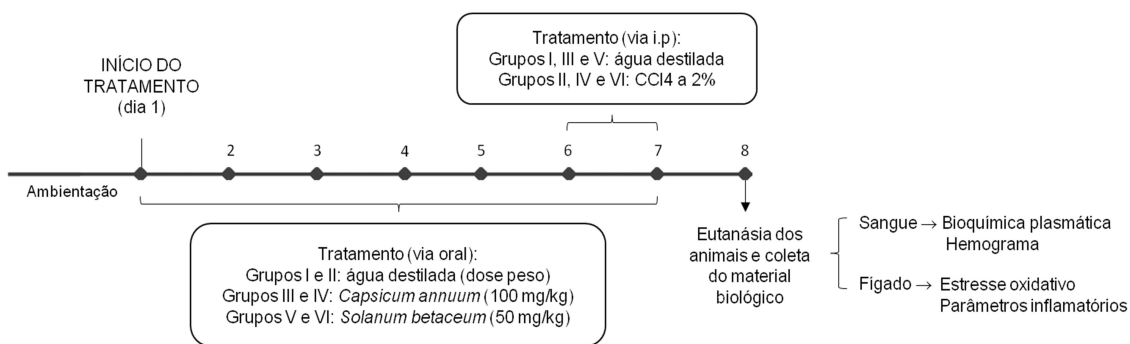


Figura 6: Delineamento experimental. FONTE: O autor (2018).

3.4 Bioquímica plasmática e hemograma

Após a eutanásia dos animais, o sangue foi enviado para o Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, onde foi feito o hemograma para análise de possíveis alterações nas séries branca e vermelha do sangue, além da mensuração de marcadores metabólicos e hepáticos no plasma, como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), glicose, albumina, globulina, proteína total, ureia e creatina.

3.5 Avaliação do estresse oxidativo hepático

3.5.1 Determinação da atividade oxidante *in vitro* pelo método DPPH

Os polissacarídeos do *Solanum betaceum* e *Capsicum annuum* tiveram seu potencial hepatoprotetor avaliado *in vitro* frente ao 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), um composto químico orgânico de moléculas de radicais livres estáveis, protocolo adaptado de (CHEN; WU; CHEN, 2004). As amostras de ambos os polissacarídeos, em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30, 100 e 1000 µg/ml) foram misturadas a

uma solução metanólica contendo o DPPH (10 µg/ml). O ácido ascórbico (50 µg/ml) e água destilada foram usados como controles positivos e negativos, respectivamente. A absorvância foi lida a 517 nm.

3.5.2 Homogeneização do tecido hepático

Logo após a eutanásia, o fígado de cada animal foi coletado, pesado e 0,3 g de tecido foram separados para a preparação do homogenato. Esse tecido foi colocado em tubos específicos para o homogeneizador (Minilys®) juntamente com 1000 µl de tampão fosfato de potássio (0,1 M - pH 6,5) e submetido à homogeneização por 50 segundos. O produto final foi dividido em duas alíquotas de aproximadamente 550 µl. Uma delas foi centrifugada a 9000xg por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi separado para outros ensaios do estresse oxidativo. O restante do fígado foi armazenado a -80°C para análises posteriores.

3.5.3 Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH)

A avaliação o nível de GSH hepática foi realizada a partir do protocolo descrito por Sedlak e Lindsay (1968), onde 100µl do homogenato (item 3.5.1) foram adicionados a 80 µl de ácido tricloroacético (ATC) e posteriormente submetidos à centrifugação a 7600xg, a 4°C por 15 minutos. Para leitura em espectrofotômetro, 20 µl do sobrenadante foram adicionados em microplaca de 96 poços, juntamente com 280 µl de Tris-HCl e 5 µl de solução-reação, feita com 3,89mg de 5,5-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzoico) (DTNB) em 1000 µl de metanol. A absorvância foi medida em comprimento de onda de 415 nm em leitor de microplacas e os resultados expressos em µg de GSH/g de tecido.

3.5.4 Ensaio da atividade enzimática da Catalase (CAT)

O ensaio cinético para quantificação da atividade da catalase, baseado na conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, segue o protocolo proposto por Aebi (1984), onde 5µL da diluição 1:10 (50 µL do homogenato para 450 µL de tampão fosfato de potássio(0,1 M - pH 6,5)foram colocados na microplaca de

96 poços, juntamente com 295 μL da solução-reação de peróxido de hidrogênio, composta de 47,4 ml de H_2O_d , 2,5 ml de tampão Tris-EDTA (pH 8) e 172,5 μL de H_2O_2 . A absorbância é medida a 240 nm em leitor de microplacas e os resultados expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.5 Ensaio da atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

O ensaio foi feito seguindo o método de GAO et al. (1998), baseado na habilidade da enzima de inibir a autoxidação do pirogalol, que quando ocorre gera íons superóxido. Nesse ensaio, 60 μL da diluição 1:10 (50 μL do homogenato para 450 μL de tampão fosfato de potássio (0,1 M - pH 6,5) foram colocados em um microtubo com 1327,5 μL de Tris-EDTA (50 μL do homogenato para 450 μL de tampão fosfato de potássio, pH 6,5). Em seguida foram adicionados 75 μL da solução de pirogalol (38 mg de pirogalol em 20 ml de H_2O_d). As amostras foram incubadas em lugar escuro por 30 minutos. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 37,5 μL de HCl 1N e 300 μL de cada amostra foram plaqueados. A absorbância foi medida a 440 nm e o resultado foi expresso em $\text{U SOD}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.6 Ensaio da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST)

Essa análise segue o protocolo proposto por Habig, Pabst e Jacoby (1974). Para este ensaio, uma diluição 1:80 é preparada (5 μL do sobrenadante para 395 μL de tampão fosfato de potássio (0,1 M - pH 6,5). Dessa solução, 100 μL são plaqueados e em seguida 200 μL da solução-reação, composta por tampão fosfato de potássio, 30,38 mg de CDNB em 2,5 ml de etanol, e 49,1 mg de GSH em 16 ml de tampão fosfato. A leitura da absorbância é feita a 340 nm em leitor de microplacas e os resultados expressos em $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.7 Mensuração da taxa de Peroxidação Lipídica (LPO)

O ensaio seguiu o protocolo proposto por (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991), onde 100 μL do sobrenadante (obtido por meio da centrifugação do

homogenato) foram adicionados a 100 μ L de metanol. A mistura foi centrifugada a 8000xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, 100 μ L desse segundo sobrenadante foram separados e adicionados a 900 μ L do reativo de FOX 2 (90 ml de solução metanólica para FOX 2 (composta por 98 mg de xilenol laranja, 51 mg de BHT e 900 ml metanol) e 10 ml da solução de sulfato ferroso de amônio 250 μ M) e então incubados por 30 minutos. Então, 300 μ L de cada amostra foram plaqueados em triplicata e a leitura da absorbância foi feita a 560 nm. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos por mg de proteína ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ proteína⁻¹).

