

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

MARIEL RAQUEL BORGES BETTO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ENALAPRIL SOBRE A HEPATOXICIDADE
INDUZIDA PELO ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

PORTO ALEGRE, 2011

MARIEL RAQUEL BORGES BETTO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ENALAPRIL SOBRE A HEPATOXICIDADE
INDUZIDA PELO ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador (a): Prof. Dra. Maria Martha Campos

PORTO ALEGRE, 2011

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor e dedicação para comigo, por terem me apoiado incondicionalmente em todas as minhas escolhas e, principalmente na concretização deste sonho. Agradeço por terem sido a peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que hoje sou.

Às minhas irmãs e ao meu marido, pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei. Obrigada por acreditarem em mim!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida;

Aos meus pais Deonísio e Eva, por todo amor e dedicação que sempre tiveram comigo. Meu eterno agradecimento pelos momentos que estiveram ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível. Pais dedicados e amigos, que abriram mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho;

Às minhas irmãs Paula e Lisiane, pelo incentivo e apoio dedicados. Agradeço por acreditarem na minha capacidade;

Ao meu marido Gláucio, pela paciência, ajuda constante e por sempre me apoiar na escolha de meus objetivos;

À minha orientadora, professora Dra. Maria Martha Campos, meu eterno agradecimento pelo ensinamento e dedicação dispensados. Agradeço por ter me dado à oportunidade de realizar este trabalho, me incentivando constantemente e acreditando em mim. Agradeço pela humildade, por sempre me auxiliar nas atividades e pelo exemplo de competência que, levarei por toda a vida;

À professora Dra. Fernanda Morrone pela amizade, pelo exemplo de profissional que és e pela disponibilidade do laboratório de farmacologia;

Aos colegas de laboratório, André, Izaque, Paula, Natália e Laiz, pelo carinho e pela amizade, por terem me ensinado e auxiliado nos experimentos e pelo exemplo científico de cada um. Seus conhecimentos foram de grande importância;

Ao Juliano Soares, técnico de laboratório, pelo apoio na realização dos experimentos. Agradeço por colaborar comigo, sempre disponível nas atividades práticas;

Também agradeço ao Carlos Leite, responsável pelo laboratório de toxicologia da PUC, ao Tiago Giuliani, patologista do hospital da PUC e a mestrande Tatiane Terumi do laboratório veterinário na UFRGS, pelos trabalhos realizados, me auxiliando nos resultados;

Por fim, gostaria de lembrar de todos os familiares e amigos que me auxiliaram diretamente para a realização deste trabalho.

*“A fórmula do sucesso:
um sim, um não,
uma linha reta, um objetivo.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Introdução: O acetaminofeno (APAP) é um potente agente analgésico e antipirético, com fraco efeito anti-inflamatório. Apesar de sua eficácia, a utilização de doses elevadas de APAP está associada à severa hepatotoxicidade. Tem sido sugerido que o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), como o captopril, poderia apresentar efeitos protetores na intoxicação aguda induzida por APAP, embora não existam evidências suficientes para comprovar este efeito. Neste contexto, o presente estudo investigou os efeitos do tratamento com um potente inibidor da ECA, o enalapril, sobre a hepatotoxicidade induzida por APAP em camundongos. **Métodos:** Camundongos machos e fêmeos C57BL/6 (6-10 por grupo, 20-25 g) foram utilizados. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (09/00119 – PUCRS). Para o tratamento profilático, os animais foram pré-tratados oralmente com enalapril (30 mg/kg), uma vez por dia, durante 4 dias antes da administração de APAP. No quinto dia, a hepatotoxicidade foi induzida por uma dose única de APAP (400 mg/kg, i.p.). Os animais receberam duas doses adicionais de enalapril 1 h antes, e 6 h após a administração de APAP. Os camundongos foram submetidos à eutanásia 24 h após a injeção de APAP. Os parâmetros avaliados foram: alterações macroscópicas e histológicas dos fígados, níveis séricos de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), atividade da catalase (CAT) e concentração de glutathione reduzida (GSH), migração de neutrófilos (MPO) e produção de TNF α em fatias de fígado e, expressão de caspase-3, por imunistoquímica. Os efeitos do enalapril também foram avaliados sobre estes mesmos parâmetros, em um protocolo terapêutico, em que os animais receberam APAP (400 mg/kg, i.p.) e o enalapril (30

mg/kg) foi administrado 3 h após. Posteriormente, os camundongos receberam mais três aplicações de enalapril com intervalos de 3 h cada. A N-acetilcisteína (NAC; 50 mg/kg) foi utilizada como controle positivo, nos mesmos intervalos de tempo.

Resultados: A administração profilática oral de enalapril produziu uma redução significativa da hepatotoxicidade induzida por APAP, de acordo com a avaliação macroscópica dos fígados ($71 \pm 10 \%$). A avaliação histológica revelou que as amostras obtidas de animais controle APAP apresentaram necrose em três a quatro camadas de hepatócitos, acompanhada por camadas de degeneração centrolobular, enquanto que os animais pré-tratados com enalapril mostraram mínima necrose ou nenhuma mudança. Ademais, o pré-tratamento com enalapril reduziu visivelmente a expressão de caspase-3, indicando interferência com apoptose de células hepáticas. O enalapril também produziu uma inibição acentuada das enzimas CAT e GSH no fígado ($72 \pm 11 \%$ e $90 \pm 11 \%$, respectivamente). Além disso, os animais pré-tratados com enalapril apresentaram uma redução acentuada dos níveis séricos AST e ALT. As inibições observadas foram $86 \pm 14 \%$ e $88 \pm 9 \%$, respectivamente. Ademais, o tratamento com enalapril também causou uma redução da atividade da MPO ($82 \pm 13 \%$), embora não tenha alterado a produção de $\text{TNF}\alpha$. Uma redução similar de todos os parâmetros de hepatotoxicidade também foi observada com o esquema terapêutico de administração do enalapril. De acordo com a avaliação macroscópica, o enalapril reduziu significativamente a hepatotoxicidade causada por APAP, de forma semelhante ao controle positivo, NAC ($79 \pm 12 \%$ e $80 \pm 20 \%$, respectivamente). Em relação à avaliação histológica, os resultados foram similares ao tratamento profilático. O pós-tratamento com enalapril ou NAC também reduziu a expressão de caspase-3. Para a GSH hepática, foram observadas inibições de $86 \pm 15 \%$ e $92 \pm 22 \%$, respectivamente, para os tratamentos com enalapril e NAC. No

entanto, para a enzima CAT, não houve alteração significativa com ambos os tratamentos. O esquema terapêutico também produziu uma redução marcante dos níveis séricos de AST ($77 \pm 5 \%$ e $76 \pm 7 \%$) e ALT ($94 \pm 3 \%$ e $99 \pm 8 \%$), para enalapril e NAC, respectivamente. A administração terapêutica de enalapril ou NAC também causou uma redução significativa da atividade de MPO, com percentagens de inibição de $96 \pm 6 \%$ e, $98 \pm 9 \%$, respectivamente, embora não tenha alterado a produção de $\text{TNF}\alpha$. **Discussão:** Os resultados do presente estudo indicam que a administração profilática de enalapril foi capaz de prevenir a hepatotoxicidade causada por APAP. Além disto, a utilização de um esquema terapêutico com este inibidor também foi capaz de prevenir a toxicidade hepática causada por APAP, em níveis comparáveis aos observados com o fármaco de referência NAC. Assim, é possível sugerir que pacientes sob tratamento com este inibidor são menos suscetíveis aos efeitos do APAP.