3.5.8 Quantificação de Proteínas Totais

Este ensaio segue o protocolo descrito por Bradford(1976), onde 10 μ L de amostra retirados da diluição 1:10 foram plaqueados em triplicada. Em seguida foram adicionados 250 μ L da solução de Bradford, composto de reagente de Bradford e tampão fosfato de potássio (0,1 M - pH 6,5). A leitura da absorbância foi feita em um comprimento de onda de 595 nm. A quantidade de proteína no tecido foi utilizada para normalizar alguns parâmetros acima descritos.

3.6 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

3.6.1 Homoginização do tecido hepático

Um outro protocolo foi utilizado para a preparação do tecido hepático para os ensaios de parâmetros inflamatórios, onde 0,1 g do tecido hepático previamente armazenado foi pesado e homogeneizado com 2 ml de salina TritonX-100 a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 10.000xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio das enzimas mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase enquanto o *pellet* foi ressuspenso posteriormente com PBS (pH 7,2) para a dosagem do índice indireto de nitrito.

3.6.2 Atividade enzimática da Mieloperoxidase (MPO)

Do sobrenadante obtido a partir do homogenato (item 3.6.1), 30 μL foram plaqueados com 200 μL de solução peróxido. A reação foi iniciada com 20 μL da solução de TMB 18,4 mM em dimetilformamida, a mistura foi incubada por 3 min em temperatura ambiente e após este período a reação foi parada com a adição de 30 μL de acetato de sódio. A leitura da absorbância foi feita a 620 nm, com resultados expressos em U MPO.g tecido⁻¹.

3.6.3 Atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG)

O ensaio iniciou transferindo-se 100 μL do sobrenadante obtido no item 3.6.1 para a microplaca de 96 poços, na qual posteriormente foram adicionados 100 μL da solução de NAG 2,24 mM em tampão citrato/fosfato (39 mM - pH 4,5). A mistura foi incubada por 60 minutos em estufa a 37°C e em seguida a reação foi interrompida com a adição de 100 μL de tampão glicina (220 mM - pH 10,4). A leitura da absorbância foi feita a 405 nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol.g tecido}^{-1}$.

3.6.4 Medida do índice indireto da produção de NO (nitrito)

Os pellets obtidos com a centrifugação do homogenato (item 3.6.1) foram ressuspendidos em PBS (pH 7,4) e centrifugados a 9000xg por 20 minutos a 4°C. Este novo sobrenadante foi separado para análise dos níveis de nitrito, onde 100 μL da amostra foram adicionados à placa de 96 poços juntamente com 100 μL da solução-reação (100mg de sulfanilamida em 10 ml de ácido fosfórico 2,5% e 100 mg de Need - naftiletlenodiamina) em 10 ml de H₂O_d). A leitura foi feita a 540 nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol Nitrito.g tecido}^{-1}$.

3.7 Análise Estatística

Os dados foram representados como a média \pm erro padrão das médias (SEM) de cada grupo. As diferenças entre as médias foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para Windows, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPas Software*, San Diego, EUA). Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioquímica plasmática

O grupo veículo, que foi desafiado com CCl_4 e não recebeu nenhum tratamento teve índices muito elevados das transaminases ALT (Figura 7A) e AST (Figura 7B) quando comparado ao grupo NAIVE, sendo um aumento de 27 e 13 vezes, respectivamente. Estas enzimas são os principais biomarcadores de lesão hepática presentes no plasma (PEIXOTO et al., 2006), cuja liberação decorre de lise celular ou aumento de permeabilidade da membrana plasmática de hepatócitos (BABCOOK et al., 1981). Já se sabe que estas são consequências da toxicidade ocasionada pelo CCl_4 (FAUTREL et al., 2014; FUJII et al., 2010; OZER et al., 2008), caracterizando então a efetividade dessa hepatotoxina na indução da lesão hepática. Estes dados plasmáticos estão de acordo com resultados previamente publicados por nosso grupo (CORRÊA-FERREIRA et al., 2017). Ambos os tratamentos com polissacarídeos provocaram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05$) desses marcadores. No grupo desafiado com CCl_4 e tratado com o P100 houve redução de 71% no nível de ALT e de 57% no nível de AST, enquanto que no grupo desafiado com CCl_4 e tratado com o T50 os níveis reduziram 60% para ALT e 67% para AST, quando comparados ao grupo veículo (Figura 7A, B), sugerindo uma provável atividade hepatoprotetora dos polissacarídeos do *Solanum betaceum* e *Capsicum annum*. A atividade hepatoprotetora de plantas medicinais e produtos naturais vêm sendo bastante revisada e documentada na literatura, sendo estudado seu papel protetor frente ao tetracloreto de carbono e outros agentes hepatotóxico como paracetamol e lipopolissacarídeo (LPS) (AHMED GUMAA; HASSAN; KHALIFA, 2017; CORDERO-PÉREZ et al., 2013; FARGHALI; CANOVÁ; ZAKHARI, 2015; HASSAN et al., 2009; MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2014; OLALEYE; ROCHA, 2008). Um deles é a inulina extraída da *Artemisia*, em trabalho de nosso grupo (CORRÊA-FERREIRA et al., 2017). No entanto, não há relatos prévios desta atividade nos polissacarídeos do pimentão e do tamarillo, aqui estudados.

Nos grupos IV e VI, em que não houve administração do CCl_4 , os níveis de ambos os marcadores se mantiveram muito semelhantes ao do grupo NAIVE, o que demonstra que os polissacarídeos isoladamente não exercem toxicidade hepática, pelo menos tendo os níveis plasmáticos dessas enzimas como parâmetro.

No que diz respeito aos demais biomarcadores, a fosfatase alcalina (Figura 7C), albumina (Figura 7E), proteína total (Figura 7G) e uréia (Figura 7I) permaneceram estatisticamente semelhantes para todos os grupos. A glicose (7D) apresentou-se reduzida em todos os grupos que receberam o CCl₄ (veículo e tratados) em relação ao grupo NAIVE. Isso demonstra que o decréscimo é relacionado à hepatotoxina e não aos tratamentos com polissacarídeos. A explicação pode estar relacionada ao metabolismo do glicogênio, uma vez que há estudos demonstrando que o tetracloreto de carbono promove diminuição dos níveis de glicose relacionada a baixos níveis de insulina (HARTMANN; STÜMPEL, 1992), quadro que é observado na clínica também em pacientes cirróticos (CARR; CORRENTI, 2016; KRÄHENBÜHL; REICHEN, 1993).

Quanto à globulina, houve uma pequena redução em ambos os grupos que receberam tratamento e o CCl₄, enquanto que para os grupos que receberam apenas polissacarídeo os níveis mantiveram-se estatisticamente semelhantes ao NAIVE (Figura 7F). Alterações nos níveis de globulina causadas pelo tetracloreto de carbono já foram descritas (ABOU-ZAID, 2007), mas ainda não há estudos publicados relacionando estes marcadores aos polissacarídeos aqui estudados. A creatinina (Figura 7H) teve redução significativa apenas no grupo T50 + CCl₄ quando comparado ao grupo veículo. Para os demais não houve diferença expressiva estatisticamente, inclusive quando comparados veículo e NAIVE. A discreta redução para o grupo tratado com o tamarillo (*Solanum betaceum*) pode ser um indicativo de uma boa relação entre o potencial nutracêutico do fruto e uma boa função renal (PRASANTH, 2017), uma vez que a creatinina é um marcador muito usado para caracterização de lesões renais e níveis altos estão associados à lesão e toxicidade (GOWDA et al., 2010).

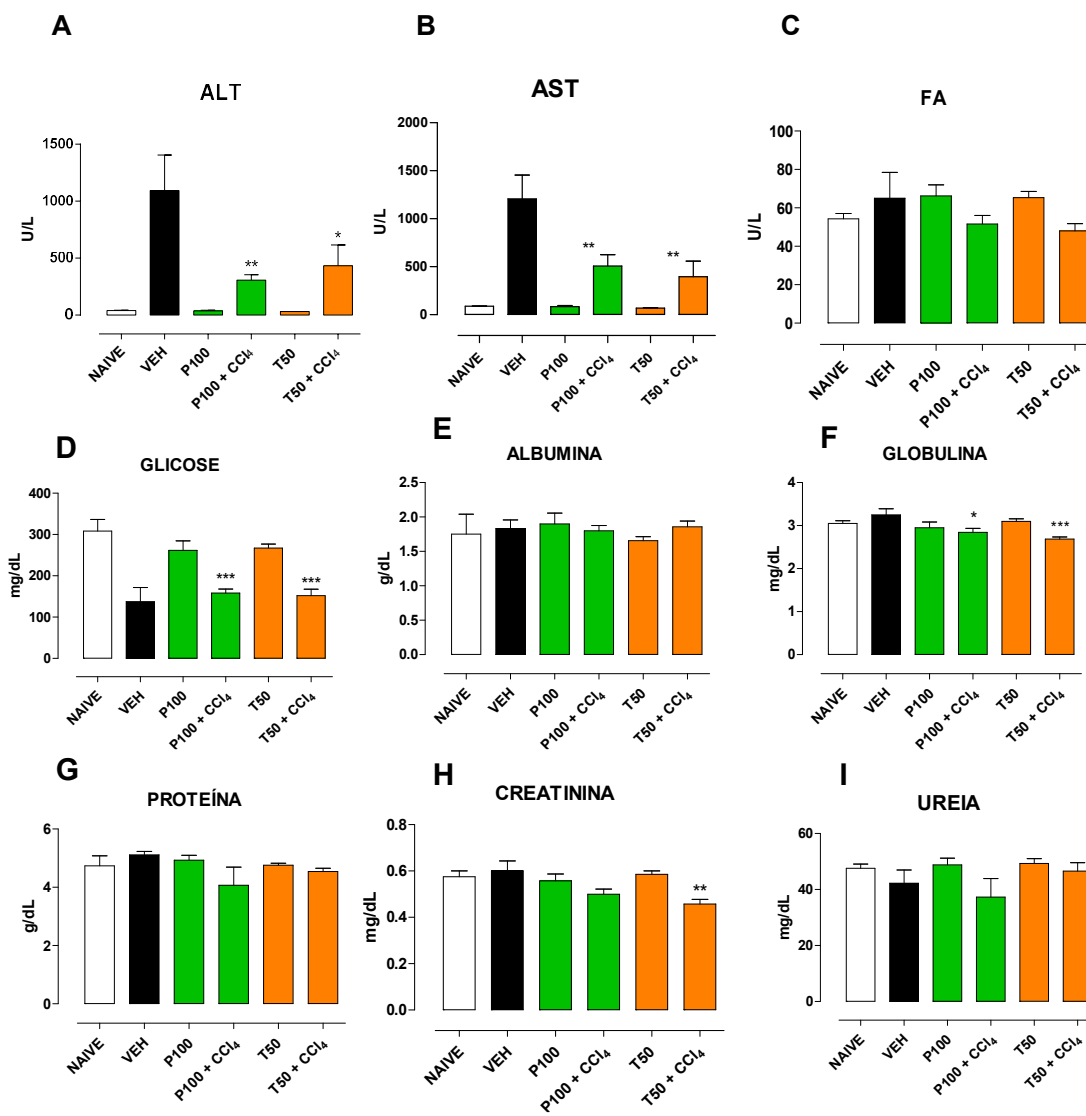


Figura 7. Níveis plasmáticos dos marcadores de lesão hepática ALT (A), AST (B) e FA (C), e demais parâmetros como glicose (D), albumina (E), globulina (F), proteína total (G), creatinina (H) e uréia (I) de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos de pimentão (P100) ou tamarillo (T50) e desafiados ou não com CCl₄. Os dados são apresentados como média \pm SEM, comparados por ANOVA e teste de Bonferroni. Símbolo: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo veículo (VEH).

4.2 Hemograma

Analisando a série vermelha do sangue, nenhuma alteração expressiva foi observada, exceto nos dados referentes ao volume médio de plaquetas (MPV), em relação ao grupo NAIVE, sendo que os grupos tratados tiveram uma discreta

redução. Os dados estão listados na tabela 2. Ressalta-se que os parâmetros hematológicos, mesmo com algumas variações, estão dentro da normalidade para a espécie (SANTOS et al., 2016).

Tabela 2: Hemograma de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos de pimentão (P100) ou tamarillo (T50) e desafiados com CCl_4 .

Parâmetros	NAIVE	VEH	P100	P100 + CCl_4	T50	T50 + CCl_4
RBC	9,6 ± 0,36	9,14 ± 0,27	9,27 ± 0,52	9,05 ± 0,47	9,28 ± 0,33	9,54 ± 0,10
HBG	13,1 ± 0,41	12,81 ± 0,34	12,73 ± 0,78	12,23 ± 0,69	12,51 ± 0,51	12,84 ± 0,11
HCT	42,9 ± 1,50	96,71 ± 53,22	42,13 ± 2,46	41,11 ± 2,12	41,19 ± 1,57	42,26 ± 0,49
MCV	34,78 ± 10,06	47,51 ± 1,13	45,44 ± 0,39	45,5 ± 0,64	44,4 ± 0,43	44,41 ± 0,54
MCH	13,63 ± 0,14	14,04 ± 0,18	13,64 ± 0,17	13,46 ± 0,15	13,41 ± 0,12	13,41 ± 0,20
MCHC	30,47 ± 0,16	29,53 ± 0,37	30,13 ± 0,26	29,64 ± 0,26	30,3 ± 0,26	30,36 ± 0,22
RDW	14,95 ± 0,64	15,99 ± 0,49	14,16 ± 0,51	14,94 ± 0,43	14,57 ± 0,53	14,01 ± 0,52
PLT	256 ± 61,57	385 ± 50,79	285,6 ± 50	447,6 ± 58,31	376 ± 34,72	356,6 ± 9,07
MPV	6,35 ± 0,33	5,91 ± 0,11	5,71 ± 0,04 **	5,69 ± 0,04 **	5,63 ± 0,04 **	5,77 ± 0,06 *
PDW	15,1 ± 0,11	14,96 ± 0,09	14,87 ± 0,07	14,8 ± 0,05	14,79 ± 0,06	14,8 ± 0,08
PCT	0,16 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01

Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 4-7/grupo) e foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. Símbolo: * p<0,05 em relação ao grupo NAIVE. Legenda: RBC (glóbulos vermelhos); BHG (hemoglobina); HCT (hematócrito); MCV (volume corpuscular médio); MCH (hemoglobina corpuscular média); MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média); RDW (amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos); PLT (plaquetas); MPV (volume médio de plaquetas); PDW (amplitude de variação do tamanho das plaquetas); PCT (plaquetócrito).