ABSTRACT

Introduction: Acetaminophen (APAP) is a potent antipyretic and analgesic agent, with weak anti-inflammatory effects. Despite its efficacy, the use of elevated doses of APAP is associated with severe hepatotoxicity. It has been suggested that treatment with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, such as captopril, might present protective effects in the acute intoxication evoked by APAP, although further studies are still required to prove this hypothesis. In this context, the present study investigated the effects of both prophylactic and therapeutic treatment with the highly potent ACE inhibitor enalapril, on the hepatotoxicity induced by APAP in mice.

Methods: Male and Female C57BL/6 mice (6-10 per group, 20-25 g) were used. All the experimental protocols were approved by the Local Ethics Committee (09/00119 - PUCRS). For the prophylactic treatment, animals were pretreated orally with enalapril (30 mg/kg), once a day, during 4 days before APAP administration. On the fifth day, the hepatotoxicity was induced by a single dose of APAP (400 mg/kg, i.p.). The animals received two additional doses of enalapril 1 h before, and 6 h after APAP administration. Mice were euthanized 24 h after APAP injection. The following parameters were assessed: macroscopic and histological alterations of livers, serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), determination of catalase activity (CAT) and reduced glutathione concentration (GSH), measurement of neutrophil migration (MPO) and TNF α production in liver slices, and immunohistochemistry analysis of caspase-3 liver expression. The effects of enalapril were also assessed on the same parameters of hepatotoxicity in a therapeutic protocol, in which the animals received APAP (400 mg/kg i.p.), and enalapril (30 mg/kg) was dosed orally 3 h after administration of APAP.

Subsequently, mice received three additional doses of enalapril, at intervals of 3 h each. N-acetylcysteine (NAC; 50 mg/kg) was used as a positive control drug, at the same schedules of treatment. **Results:** The oral administration of enalapril produced a significant reduction of hepatotoxicity induced by APAP, according to the macroscopic evaluation of livers ($71 \pm 10\%$). The histological analysis revealed that samples obtained from APAP control animals presented necrosis in three to four layers of hepatocytes, accompanied by layers of centrilobular degeneration, while those pretreated with enalapril showed minimal necrosis, or no changes. The pre-treatment with enalapril also reduced the immunostaining for caspase-3, indicating an interference with liver cells apoptosis. The treatment with enalapril also displayed a marked inhibition of liver CAT and GSH ($72 \pm 11\%$ and $90 \pm 11\%$, respectively). Additionally, the animals pre-treated with enalapril showed a marked reduction of AST and ALT serum levels. The inhibitions observed were $86 \pm 14\%$ and $88 \pm 9\%$, respectively. Furthermore, treatment with enalapril also caused a reduction of MPO activity ($82 \pm 13\%$), whereas the production of $\text{TNF}\alpha$ was not significantly affected. A similar reduction of all parameters of hepatotoxicity was observed with the therapeutic regimen of administration. The macroscopic evaluation demonstrated that enalapril was capable of significantly reducing the hepatotoxicity induced by APAP, as observed for the positive control drug NAC ($79 \pm 12\%$ and $80 \pm 20\%$, respectively). Concerning the histological analysis, the therapeutic administration of enalapril displayed comparable effects, as seen for the prophylactic schedule of treatment. The post-treatment with enalapril and NAC also diminished caspase-3 immunopositivity. Liver GSH concentrations were reduced in $86 \pm 15\%$ and $92 \pm 22\%$, correspondingly, for enalapril and NAC treatments. However, both drugs failed to significantly alter liver CAT activity. The therapeutic regimen also produced a marked

decrease of either AST ($77 \pm 5 \%$ e $76 \pm 7 \%$) or ALT ($94 \pm 3 \%$ e $99 \pm 8 \%$) levels, for enalapril and NAC, respectively. This scheme of treatment also resulted in a significant reduction of MPO activity, with inhibition percentages of $96 \pm 6 \%$ and $98 \pm 9 \%$, for enalapril and NAC, whereas the production of $\text{TNF}\alpha$ was not significantly affected. **Discussion:** The present results indicate that prophylactic administration of enalapril was able to prevent the hepatotoxicity caused by APAP. Moreover, the therapeutic administration of this drug was also able to reverse the liver toxicity caused by APAP. Thus, it is possible to suggest that patients under treatment with this ACE inhibitor are less susceptible to the effects of APAP. Additionally, enalapril might well represent an innovative tool for treating APAP-induced intoxication.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE – *Angiotensin-Converting Enzyme*;

ADRs – *Adverse Drug Reactions*;

APAP – Acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol);

AINES – Anti-inflamatórios Não-Esteroidais;

ALF – Lesão Aguda no Fígado;

ALFSG – Grupo de Estudos de Lesão Aguda no Fígado;

ALT – Alanina Transaminase;

AST – Aspartato Transaminase;

BK – Bradicinina;

BSA – *Bovine Serum Albumin*;

CAT – Catalase;

CB1 – Receptores Canabinóides;

CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais;

COX – Cicloxigenase;

CYP – Citocromo P450;

DILI – Lesões Hepáticas Induzidas por Medicamentos;

DTNB – Glutaciona redutase ácido 5,5' ditio-bis-2-nitrobenzóico;

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina;

EDTA – *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*;

FDA – *Food and Drugs Administration*;

GSH – Glutaciona Reduzida;

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio;

HTAB – *Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide*;

H&E – Hematoxilina e Eosina;

IL – Interleucina;

INF – Interferon;

i.p. – Intraperitoneal;

i.v. – Intravenosa;

MPO – Mieloperoxidase;

NAC – N-acetilcisteína;

NAPQI – N-acetil-para-benzoquinonimina;

NIH – *National Institutes of Health*;

OD – Densidade Óptica;

OTC – Medicamento de Venda Livre;

PBS – *Phosphate Buffered Saline*;

p.o. – Via Oral;

RAMs – Reações Adversas a Medicamentos;

REL – Retículo Endoplasmático Liso;

SEM – *Standard Error of Mean*;

TGO – Transaminase Oxalacética;

TGP – Transaminase Pirúvica;

TMB – Tetrametilbenzidina;

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α ;

v.o. – Via Oral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	36
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	36
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	38
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos vem se expandindo em um ritmo bastante acelerado e, deve continuar a crescer nos próximos anos, em virtude do envelhecimento da população, da facilidade de aquisição dos medicamentos, dentre outros. Além dos benefícios de controle das doenças, aumento da longevidade e da qualidade de vida, um aumento da incidência de graves reações adversas a medicamentos (RAMs) tem sido observado. Embora muitas RAMs sejam dependentes da dose e/ou não evitáveis, outras, como as lesões hepáticas induzidas por medicamentos (DILI; do inglês, *Drug-Induced Liver Injury*), são de natureza idiossincrática. A DILI tem sido a maior causa de lesão aguda no fígado (ALF; do inglês, *Acute Liver Failure*) nos Estados Unidos e constitui uma das principais preocupações para aprovação de drogas por órgãos reguladores governamentais na atualidade (Yee *et al.*, 2007; Fontana, 2008a; Holt *et al.*, 2008; Lammert *et al.*, 2008; Chun *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010).