Na linhagem branca foi observado aumento na quantidade total de linfócitos e leucócitos (74% e 31%, respectivamente, p<0.05) em animais tratados com o tamarillo (*Solanum betaceum*) e desafiados com o tetracloreto de carbono (Figura 8A e 8B), em comparação com o grupo veículo. Este resultado foi inesperado e direcionou as análises seguintes para a avaliação dos parâmetros inflamatórios. Quanto aos monócitos (Figura 8C) e granulócitos (Figura 8D), não houve variação estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos. Não há estudos publicados na literatura correlacionando os polissacarídeos do tamarillo com uma resposta pró-inflamatória ou atividade direta nas células em questão. Provavelmente, essa elevação nos valores tenha ocorrido por conta de uma combinação do CCl_4 com o T50, pois esse aumento não ocorreu no grupo tratado apenas com T50. O P100 não

provocou nenhuma alteração nestas células, em concordância com artigo prévio do nosso laboratório, que já reportou este mesmo resultado (ADAMI et al., 2018).

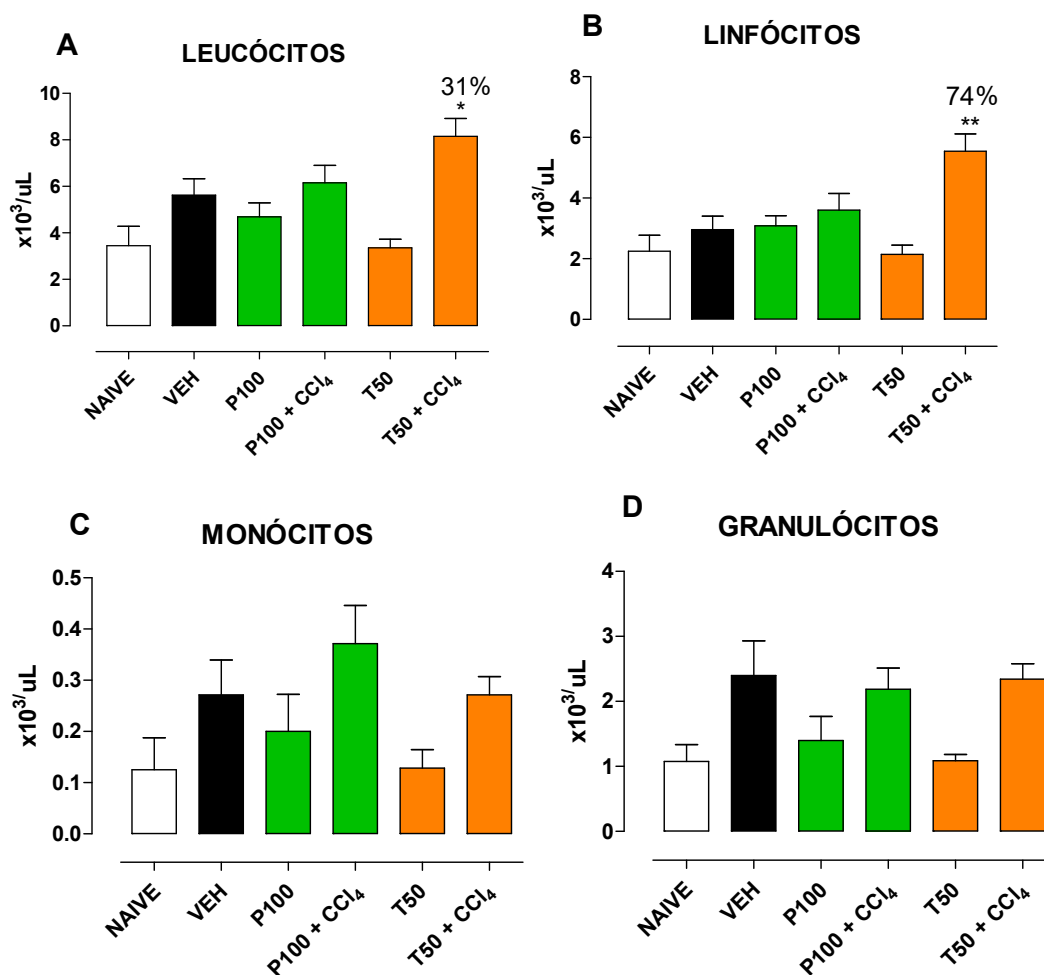


Figura 8. Quantidade total de leucócitos (A), linfócitos (B), monócitos (C) e granulócitos (D) do hemograma de camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos de pimentão (P100) ou tamarillo (T50) e desafiados com CCl₄. Os dados são apresentados como média \pm SEM, comparados por ANOVA e teste de Bonferroni. Símbolo: * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (VEH).

4.3 Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo

Os polissacarídeos do tamarillo não apresentaram nenhuma atividade antioxidante *in vitro* (Figura 9A), enquanto os polissacarídeos do pimentão apresentaram discreta atividade antioxidante apenas na maior concentração (Figura 9B), que foi pouco expressiva ao se comparar com a atividade antioxidante do ácido

ascórbico (AA, controle positivo). Com estes resultados fica claro que os polissacarídeos em questão não apresentam capacidade *per se* de eliminar radicais reativos.

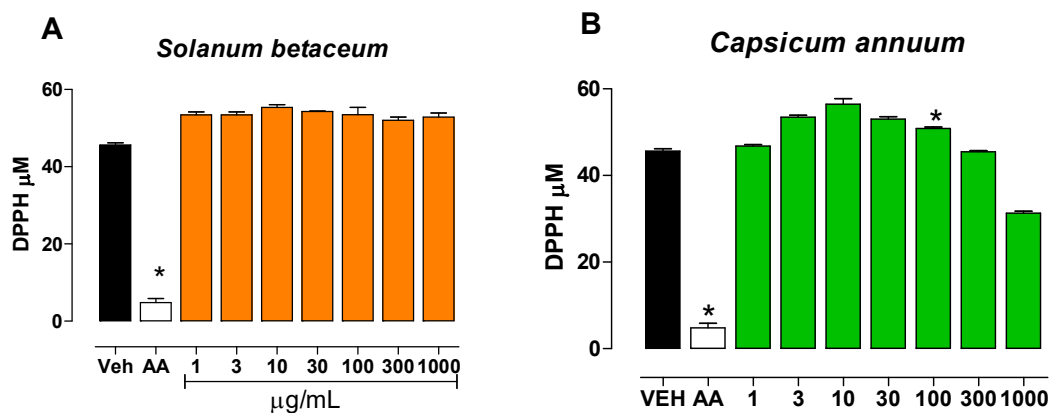


Figura 9. Ensaio *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante dos polissacarídeos *Solanum betaceum* (A) e *Capsicum annuum* (B) frente ao radical livre DPPH. Dados mostrados como média \pm erro padrão da média de triplicata. Dados comparados por ANOVA e *post-test de Bonferroni*. * $p < 0,05$ em comparação com VEH.

Inúmeros estudos têm sido publicados na literatura correlacionando produtos naturais e seu potencial antioxidante *in vivo* (AHMED GUMAA; HASSAN; KHALIFA, 2017; ARTICLE, 2011; CORDERO-PÉREZ et al., 2013; FARGHALI; CANOVÁ; ZAKHARI, 2015; HASSAN et al., 2009; MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2014), tanto por diminuir a peroxidação lipídica quanto por aumentar os níveis das enzimas que constituem o sistema antioxidante endógeno. A taxa de peroxidação lipídica (LPO) não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, embora uma elevação nos grupos que receberam CCl_4 , especialmente o VEH e T50 + CCl_4 , esteja evidente (Figura 10A). No ensaio de mensuração de proteínas do homogenato hepático (Figura 10B), foi observado que o grupo VEH, que recebeu a hepatotoxina CCl_4 , apresentou redução da quantidade de proteínas, que foi normalizada pelos tratamentos com os polissacarídeos (Figura 10B). Estes dados vão de encontro aos mostrados na Figura 7A-B, na qual os polissacarídeos protegeram a saída de enzimas, que são proteínas, dos hepatócitos para o plasma. Portanto, preservando proteínas no tecido hepático, o que justifica as proteínas mais elevadas nos grupos tratados com os polissacarídeos (Figura 10B).

A atividade hepática de GST (Figura 10C) não apresentou diferença estatística entre os grupos, em concordância com dados prévios em camundongos com tumor e tratados com P100 (ADAMI et al., 2018). Os níveis de GSH (Figura 10E) e a atividade de SOD (Figura 10F) também não apresentarem variações significativas estatisticamente embora uma grande variação entre os grupos tenha ocorrido nestes parâmetros, com elevação de ambos no grupo VEH.

Os dados referentes ao estresse oxidativo desse estudo não corroboram com a maioria dos artigos encontrados na literatura com relação ao modelo de hepatotoxicidade proposto, uma vez que os dados apresentados geralmente apresentam alteração de parâmetros de estresse oxidativo, com aumento ou redução da atividade das enzimas do sistema antioxidante ou redução dos níveis de GSH (JIA et al., 2018; MEKJARUSKUL; FANGKRATHOK; SRIPANIDKULCHAI, 2015; OLATOSIN; AKINDUKO; UCHE, 2014; TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007; ZHAO et al., 2017). Entretanto, os polissacarídeos em questão têm muitos aspectos relacionados aos seus mecanismos de ação que permanecem desconhecidos. Do *Solanum betaceum* e do *Capsicum annuum* há poucos registros sobre atividade hepatoprotetora, especialmente frente ao tetracloreto de carbono. Pode ser que haja um potencial hepatoprotetor, como visto em relação aos níveis dos marcadores bioquímicos (Figura 10A) e preservação de proteínas hepáticas, mas a via do estresse oxidativo não parece estar envolvida em tais efeitos. Além disso, é possível que a resposta desses polissacarídeos tenha um caráter tóxico também. Por se tratar de moléculas muito grandes e complexas, é possível que pequenos constituintes dessas estruturas tenham respostas diferentes para determinadas condições experimentais. Existem estudos apontando potenciais tóxicos e até mesmo mutagênicos de diferentes extratos de plantas (HASEEB et al., 2018; JEANMONOD; REBECCA; SUZUKI, 2018; VELUSAMI et al., 2013).