Com uma incidência anual de ALF estimada em 2800 casos por ano nos Estados Unidos, que pode ser decorrente de uma infinidade de doenças, torna-se difícil obter dados fiéis sobre as causas, os fatores de risco e os resultados dessa síndrome clínica. A ALF ocorre em pacientes de todas as idades, mas as causas e o prognóstico em adultos, crianças e lactentes diferem marcadamente (Fontana, 2008b). O grupo de estudos de insuficiência hepática aguda nos Estados Unidos (ALFSG) é uma rede de 23 centros que tem estudado as causas e os resultados da ALF prospectivamente, desde 1998. Uma análise recente deste centro revelou que de 1033 pacientes adultos internados com ALF, 46 % apresentavam intoxicação por acetaminofeno (N-acetil-p-aminofenol) (APAP) (Fontana, 2008a; b; Chun *et al.*, 2009). A *overdose* por APAP constitui a principal causa de admissão nos hospitais e

de transplante por ALF no Reino Unido e em outros países ocidentais (Fontana, 2008b; Randle *et al.*, 2008; Lopez, 2009; Morsy *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010). Há uma estimativa de 60.000 casos de superdosagem por APAP anualmente, a maioria dos quais estão relacionados com tentativas de suicídio. Cerca de 26.000 pacientes são hospitalizados, com uma taxa de mortalidade de 500 casos por ano, dos quais, pelo menos 20 %, não envolvem superdosagem intencional (Larson, 2007; Fontana, 2008b). Dados mais atuais demonstraram que a proporção de ALF induzida por APAP aumentou rapidamente entre 1998 (28 %) e 2003 (51 %) (Bataller, 2007; Larson, 2007; Chun *et al.*, 2009).

O APAP é amplamente usado como agente analgésico e antipirético, apresentando fracos efeitos anti-inflamatórios (Liu *et al.*, 2006; Yapar *et al.*, 2007; Grypioti *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Myers e Laporte, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010). O membro original deste medicamento é a acetanilida que foi introduzida na medicina por Cahn e Hepp; todavia, este fármaco apresentou alta toxicidade. Desta forma, na busca de compostos menos tóxicos, o para-aminofenol foi testado, acreditando-se que ocorria a oxidação de acetanilida a esse composto. Entretanto, não houve redução da toxicidade, passando a ser testados diversos derivados químicos do para-aminofenol. Um dos mais satisfatórios foi a fenacetina, introduzida para fins terapêuticos, no final do século XIX (Bertolini *et al.*, 2006).

O APAP foi sintetizado por Morse em 1878 e usado pela primeira vez por Vom Mering, em 1887 (Bertolini *et al.*, 2006; Smith, 2009). Estudos de Brodie e Axelrod levaram a sua redescoberta e comercialização na década de 1950, como um substituto para a fenacetina (Bertolini *et al.*, 2006; Smith, 2009). Posteriormente, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1960, como um medicamento de venda livre (OTC), na formulação de 325 mg, em comprimidos de

liberação imediata. Mais tarde, cápsulas de liberação imediata e comprimidos, contendo 500 mg do princípio ativo, foram aprovados em 1973 e 1975, respectivamente. Com base em dados da literatura, o FDA determinou que o APAP apresentava eficácia e segurança satisfatórias, embora a dose diária máxima não devesse ultrapassar 4 g, em um período de 24 h (Bertolini *et al.*, 2006; Larson, 2007; Worriax *et al.*, 2007; Lopez, 2009; Myers e Laporte, 2009). Atualmente, sabe-se que a administração de 10 g ou 15 g, em dose única, pode causar efeitos graves ou fatais ao fígado, com ocorrência de necrose hepática (Larson, 2007; Chun *et al.*, 2009; Myers and Laporte, 2009; Jaeschke *et al.*, 2010). Doses inferiores a 10 g, em dias consecutivos, acarretam um risco de lesão hepática em alguns indivíduos. A hepatotoxicidade por APAP também pode ocorrer em pacientes em jejum ou em uso de álcool, mesmo com doses mais baixas (Larson, 2007; Myers and Laporte, 2009; Suzuki *et al.*, 2009, Jaeschke *et al.*, 2010).

As ações analgésicas do APAP parecem estar relacionadas principalmente a mecanismos centrais (Bertolini *et al.*, 2006; Smith, 2009). Acredita-se que o APAP inibe as cicloxigenases (COX), mas este efeito é diferente daquele observado para anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Anderson, 2008; Myers e Laporte, 2009; Smith, 2009). Estudos bioquímicos demonstraram que o APAP pode representar um inibidor fraco da COX, com certa seletividade para a COX cerebral (Bertolini *et al.*, 2006; Smith, 2009). A pequena ação anti-inflamatória do APAP pode ser atribuída, pelo menos em parte, à presença de altas concentrações de peróxidos encontrados nas lesões inflamatórias. Por outro lado, seu efeito antipirético, pode ser explicado pela capacidade de inibir a COX no cérebro, onde o conteúdo de peróxidos é baixo (Bertolini *et al.*, 2006; Högestätt *et al.*, 2006; Smith, 2009). Além disto, o APAP não inibe a ativação de neutrófilos, como fazem outros anti-inflamatórios (Roberts e

Morrow, 2003). Dados mais recentes sugerem que os efeitos analgésicos do APAP podem estar relacionados com a ativação indireta dos receptores canabinóides CB1 (Bertolini *et al.*, 2006; Högestätt *et al.*, 2006; Anderson, 2008; Myers e Laporte, 2009). Acredita-se que na medula espinhal e no cérebro, o APAP seja transformado em *p*-aminofenol, através de uma reação de desacetilação e, que posteriormente, seja conjugado com ácido araquidônico, formando N-araquidonoilfenolamina, um inibidor da recaptação de canabinóides endógenos, como a anandamida (Bertolini *et al.*, 2006; Högestätt *et al.*, 2006; Anderson, 2008).

O APAP é bem absorvido por via oral. A concentração no plasma atinge o pico entre 30 e 60 min e a meia-vida plasmática é de cerca de 3 h (Rang *et al.*, 2007). A distribuição é relativamente uniforme na maioria dos líquidos corporais. A ligação do fármaco às proteínas plasmáticas é variável e apenas 20 a 50 % podem estar ligados nas concentrações encontradas durante a intoxicação aguda. Após a administração de doses terapêuticas, 90 a 100 % do fármaco podem ser recuperados na urina durante o primeiro dia, principalmente após a conjugação hepática com ácido glicurônico (60 %), ácido sulfúrico (35 %) e/ou cisteína (3 %) (Roberts e Morrow, 2003).

Em relação ao metabolismo de medicamentos, as substâncias podem ser biotransformadas, predominantemente, por dois mecanismos. Durante as reações de fase I, grupos polares são adicionados às moléculas por meio de oxidação, redução e hidrólise. Estas reações são catalisadas pelo sistema citocromo P450 (CYP), uma família hemoproteínas de membrana, localizadas no retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos centrolobulares. Existem diversas CYPs que participam do metabolismo de compostos exógenos. Embora muitos fármacos sejam convertidos em compostos ativos por este processo, subgrupos tóxicos, tais

como radicais livres, também podem ser formados. Posteriormente, durante a fase II do metabolismo, as moléculas podem ser conjugadas com ácido glicurônico, sulfatos ou glutathione através de enzimas específicas, o que as torna mais hidrossolúveis (Bertolini *et al.*, 2006; Larson, 2007).