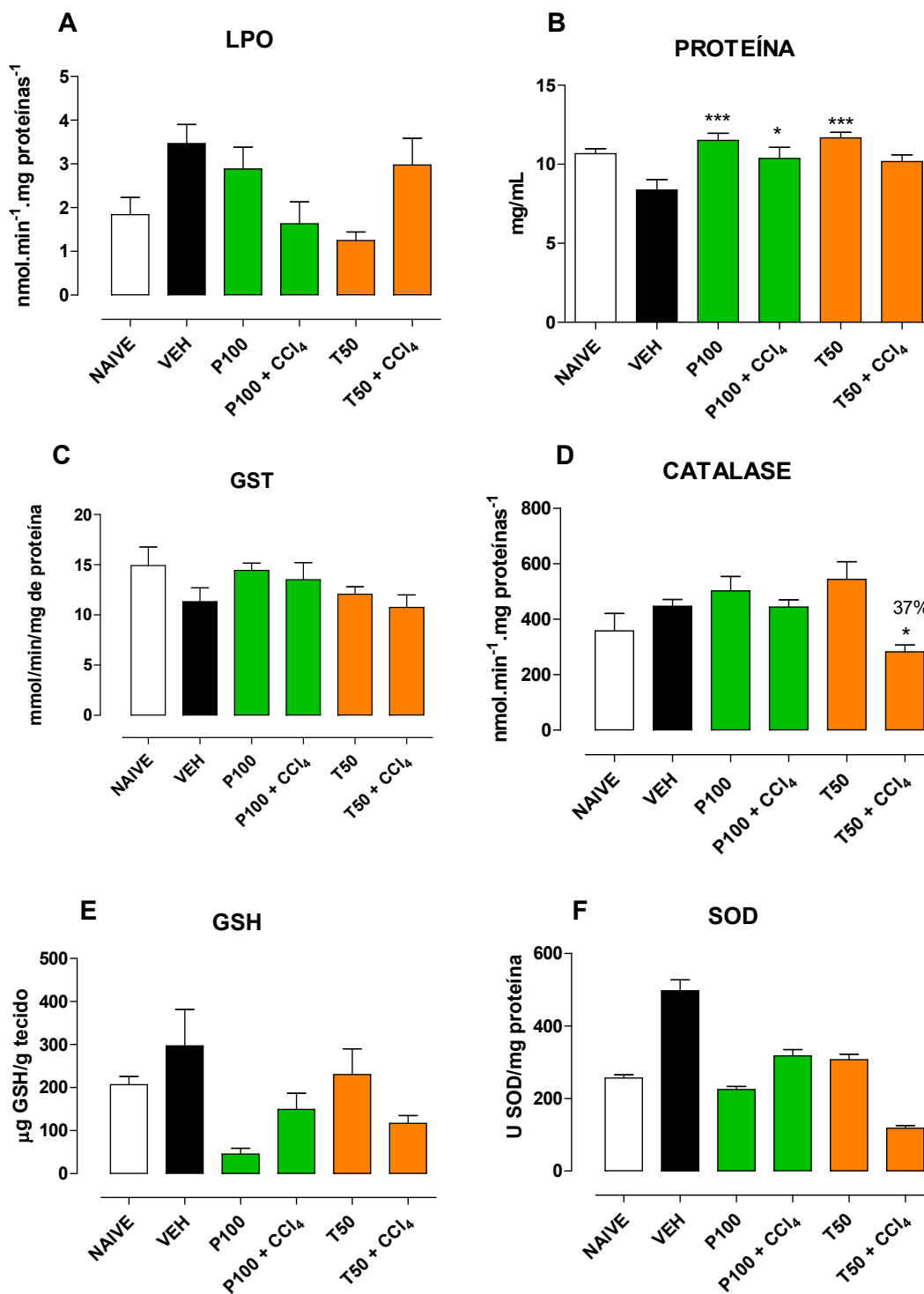


Figura 10. Parâmetros de estresse oxidativo avaliados em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos de pimentão (P100) ou tamarillo (T50) e desafiados com CCl₄: (A) LPO, (B) Proteína, (C) GST, (D) Catalase, (E) GSH e (F) SOD. Os dados são apresentados como média \pm SEM, comparados por ANOVA e teste de Bonferroni. Símbolo: * $p < 0,05$ em relação ao grupo VEH.

4.4 Parâmetros inflamatórios

Analisando os parâmetros relacionados à inflamação, os níveis da atividade enzimática da N-acetilglucosaminidase (NAG) permaneceram semelhantes para todos os grupos (Figura 11A). A mieloperoxidase (MPO), embora 50% mais elevada no grupo VEH do que no grupo NAIVE, não atingiu diferença estatística na comparação destes grupos, mas houve diferença quando comparados o grupo veículo e os dois grupos que receberam os polissacarídeos e que não foram desafiados com o CCl₄ (Figura 11B). Estes dados indicam que ambos os polissacarídeos *per se* não alteram a presença de neutrófilos no tecido hepático, pois os valores de MPO ficaram iguais ao do grupo NAIVE. No entanto, diante do desafio com o CCl₄ esta resposta não foi mantida, e a MPO apresentou-se mais elevada, similar ao grupo VEH, que recebeu CCl₄. Em relação aos níveis de nitrito, houve apenas diferença estatística do grupo P100 + CCl₄ em relação ao grupo veículo (Figura 11C).

Outros parâmetros inflamatórios podem indicar o grau de lesão hepática associada à inflamação, bem como os efeitos pró- ou antiinflamatórios dos polissacarídeos estudados. A presença de células imunes e relacionadas à resposta inflamatória desencadeia a liberação de uma série de citocinas, as quais não foram mensuradas nesse trabalho. Futuras investigações são necessárias nesse aspecto, uma vez que já se sabe que a supressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e NF- κ B é um mecanismo muito encontrado na atividade biológica de polissacarídeos (GAN et al., 2018; JAIN et al., 2016; KARUNAWEERA et al., 2015), inclusive frente à toxicidade hepática induzida pelo tetracloreto de carbono (GAN et al., 2018; KRITHIKA; JYOTHILAKSHMI; VERMA, 2014; LEE et al., 2014; SHU et al., 2016). Estudo prévio apontou atividade antitumoral do P100 através de dois mecanismos: modulação do nível de IL-6 e de VEGF no tecido tumoral (ADAMI et al., 2018). Portanto, a mensuração de citocinas seria interessante para verificar se diante do modelo de hepatotoxicidade que utilizamos, a resposta sobre a inflamação se mantém.

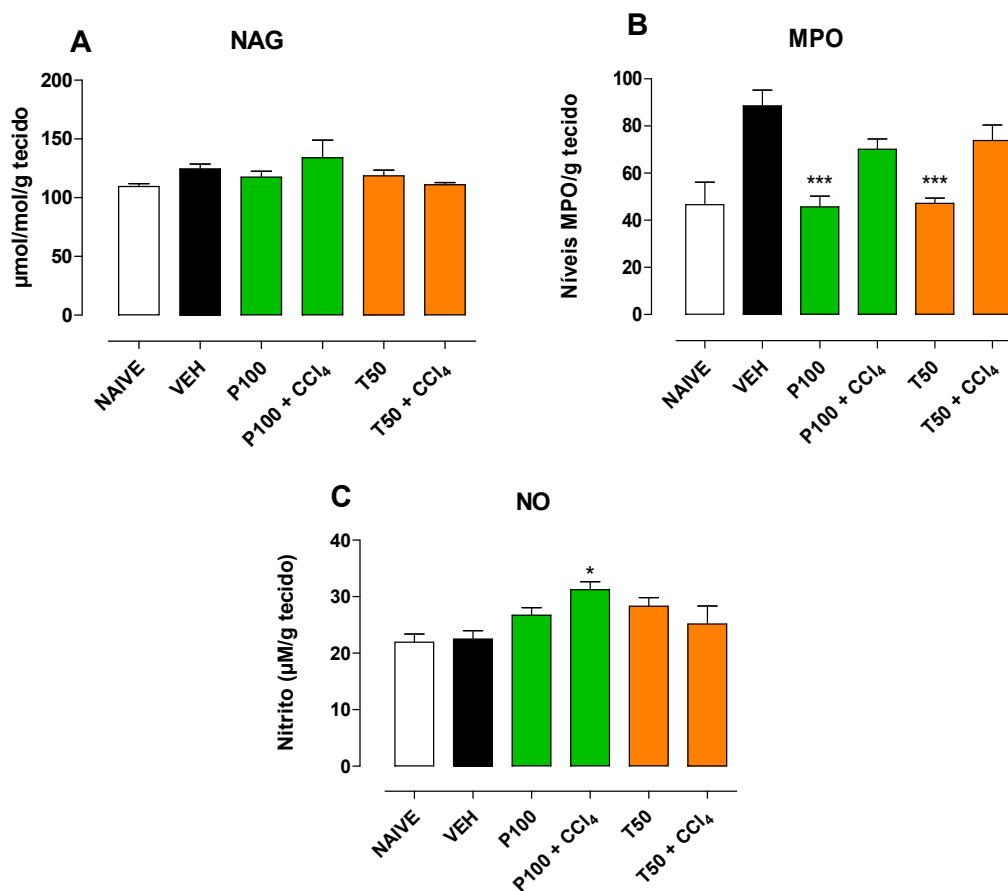


Figura 11. Valores referentes aos parâmetros inflamatórios NAG (A), MPO (B) e NO (C) avaliados em camundongos submetidos a tratamento com polissacarídeos de pimentão (P100) ou tamarillo (T50) e desafiados com CCl₄. Os dados são apresentados como média \pm SEM, comparados por ANOVA e teste de Bonferroni. Símbolo: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo VEH

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante de todos os resultados supracitados, foi possível observar que houve efetividade do modelo de hepatotoxicidade proposto, em especial confirmado pela elevação de marcadores plasmáticos de lesão hepática e redução de proteínas no fígado. Os polissacarídeos do pimentão e do tamarillo reduziram a variação destes parâmetros. Em contrapartida, os polissacarídeos não apresentaram efeitos antioxidantes *in vitro* e *in vivo*. Parece que os parâmetros inflamatórios têm uma participação mais efetiva na ação dos polissacarídeos estudados, tanto pelos resultados obtidos do hemograma quanto pelos parâmetros inflamatórios, mas outros parâmetros inflamatórios deveriam ser analisados para confirmar esta

hipótese. Por fim, novos estudos serão necessários para avaliar mais profundamente o potencial hepatoprotetor do *Solanum betaceum* e do *Capsicum annuum* e elucidar quais vias estão envolvidas neste processo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A K.; FAUSTO, N; KUMAR, V.; COTRAN, R S.; ASTER, J C.; ROBBINS, S L.: Respostas celulares ao estresse e ás agressões tóxicas: adaptação, lesão e morte. **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. cap 2, p. 48-52.