Quanto ao APAP, o mesmo é transformado pelo sistema CYP (principalmente CYP 2E1, 1A2 e 3A4) no metabólito N-acetil-para-benzoquinonimina (NAPQI) (Bertolini *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Rowden *et al.*, 2006; Sener *et al.*, 2006; Yapar *et al.*, 2007; Grypioti *et al.*, 2008; Heard, 2008; Murray *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Bond, 2009; Chun *et al.*, 2009; Lopez, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; Morsy *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010), sendo a CYP2E1 a principal fonte de NAPQI (Wu *et al.*, 2008). Em circunstâncias normais, este intermediário, altamente reativo, é eliminado por conjugação com glutathione reduzida (GSH) e, a seguir, transformado em ácido mercaptúrico, sendo excretado na urina. Todavia, doses excessivas ou o uso prolongado do medicamento, podem provocar uma saturação dos processos de conjugação, aumentando assim, a formação de metabólitos reativos tóxicos que se ligam covalentemente a macrogrânulos celulares, destruindo as células hepáticas (Bertolini *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2006; Rowden *et al.*, 2006; Sener *et al.*, 2006; Heard, 2008; Murray *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Wilhelm *et al.*, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; Morsy *et al.*, 2010; Ramachandran *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010) (Figura 1). Os mecanismos bioquímicos precisos relacionados com a necrose celular induzida pelo APAP ainda não estão completamente esclarecidos. No entanto, acredita-se que ocorra uma série de eventos simultâneos, incluindo peroxidação lipídica, estresse oxidativo, depleção de glutathione reduzida (GSH) e mudanças dos grupos sulfidríla (Randle *et al.*, 2008; North *et al.* 2010).

Estes eventos levam à morte dos hepatócitos, produzindo uma resposta inflamatória que amplifica o dano inicial, aumentando a lesão global do tecido (Liu *et al.*, 2006; Yapar *et al.*, 2007; Fontana, 2008b; Bond, 2009; Imaeda *et al.*, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010).

Após a ingestão excessiva de APAP, nas primeiras 4 h (fase 1), ocorrem alterações gastrintestinais não específicas, incluindo náuseas, vômitos, mal-estar, dores abdominais, anorexia e sudorese. Nos exames bioquímicos, leves alterações enzimáticas podem ser vistas. Já, entre 8 e 12 h, estes sintomas desaparecem e o paciente pode ser considerado erroneamente recuperado. No entanto, a fase latente (fase 2) desenvolve-se ao longo das próximas 24 a 72 h. Em alguns casos, os pacientes apresentam um bom quadro geral, mas alterações sub-clínicas e bioquímicas de hepatotoxicidade começam a aparecer. No soro, há um aumento da aspartato transaminase (ASL) e da alanina transaminase (ALT). Elevações na bilirrubina total e tempo de protrombina também são observadas. Finalmente, ocorre a fase hepática (fase 3), que se desenvolve nas próximas 72 a 96 h. Nesta etapa, ocorre necrose hepatocelular e, em alguns casos, a morte de alguns indivíduos. Os pacientes podem desenvolver dor no quadrante superior direito, com icterícia. Os casos graves evoluem para falência de múltiplos órgãos, edema cerebral e sepse em 3 a 5 dias. Porém, cerca de 70 % dos pacientes sobrevivem, iniciando a fase de recuperação (fase 4), sendo necessários 4 a 15 dias de tratamento (Rowden *et al.*, 2006; Bataller, 2007; Larson, 2007; Fontana, 2008a; Lopez, 2009).

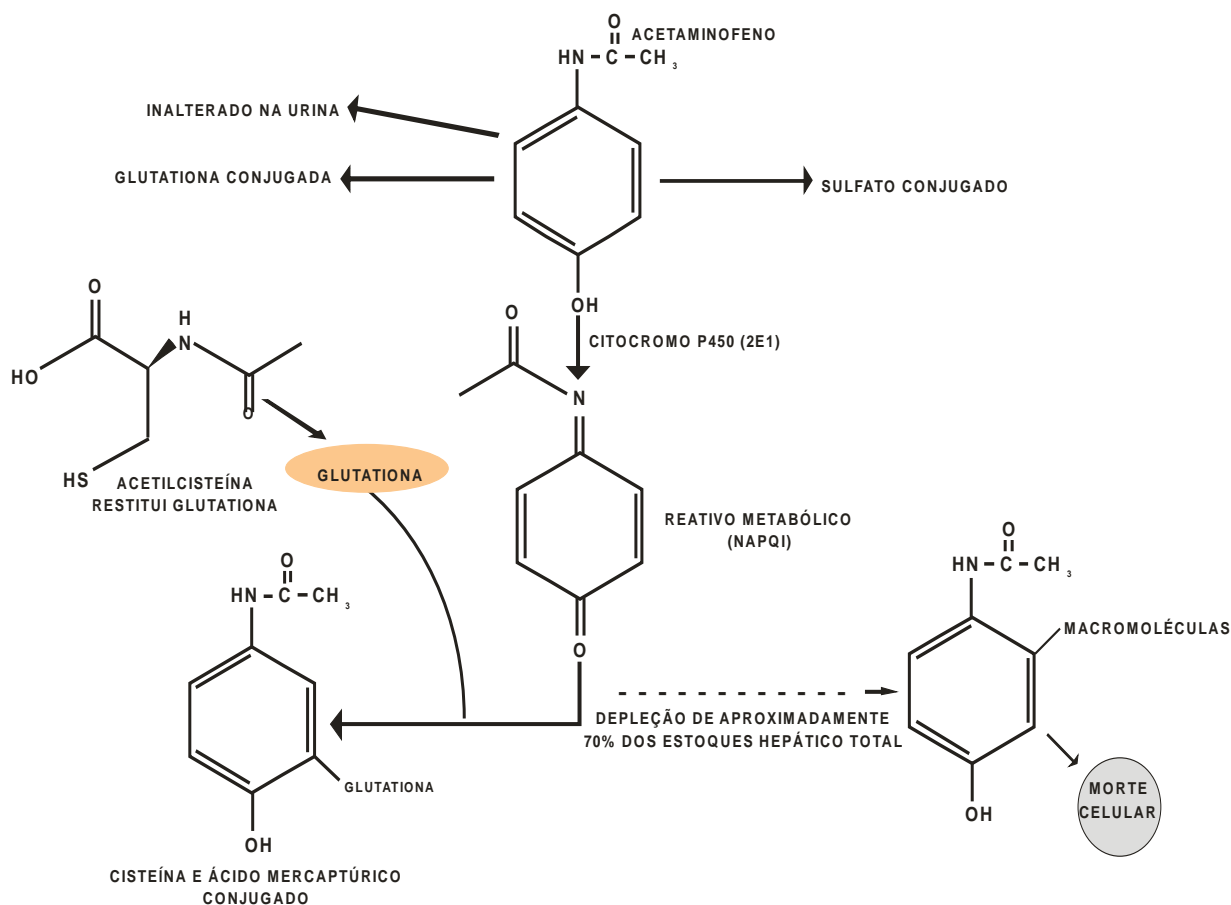


Figura 1. Metabolismo de acetaminofeno, extraído e modificado de Heard, 2008.