ABOU-ZAID, D. F. A.Repair of carbon tetrachloride-induced rat liver injury byGinger extract (*zingiberofficinale*).**The Egyptian Society of Experimental Biology**, 3: 211 – 217, 2007.

ADAMI, E. R.; CORSO, C. R.; TURIN-OLIVEIRA, N. M.; GALINDO, C. M.; MILANI, L.; STIPP, M. C.; DO NASCIMENTO, G. E.; DA SILVA, L. M.; DE ANDRADE, S. F.; DITTRICH, R. L.; KLASSEN, G.; RAMOS, E. A. S.; CORDEIRO, L. M. C.; ACCO, A. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from Green sweetpepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells *in vivo* and *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**. 201:280-292, 2018.

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AHMAD, J. Epidemiology and Genetic Risk Factors of Drug Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, 2016.

AHMED GUMAA, S.; HASSAN, E. M.; KHALIFA, D. M. Hepatoprotective Effect of Aqueous Extracts of Some Medicinal Plant Mixtures on CCl₄-Induced Liver Toxicity. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Ver. I**, v. 12, n. 1, p. 43–52, 2017.

ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**. p. 1–20, 2016.

ANDRADE, R. J.; ORTEGA-ALONSO, A.; LUCENA, M. I. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology “ Drug-Induced Liver Injury Clinical Consortia: a global research response for a worldwide health challenge ”. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 589–593, 2016.

BAK, J. et al. Oligonol Ameliorates CCl₄-Induced Liver Injury in Rats via the NF-Kappa B and MAPK Signaling Pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

BELL, L. N.; CHALASANI, N. Epidemiology of idiosyncratic drug-induced liver injury. **Seminars in Liver Disease**, v. 29, n. 4, p. 337–347, 2009.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 302, n. 1–2, p. 215–224, 2007.

BIZZARO, D. et al. Sex-dependent differences in inflammatory responses during

liver regeneration in a murine model of acute liver injury. **Clinical Science**, v. 132, n. 2, p. 255–272, 2018.

BLACK, M. Acetaminophen hepatotoxicity. **Annual review of medicine**, v. 35, n. 1, p. 577–93, 1984.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BULERA, S. J. et al. RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. **Hepatology**, v. 33, n. 5, p. 1239–1258, 2001.

BUXTON, I. L. O.; BENET, L. Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre. Artmed, 2012. cap 2, p. 17-40.

CANTIN, A. M. Cellular Response to Cigarette Smoke and Oxidants. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v.7, p. 368–375, 2010.

CARR, R. M.; CORRENTI, J. Insulin resistance in clinical and experimental alcoholic liver disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1353, n. 1, p. 1–20, 2016.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of different treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. **Food Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 479–484, 2004.

CONSTANDINOU, C.; HENDERSON, N.; IREDALE, J. P. Modeling Liver Fibrosis in Rodents. **Fibrosis Research**, v. 117, p. 237–250, 2005.

CORDERO-PÉREZ, P.; TORRES-GONZÁLEZ, L.; AGUIRRE-GARZA, M.; CARLOS CAMARA-LEMARROY, C.; GUZMÁN-DE LA GARZA, F.; ALARCÓN-GALVÁN, G.; HOMERO ZAPATA-CHAVIRA, H.; SOTELO-GALLEGOS, M. J.; TORRES-ESQUIVEL, C. N.; SÁNCHEZ-FRESNO, E.; CANTÚ-SEPÚLVEDA, D.; GONZÁLEZ-SALDIVAR, G.; BERNAL-RAMIREZ, J.; MUÑOZ-ESPINOSA, L. E.. Hepatoprotective effect of commercial herbal extracts on carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. **Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 3, p. 150, 2013.

CORRÊA-FERREIRA, M. L. et al. Inulin-type fructan and infusion of *Artemisia vulgaris* protect the liver against carbon tetrachloride-induced liver injury. **Phytomedicine**, v. 24, p. 68–76, 2017.

DA SILVA, A. I. C. P. **Suscetibilidade genética da hepatite tóxica medicamentosa idiossincrática**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, p. 1-64, 2013.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**.v. 2, n. December, p. 1–13, 2014.

DO NASCIMENTO, G. E.; HAMM, L. A.; CRISTIANE H. BAGGIO, C. H.; WERNER., M. F. P.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of a galactoarabinoglucuronoxylan from tamarillo (*Solanumbetaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. **FoodChemistry**, v. 141, n. 1, p. 510–516, 2013.

DO NASCIMENTO, G. E. **Caracterização da estrutura química e avaliação da atividade antinociceptiva de polissacarídeos extraídos da polpa de *Solanum betaceum***. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Departamento de Ciências Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, p. 1-104, 2013a.

DO NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C. R.; WERNER., M. F. P.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanumbetaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 300–306, 2015.

DUFFIELD, J. S. et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 1, p. 56–65, 2005.

FARGHALI, H.; CANOVÁ, N. K.; ZAKHARI, S. Hepatoprotective properties of extensively studied medicinal plant active constituents: Possible common mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 6, p. 781–791, 2015.

FAUTREL, A. et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. **Laboratory Investigation**, 2014.

FUJII, T. et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. **BMC Gastroenterology**, v. 10, 2010.

GAN, F. et al. Lycium barbarum polysaccharides improve CCl₄-induced liver fibrosis, inflammatory response and TLRs/NF-κB signaling pathway expression in wistar rats. **Life Sciences**, v. 192, n. November 2017, p. 205–212, 2018.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

GOEPTAR, A. R.; SCHEERENS, H.; VERMEULEN, N. P. E. Oxygen and Xenobiotic Reductase Activities of Cytochrome-P450. **Crit Rev Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 25–65, 1995.

GOWDA, S., DESAI, P. B., KULKARNI, S. S., HULL, V. V., MATH, A. A., VERNEKAR, S. N. Markers of renal function tests. **North American journal of medical sciences**, 2(4), 170-3, 2010.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALL, M. C. Carbon tetrachlorid for the removal of parasitic worms, especially hookworms. **Journal of Agricultural Research** 21. 157-175, 1921.

HASSAN, A. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts having hepatoprotective effects. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 1, p. 20–23, 2009.

HASEEB, M. T. et al. Acute toxicity study of a polysaccharide based hydrogel from linseed for potential use in drug delivery system. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 2, p. 1–7, 2018.

HEMMINGS, S. J. et al. Differential inhibitory effects of carbon tetrachloride on the hepatic plasma membrane, mitochondrial and endoplasmic reticular calcium transport systems: Implications to hepatotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 20, n. 1, p. 47–59, 2002.

HUNT, C. M. et al. Age-related differences in reporting of drug-associated liver injury: Data-mining of WHO safety report database. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 519–526, 2014

JAIN, H. et al. Insights into the mechanism of natural terpenoids as NF- κ B inhibitors: An overview on their anticancer potential. **Experimental Oncology**, v. 38, n. 3, p. 158–168, 2016.

JEANMONOD, D. J.; REBECCA; SUZUKI, K. ET AL. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % Control of a Proportional Hydraulic System. **Intech open**, v. 2, p. 64, 2018.

JIA, Z. et al. Natural Products Targeting on Oxidative Stress and Inflammation: Mechanisms, Therapies, and Safety Assessment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

JIANG, Y. et al. Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice. **Toxicological Sciences**, v. 79, n. 2, p. 404–410, 2004.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

JORGE, S.G. Hepatopatia induzida por drogas. **Hepcentro**. 2006. Disponível em: < <http://www.hepcentro.com.br/>>.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 489–499, 2005.

KARUNAWEEERA, N. et al. Plant polyphenols as inhibitors of NF- κ B induced cytokine production—a potential anti-inflammatory treatment for Alzheimer's disease? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. June, p. 1–5, 2015.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. CCl₄-induced hepatotoxicity: Protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 2–7, 2012.

KORSRUD, G. O.; GRICE, H. C.; MCLAUGHLAN, J. M. Sensitivity of several serum enzymes in detecting carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 474–483, 1972.

KRÄHENBÜHL, S.; REICHEN, J. Decreased hepatic glucose production in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 64–70, 1993.

KRITHIKA, R.; JYOTHILAKSHMI, V.; VERMA, R. J. Phyllanthin inhibits CCl₄-mediated oxidative stress and hepatic fibrosis by down-regulating TNF- α /NF- κ B, and pro-fibrotic factor TGF- β 1 mediating inflammatory signaling. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 5, p. 953–960, 2014.

LAMMERT, C.; BJORNSSON, E.; NIKLASSON, A.; CHALASANI, N. Oral Medications with Significant Hepatic Metabolism. **Hepatology**. p. 615–620, 2010.

LARSON, A. M. Acetaminophen Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 525–548, 2007.

LEE, I. C. et al. The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 174–185, 2014.

LEISE, M. D.; POTERUCHA, J. J.; TALWALKAR, J. A. Drug-Induced Liver Injury. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 1, p. 95–106, 2014.

LICATA, A. et al. A focus on epidemiology of drug-induced liver injury: analysis of a prospective cohort. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 112–121, 2017.

LiverTox. Phenotypes of drug induced liver injury. **U.S. National Library of Medicine**, National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services. Disponível em: < https://livertox.nih.gov/Phenotypes_intro.html>. Acesso em março 2018.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Review of natural products with hepatoprotective effects. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14787–14804, 2014.

MARTÍNEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 3, 2009.

MEKJARUSKUL, C.; FANGKRATHOK, N.; SRIPANIDKULCHAI, B. Acute toxicity investigation of polysaccharide extracts of *Lentinus polychrous* in rats. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 433–439, 2015.

MONTRIEF, T.; KOYFMAN, A.; LONG, B. Acute liver failure: A review for emergency physicians. **American Journal of Emergency Medicine**, p. #pagerange#, 2018.

OLALEYE, M. T.; ROCHA, B. T. J. Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 59, n. 5, p. 319–327, 2008.

OLATOSIN, T.; AKINDUKO, D.; UCHE, C. Antioxidant capacity of *Moringa oleifera* seed oil against CCl₄-induced hepatocellular lipid peroxidation in Wistar albino rats. **J Exp Biol**, v. 4, n. 1, p. 514–518, 2014.

ONAKPOYA, I. J.; HENEGHAN, C. J.; ARONSON, J. K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. **BMC Medicine**, p. 1–11, 2016.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008.

PANDIT, A.; SACHDEVA, T.; BAFNA, P. Drug-induced hepatotoxicity: A review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 5, p. 233–243, 2012.

PRASANTH, R. K. **Physicochemical characterisation and binding property of polysaccharide of *Solanum betaceum* cav in tablet formulation**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Karpagam Escola de Farmácia, 2017.

PRESCOTT, L. F. et al. Plasma-Paracetamol Half-Life and Hepatic Necrosis in Patients With Paracetamol Overdosage. **The Lancet**, v. 297, n. 7698, p. 519–522, 1971.

PRITCHARD, M. T.; APTE, U. **Models to Study Liver Regeneration**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

RASCHI, E.; DE PONTI, F. Drug-induced liver injury: Towards early prediction and risk stratification. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 30–37, 2017.

RECKNAGEL, R. O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacol Ther.**, v. 43, n. 1, p. 139–54, 1989.

ROTH, R. A.; GANEY, P. E. **Role of inflammation in drug-induced liver injury**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

RUMACK, B. H. Acetaminophen hepatotoxicity: The first 35 years. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 3–20, 2002.

SCHOLTEN, D.; TREBICKA, J.; LIEDTKE, C.; WEISKIRCHEN, R. The carbon tetrachloride model in mice. **Laboratory Animals**, v. 49, p. 4–11, 2015.

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

SHEHU, A. I. Mechanisms of Drug- Induced Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 35–54, 2017.

SHU, M. et al. Inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways alleviate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in Toll-like receptor 5 (TLR5) deficiency mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 471, n. 1, p. 233–239, 2016.

SUBRAMANYA, S. et al. Therapeutic Potential of Plants and Plant Derived Phytochemicals against Acetaminophen-Induced Liver Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3776, 2018.

TAKAHASHI, Y.; FUKUSATO, T. **Animal Models of Liver Diseases**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

TOGHILL, P. J. et al. Acute Hepatic Necrosis Following an Overdose of Paracetamol. **Gastroenterology**, v. 56, n. 4, p. 773–776, 1969.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J. P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 81–90, 2007.

VELUSAMI, C. C. et al. Safety evaluation of turmeric polysaccharide extract: Assessment of mutagenicity and acute oral toxicity. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

VERMA, R. a Review on Hepatoprotective Activity of Medicinal Plants. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 2, n. 3, p. 501–515, 2011.

WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. **Critical reviews in toxicology**, v. 33, n. 2, p. 105–136, 2003.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. p. 472–484, 2015.

WU, R. et al. The Cytochrome P450-Mediated Metabolism Alternation of Four Effective Lignans From Schisandra chinensis in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats and Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. v. 9, n. March, p. 1–12, 2018.

XU, J. et al. The role of human cytochrome P450 2E1 in liver inflammation and

fibrosis. **Hepatology Communications**, v. 1, n. 10, p. 1043–1057, 2017.

ZHAO, H. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from spent mushroom substrates (*Laetiporus sulphureus*) in acute alcohol-induced mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.