O tratamento atual da intoxicação por APAP consiste na administração de compostos sulfidrílicos que provavelmente atuam pela reposição de reservas hepáticas de GSH. A N-acetilcisteína (NAC) mostra-se eficaz quando administrada por via oral ou endovenosa, em um período de 8 a 10 h após a ingestão de APAP, independente da dose (Larson, 2007; Mazer e Perrone, 2008; Bond, 2009; Lopez, 2009). No entanto, se o paciente apresentar sintomas dentro de 4 h, é possível realizar lavagem gástrica e utilizar carvão ativado (1 g/kg), o que diminui a absorção de APAP em até 50 % (Larson, 2007; Fontana, 2008b; Brok *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2009; Jaeschke *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010).

A administração de NAC, por via endovenosa, na dose de 300 mg/kg, por 20 h (uma dose de 150 mg/kg por 15 min, seguida de 50 mg/kg por 4 h e mais 100 mg/kg por 16 h) é capaz de prevenir os danos hepáticos em pacientes intoxicados com APAP (Kanter, 2006; Larson, 2007; Lopez, 2009). Já, para pacientes tratados com NAC por via oral, com uma dose de 140 mg/kg, seguida por uma dose de manutenção de 70 mg/kg, a cada 4 h, por até 72 h, também pode impedir a toxicidade hepática causada pelo APAP (Kanter, 2006; Larson, 2007; Fontana, 2008b; Lopez, 2009). A administração oral e endovenosa do antídoto parece ser igualmente eficaz, quando o mesmo é administrado entre 8 e 10 horas após *overdose* por APAP (Kanter, 2006; Larson, 2007). Entretanto, para os casos onde se passaram mais de 10 h da intoxicação, o regime de administração por via oral parece mais eficaz, possivelmente pela maior dose total (Larson, 2007).

A cininase II, mais conhecida como enzima conversora da angiotensina (ECA), é responsável pela síntese da angiotensina II, o produto final da cascata renina-angiotensina. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina são utilizados no tratamento clínico da hipertensão arterial sistêmica, da insuficiência cardíaca congestiva e da nefropatia diabética. Estes fármacos possuem dois mecanismos de ação distintos: (i) impedem a conversão da angiotensina I em seu metabólito ativo, angiotensina II e; (ii) bloqueiam a degradação das cininas (Cavanagh *et al.*, 1995; Takai *et al.*, 1996; Cavanagh *et al.*, 2000; Ramalho, 2000; Ramalho *et al.*, 2000; Ramalho *et al.*, 2002; Altés *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009). Desta forma, sua ação resulta em um aumento dos níveis de cininas (vasodilatadoras), associado com uma redução da produção de angiotensina II (vasoconstritora).

Na década de 70, foram desenvolvidos os primeiros inibidores da ECA, cujo protótipo é o captopril. O sítio ativo da ECA contém um átomo de zinco. O desenvolvimento do captopril foi um dos primeiros exemplos do desenvolvimento bem-sucedido de um fármaco, com base no conhecimento químico da molécula-alvo. Foi observado que vários peptídeos pequenos derivados do veneno da *Bothrops jararaca* eram inibidores fracos da enzima, embora fossem inadequados como medicamentos, em razão de sua baixa potência e pouca absorção oral. O captopril foi elaborado para combinar as propriedades de tais inibidores peptídicos em uma molécula não-peptídica. Contém uma parte estrutural com cisteína, o principal substrato da glutatona e, um grupo sulfidril, apropriadamente posicionado para se ligar ao átomo de zinco, acoplado a um resíduo prolina que se liga ao sítio na enzima que, normalmente, acomoda a leucina terminal da angiotensina I (Yeung, 1988; Harbior, 1992; Cavanagh *et al.*, 1995; Rang *et al.*; 2007). Vários inibidores da ECA, diferindo na duração de ação e na distribuição tecidual são usados clinicamente, incluindo o enalapril e o ramipril. Os inibidores da ECA afetam os vasos de capacitância e de resistência e reduzem a carga cardíaca, bem como a pressão arterial. Não afetam a contratilidade cardíaca, de modo que o débito cardíaco normalmente aumenta (Sukamoto *et al.*, 2004; Rang *et al.*; 2007).

O maleato de enalapril foi o segundo inibidor da ECA aprovado nos EUA. Constitui um pró-fármaco que precisa ser hidrolisado por esterases no fígado para produzir o metabólito ativo, o ácido dicarboxílico ou, enalaprilat (Jackson, 2003; Sukamoto *et al.*, 2004). O enalaprilat é um inibidor altamente potente da ECA (Jackson, 2003). Embora também possua um “substituto prolina”, o enalaprilat difere do captopril por ser um análogo de um tripeptídeo, ao invés de um dipeptídeo. O enalapril é rapidamente absorvido quando administrado por via oral e apresenta

biodisponibilidade oral de cerca de 60 % (que é reduzida pela presença de alimento). Embora sejam observadas concentrações plasmáticas máximas em 1 h, o pico das concentrações do enalaprilat só é alcançado depois de 3 a 4 h. O enalapril tem meia vida de apenas 1,3 h. Entretanto, o enalaprilat, em virtude de sua forte ligação à ECA, tem meia vida plasmática de aproximadamente de 11 h. Quase todo fármaco é eliminado pelos rins na forma de enalapril intacto ou enalaprilat. A dose oral de enalapril varia de 2,5 mg a 40 mg/dia, em dose única ou fracionada (Jackson, 2003; Lazebnik *et al.*, 2007).

O fígado tem papel fundamental na modulação das ações do sistema calicreína-cininas; se por um lado sintetiza proteínas deste sistema, por outro é responsável pela captação e catabolismo de produtos da cascata proteolítica. É possível resumir a importância do fígado sobre as cininas da seguinte forma: este órgão é responsável pela síntese dos cininogênios e da pré-calicreína plasmática, convertendo os precursores de bradicinina em bradicinina, inativando a bradicinina e depurando as calicreínas tecidual e plasmática. Na fase aguda da inflamação, ocorre aumento da produção de pré-calicreína pelo fígado e, também, aumento da capacidade hepática de depurar calicreína plasmática. Assim, modulando este sistema, o fígado participa do controle do processo inflamatório e do tônus vascular (Morais *et al.*, 1999).

Em geral, a extensão do dano tecidual é determinada por um equilíbrio entre lesão e reparo. Fatores moduladores da lesão tecidual ou reparo, portanto, podem influenciar no resultado clínico final de hepatotoxicidade. Assim, agentes capazes de regular os mecanismos de reparação da lesão tecidual podem aumentar ou diminuir os danos ao fígado a partir da exposição de APAP, por reduzirem a lesão hepática e/ou melhorarem a regeneração do tecido (Ramalho *et al.*, 2002; Yayama *et al.*,

2007; Suzuki *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que o carvedilol, um fármaco beta-bloqueador não seletivo, que apresenta também atividade inibitória sobre receptores alfa-1, exerce efeito citoprotetor contra as lesões oxidativas causadas por APAP no fígado de rato. Além disto, o medicamento também foi capaz de impedir a peroxidação lipídica e o aumento das enzimas transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) (Ronsein *et al.*, 2005).

Em relação aos inibidores da ECA, diversos estudos têm demonstrado que os efeitos benéficos produzidos por estes inibidores não se devem apenas à redução da síntese de angiotensina II, mas também à potencialização dos efeitos biológicos da bradicinina, devido a sua menor degradação endógena (Ramalho, 2000; Ramalho *et al.*, 2002; Altés *et al.*, 2009). Estudos recentes mostram que inibidores da ECA protegem contra o dano hepático causado por isquemia e reperfusão e apresentam efeitos benéficos em modelos de transplante de fígado. Além disto, estes inibidores parecem favorecer a regeneração hepática após a hepatectomia parcial (Altés *et al.*, 2009). Considerando o possível papel protetor das cininas no fígado, o presente estudo investigou como o uso de enalapril poderia representar uma nova abordagem para o controle da hepatotoxicidade causada pelo APAP. De fato, alguns dados da literatura têm sugerido que pacientes sob tratamento com inibidores da ECA, tais como o captopril, são menos susceptíveis aos danos hepáticos causados pelo APAP, embora estudos adicionais nesta linha de pesquisa sejam necessários.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o efeito do inibidor da ECA, enalapril, sobre a hepatotoxicidade induzida pela administração de APAP em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar o perfil das respostas inflamatórias induzidas após a administração de APAP (400 mg/kg), i.p., em camundongos C57BL/6;

2.2.2 Comparar a eficácia de dois protocolos de tratamento com enalapril, profilático e terapêutico, sobre a hepatotoxicidade causada pelo APAP em camundongos C57BL/6;

2.2.3 Avaliar os efeitos do enalapril sobre as alterações macroscópicas e histológicas causadas pelo APAP no fígado de camundongos;

2.2.4 Analisar os efeitos do tratamento com o enalapril sobre a produção de radicais livres no tecido hepático após a administração de APAP;

2.2.5 Verificar os efeitos do tratamento com o enalapril sobre as alterações inflamatórias causadas pelo APAP sobre o tecido hepático (produção de $\text{TNF}\alpha$ e atividade da mieloperoxidase);

2.2.6 Investigar os efeitos do tratamento com o enalapril sobre indicadores clássicos de dano hepático, através da medida da atividade sérica das enzimas transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP);

2.2.7 Avaliar os efeitos do tratamento com enalapril sobre a expressão do indicador de apoptose, caspase-3, no fígado de camundongos tratados com enalapril;

2.2.8 Comparar os efeitos do protocolo terapêutico de administração de enalapril, com aqueles obtidos com o fármaco de referência, NAC.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do presente trabalho foram submetidos ao periódico *Toxicology and Applied Pharmacology*

Fator de Impacto (ISI Web of Knowledge): 3,359

**Effects of treatment with enalapril on the hepatotoxicity induced by
acetaminophen in mice**

Mariel R. B. Betto^a, Laiz F. Larazarotto^{b,c}, Tatiane T. N. Watanabe^d; David Driemeier^d; Carlos E. Leite^b; Maria M. Campos^{b,e}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^bInstitute of Toxicology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^cPharmacy, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

^dDepto de Patologia e Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS

^eSchool of Dentistry, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Maria Martha Campos, School of Dentistry and Institute of Toxicology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 55 51 33203626; E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br.

Abstract

Acetaminophen (APAP) is an antipyretic and analgesic agent, which is associated to severe hepatotoxicity when used in elevated doses. It has been suggested that angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors might present protective effects in the acute intoxication evoked by APAP, although further investigations are still required. We assessed the effects of both prophylactic and therapeutic treatment with the ACE inhibitor enalapril on APAP-induced hepatotoxicity. Male and female C57BL/6 mice were used and hepatotoxicity was induced by a single application of APAP (400 mg/kg, i.p.). The following parameters were assessed: macroscopic and histological liver alterations; serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activity; liver catalase activity (CAT) and reduced glutathione concentrations (GSH); hepatic measurement of neutrophil migration (MPO) and TNF α production; caspase-3 expression in the liver. Either the prophylactic or the therapeutic treatment with enalapril was able to reduce the macroscopic and histological liver alterations evoked by APAP, as well as the immunopositivity for caspase-3. Both schedules of treatment were also effective in reduce GSH concentration and MPO activity, whereas TNF α production remained unaffected. Conversely, only the pre-treatment (but not the post-administration) with enalapril significantly reversed APAP-induced CAT decrease. Furthermore, the pre- or the post-treatment with enalapril largely reduced ALT and AST serum activity in APAP-intoxicated mice. Data obtained with the prophylactic protocol of treatment appear to confirm that individuals under treatment with ACE inhibitors are less susceptible to the toxic effects of APAP. Additionally, the therapeutic approach allows us to suggest that enalapril might represent an innovative tool for treating APAP-induced intoxication.

Keywords: acetaminophen, enalapril, hepatotoxicity, free radicals, inflammation, mice

Introduction

Drug-induced liver injury (DILI) accounts to an elevated grade of morbidity and mortality. Due to its idiosyncratic nature, severity and poor diagnosis, DILI represents the most common cause for the failure of new drugs, especially during the post-marketing phase (Fontana et al., 2008a; Holt et al., 2008; Williams et al., 2010). Therefore, continuous studies are required to identify underlying mechanisms of DILI and also to identify new pharmacological approaches to prevent or treat this condition (Holt et al., 2008). Animal models, particularly those involving the administration of high doses of acetaminophen (APAP) to mice, have been widely used for that purpose (Yee et al., 2007).

APAP is one of the most used analgesic and antipyretic agents in the clinics, which is safely employed in the therapeutic range, up to 4 g. APAP overdose (suicidal or accidental) might lead to fulminate liver failure and significantly contributes to intensive care unit admissions and hospitalization costs (Bertolini et al., 2006; Jaeschke et al., 2010; Myers and Laporte, 2009; Smith, 2009). In normal doses, APAP is converted by the CYP 450 system (especially CYP 2E1, 1A2 and 3A4) in the metabolite N-acetyl-para-benzoquinone-imine (NAPQI) (Bertolini et al., 2006; Chandrasekaran et al., 2010; Morsy et al., 2010; North et al., 2010; Williams et al., 2010;), being the isoform CYP2E1 the main source of NAPQI (Wu et al., 2008). This intermediate is highly reactive; it is eliminated by conjugation with reduced glutathione (GSH) being transformed in mercapturic acid and excreted in urine.

However, excessive doses or prolonged use of the drug can cause saturation of conjugation processes, thus increasing the formation of toxic reactive metabolites that bind covalently to cells, destroying the liver tissue (Bertolini et al., 2006; Chandrasekaran et al., 2010; Heard, 2008; Morsy et al., 2010; Williams et al., 2010). The precise biochemical mechanisms related to cell necrosis induced by APAP are not yet fully understood, but likely involves simultaneous events, including lipid peroxidation, oxidative stress, depletion of reduced glutathione (GSH) and changes in sulfhydryl groups (North et al., 2010; Randle et al., 2008). These events lead to the death of hepatocytes, producing an inflammatory response that amplifies the initial damage, increasing the overall damage (Chandrasekaran et al., 2010; Fontana, 2008b; North et al., 2010; Yapar et al., 2007). In general, the extent of tissue harm is determined by a balance between injury and repair. Modulators of tissue injury or repair may therefore influence the ultimate clinical outcome of hepatotoxicity. Thus,

agents able to regulate repair mechanisms may decrease the liver damage following exposure to APAP, by reducing hepatic injury and/or by improving tissue regeneration (Ramalho et al., 2002; Suzuki et al., 2009; Yayama et al., 2007).

Kininase II, also known as angiotensin converting enzyme (ACE) is responsible for the synthesis of angiotensin II, the final product of the renin-angiotensin cascade. Inhibitors of ACE, such as captopril and enalapril, are used in the clinical treatment of hypertension, congestive heart failure and diabetic nephropathy (Altés et al., 2009; Cavanagh et al., 2000; Ramalho et al., 2002; Suzuki et al., 2009). The beneficial effects of these inhibitors are not only due to reduced synthesis of angiotensin II, but also to the enhancement of kinin levels (Ramalho et al., 2002). Noteworthy, it has been suggested that treatment with ACE inhibitors might present protective effects in the acute intoxication evoked by APAP, although further studies are still required to prove this hypothesis (Yeung, 1988). Based on these above-mentioned findings, this study investigated how the use of enalapril could represent a new approach for the control of hepatotoxicity caused by APAP, by means of pharmacological and biochemical approaches.

Materials and Methods

Drugs and chemical reagents

The following drugs and reagents were used: acetaminophen, *N*-acetylcysteine, enalapril, ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), phenylmethylsulfonyl fluoride, benzamethonium chloride, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and aprotinin A all came from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Na₃PO₄, NaCl, KCl, glucose and NaPO₄ (all from Merck, Haar, Germany); hydrogen peroxide and Tween 20 (Vetec, RJ, Brazil); bovine serum albumin (BSA) from Promega (Madison, WI, USA); alanine transferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) reagents were purchased from Labtest (MG, Brazil); Caspase-3 monoclonal antibody and TNF α DuoSet kit were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Most drugs were prepared and stored in phosphate buffered saline (PBS).

Animals

Six-week-old male and female C57BL/6 mice (20 to 25 g), obtained from Central Biotery of Universidade Federal de Pelotas (UFPEL, Brazil), were used in this study. The animals were housed in groups of five and kept in controlled temperature (22 ± 1 °C) and humidity (60 - 70 %), under a 12 h light-dark cycle (lights on 07:00 AM). Food and water were available *ad libitum*; however, mice were fasted 16 h prior to treatment with APAP, when food was withdrawn. Mice were adapted to the laboratory for a period of 1 h prior to experimental procedures. Tests were performed between 8:00 AM and 6:00 PM. Each animal was used only once, and immediately euthanized at the end of the experimental period by cervical dislocation. For biochemical analysis, blood was collected through puncture of the abdominal aorta, immediately after euthanasia. The reported experiments were conducted in accordance with Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH) of the United States of America. All the procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (CEUA 09/00119).

Induction of hepatotoxicity

Hepatotoxicity induction was held according to the technique described by Wu et al. (2008), with some modifications. Animals were fasted 16 h before the application of APAP, and maintained with free access to water. The next day, the

animals were treated with APAP by intraperitoneal route (i.p.) at a dose of 400 mg/kg. APAP was dissolved in saline solution heated to 40 ° C. Control animals received only the warmed saline (10 ml/kg, i.p.). The animals were euthanized 24 h after the application of APAP. The blood and liver were collected for posterior analysis as described previously (Holt et al., 2008).

Protocols of treatment with enalapril

To assess the protective effects of ACE inhibition on APAP-induced hepatotoxicity, mice were orally pretreated with enalapril (30 mg/kg), once a day, during 4 days before APAP administration. On the fifth day, hepatotoxicity was induced by a single dose of APAP as described in the above section. The animals received two additional doses of enalapril 1 h before, and 6 h after APAP administration. Mice were submitted to euthanasia 24 h after APAP injection.

In a separate series of experiments, to assess the possible therapeutic effects of enalapril, the animals received APAP (400 mg/kg i.p.), and enalapril (30 mg/kg) was given orally, 3 h after APAP administration. Subsequently, mice received three additional doses of enalapril, at intervals of 3 h each. N- acetylcysteine (50 mg/kg, p.o.) was used as a positive control drug, and was dosed at the same schedules of treatment described for enalapril. The effects of enalapril were evaluated on several parameters indicative of hepatotoxicity as described in the next sections.

The doses and intervals of treatment with enalapril and NAC were selected on the basis of literature data (Habior et al., 1992; Sakamoto et al., 2004).

Macroscopic analysis

For macroscopic analysis, a portion of the liver was separated and evaluated under a stereomicroscope. The appearance of the liver was graded according to the following scale: 0 = normal (no lesion present); 1 = mild alterations in color; 2 = serious alterations in color; 3 = steatosis; 4 = necrosis.

Histological and immunohistochemical analysis

After macroscopic evaluation, portions of the liver (4 mm) were fixed in buffered formalin (10 %). The samples were dehydrated and embedded in paraffin. Five- μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E). Histological examination of tissues was performed by a pathologist in a blinded manner to the

experiment. Histological changes were evaluated according to criteria previously described by Liu et al. (2006), with some modifications, considering individual necrotic cells at the first cell layer, near to the centrolobular vein; number of layers of necrotic cells and the incidence of coalescence and hemorrhage.

To determine the occurrence of apoptosis, the expression of caspase-3 was determined by means immunohistochemical analysis, using an anti-caspase-3 antibody, according to the method described by Yuan et al., 2009. The primary antibody (Human/Mouse Active Caspase-3, Rabbit IgG, R & D Systems) was diluted in PBS (1:200). Following quenching of endogenous peroxidase with 1.5% hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min, high temperature antigen retrieval was performed by immersing the slides in 10 mM trisodium citrate buffer pH 6.0, which in turn was immersed in a water bath at 95-98°C for 45 min. The slides were processed using the appropriate biotinylated secondary antibody and the streptavidin-HRP complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the sections were developed with the chromogen AEC (Dako Cytomation, Carpinteria, CA), and counterstained with Harris's hematoxylin, followed by a quick washing in 1% ammonia solution. The slides were dried at room temperature and mounted in a coverslip and glicerogel.

Determination of serum ALT and AST activity

Following 24 h of APAP administration, the animals were euthanized and blood samples were collected. The serum was separated and stored at -80°C until further analysis. ALT and AST levels were measured using commercially available kits, according to the manufacturer's recommendations (Labtest, Brazil). The results were read at 505 nm, and the final results were calculated based on a calibration curve.

Catalase Activity (CAT)

After 24 h of APAP treatment, mice were euthanized and the livers were collected and homogenized in saline. The samples were centrifuged at 3500 g for 10 min and the supernatant was used for the estimation of CAT. For this purpose, the enzymatic decomposition of H₂O₂ was followed continuously at 240 nm. Briefly, 50 µl of samples and 0.65 ml of 50 mM PBS (pH7.0) were added to a quartz cuvette and 0.3 ml of 20 mM hydrogen peroxide was used as substrate. Enzymatic activity was

expressed as mmol H₂O₂ decomposed/min/mg protein (Aebi, 1984; Cancihumán et al., 2010)

Determination of reduced glutathione (GSH)

Hepatic GSH content was determined by using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), according to the method described by Shim et al. (2010), with some modifications. After 24 h of APAP treatment, the liver was rapidly harvested, and homogenized in saline. Homogenate was centrifuged at 3,500 g for 20 min, and the supernatant was used for the determination of GSH. Next, 0.5 ml of 4 % sulfosalicylic acid was added to 0.5 ml of the supernatant and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The supernatant (500 µl) was mixed with 2 ml of 0.1 M phosphate buffer and 10 µl of 0.01M DTNB. Absorbance of the mixture was measured at 412 nm. The GSH content was determined using a standard curve and the results were expressed as micromoles per µg of protein.

Neutrophil myeloperoxidase (MPO) assay

Neutrophil recruitment to the mouse liver was measured by evaluating tissue MPO activity, as described by Souza et al. (2001), with minor modifications. Animals received an i.p. injection of APAP (400 mg/kg) and were euthanized 24 h later. PBS-treated mice were used as control. The liver tissues were removed, homogenized at 5 % (w/v) in EDTA/NaCl buffer (pH 4.7) and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 0.5 % hexadecyltrimethyl ammonium bromide buffer (pH 5.4) and the samples were frozen. Upon thawing, the samples were re-centrifuged (10,000 rpm, 15 min., 4°C) and 25 µl of the supernatant were used for MPO assay. The enzyme reaction was assessed with 1.6 mM tetramethylbenzidine, 80 mM NaPO₄, and 0.3 mM hydrogen peroxide (Fernandes et al., 2003). The absorbance was measured at 595 nm, and the results are expressed as OD per milligram (mg) of tissue.

Determination of TNF α levels

The tissue TNF α levels, were evaluated in according to Fernandes et al. (2005) with minor modifications. After 24 h of treatment with APAP (400 mg/kg, i.p.), mice were euthanized and portions of the livers were removed and homogenized in

phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, filtered to 0.2 mm) containing: NaCl 0.4 M , PMSF 0.1 M, EDTA 10 mM, 0.05% of Tween 20, 0.5% BSA and 2 µg / ml aprotinin A. The homogenates were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant obtained was used to perform the analysis. The levels of TNF α were measured by ELISA kit, according to the manufacturer's recommendations (R & D Systems ®). The results were expressed as pg/mg tissue.

Statistical analysis

Most results are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) from 6 to 10 animals per group. The percentages of inhibition were calculated as the average of inhibition obtained for each individual experiment. Statistical comparison of the data was performed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Newman-Keuls Multiple Comparison test. P values smaller than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

Results

Macroscopic analysis

The macroscopic analysis revealed that APAP (400 mg/kg) i.p. administration led to severe liver tissue injury, whereas saline control animals did not present any clinical signal of hepatotoxicity. Of interest, the prophylactic administration of enalapril (30 mg/kg, p.o.) produced a significant reduction of APAP-induced hepatotoxicity, with 71 ± 10 % of inhibition (Fig. 1A). Macroscopic scores of hepatotoxicity were also reduced by the therapeutic protocol of treatment with both enalapril (79 ± 12 %) and NAC (80 ± 20 %) (Fig. 1B). A representative image of APAP-induced liver macroscopic changes and the beneficial effects of pre-treatment with enalapril are provided in Figure 1C-E.

Histological and immunohistochemical analysis

The severity of liver morphological changes in mice exposed to APAP is shown in Figure 2. A brief description of the main histological findings is presented as follows. In the saline group, no histological signals of hepatotoxicity were observed (Fig. 2A and 2B). The liver tissues from APAP-treated mice presented necrosis in three to four layers of hepatocytes, accompanied by layers of centrilobular degeneration (Fig. 2C and 2D). Prophylactic administration of enalapril markedly protected against histopathological alterations caused by exposure to APAP. The animals in this group displayed minimal necrosis, or no changes (Fig. 2E and 2F). A similar profile of hepatoprotection was observed when mice were submitted to the therapeutic protocol of treatment with enalapril and NAC (results not shown).

The pre-treatment with enalapril was able to partially reduce the immunopositivity for the apoptosis marker caspase-3, as seen in Figure 3 (panels A to C). Similar results were obtained for the post-treatment with either enalapril or NAC (results not shown).

Determination of serum ALT and AST activity

Serum ALT e AST levels were determined as a measure of hepatic function. Both ALT and AST levels were significantly increased in the APAP groups (218 ± 11 U/ml and 181 ± 12 U/ml, respectively), when compared to the saline-control group (45 ± 6 U/ml and 78 ± 10 U/ml, respectively). Prophylactic treatment with enalapril significantly reduced the serum ALT and AST activities (Fig. 4A and 4B). The

percentages of inhibition of ALT and AST were $88 \pm 9 \%$ and $86 \pm 14 \%$, respectively. A marked decrease of ALT ($94 \pm 3 \%$ and $99 \pm 8 \%$) and AST ($77 \pm 5 \%$ and $76 \pm 7 \%$) serum levels was also found following the therapeutic administration of enalapril or NAC (Fig. 4C and 4D).

Catalase Activity

To determine whether enalapril could reduce oxidative damage in the liver of APAP-treated mice, we measured the activity of the antioxidant enzyme CAT. Data on Fig. 5A shows that reduced activity of CAT induced by APAP, was significantly reverted (in $72 \pm 11 \%$) by pre-treating animals with enalapril (30 mg/kg, p.o.). However, therapeutic dosing of either enalapril or NAC failed to significantly alter this parameter (data not shown).

Determination of reduced glutathione (GSH) levels

GSH plays an important role in the detoxification of APAP. The endogenous levels of GSH in the liver tissues were significantly increased after APAP administration (7.1 ± 0.5 mmol/g of protein), in comparison to the saline group (4.9 ± 0.6 mmol/g of protein). The preventive treatment with enalapril (30 mg/kg, p.o.) reduced significantly the GSH increase ($90 \pm 11 \%$) (Fig. 5B). Noteworthy, increased levels of GSH in APAP treated animals were broadly reversed by the therapeutic administration of enalapril ($86 \pm 15 \%$) or the positive control drug NAC ($92 \pm 20 \%$) (Fig. 5C).

Neutrophil myeloperoxidase (MPO) assay

The migration of neutrophils to the mouse liver in response to APAP was evaluated indirectly by evaluation of MPO activity. The hepatic MPO activity was significantly increased in the APAP group when compared to the saline control animals. The previous treatment with enalapril strikingly decreased MPO activity induced by APAP by $82 \pm 13 \%$ (Fig. 6A). Interestingly, MPO activity was virtually brought to the control values by post-treatment with both enalapril or NAC ($96 \pm 6 \%$ and $98 \pm 9 \%$, respectively) (Fig. 6B).

Determination of TNF α levels

The obtained results indicate that APAP administration induced a significant increase of TNF α levels in the liver tissue, when compared to the saline groups. However, the levels of this inflammatory cytokine were not significantly modified by either prophylactic or therapeutic administration of enalapril (data not shown).

Discussion

The levels of serious adverse reactions (ADRs) have been considerably increased during the last decades. The DILI represents a minor percentage of all ADRs, but this condition has been the main reason of acute liver failure (ALF) worldwide. Noteworthy, APAP self-poisoning has been pointed out as the greatest cause of this clinical syndrome in developed countries (Fontana, 2008a; 2008b). In addition, an augmented incidence of ALF due to no intentional APAP overdose has been recently observed. APAP is one of the most used analgesic and antipyretic agents in the clinics, being an effective and safe drug when employed in the therapeutic range, for up to 4 g per day. However, its disseminated and long-term use has contributed to the increased rates of APAP-related hepatic toxicity (Jaeschke et al., 2010; Larson, 2007; Smith, 2009).

Despite the high rates of occurrence, the precise mechanisms underlying APAP-induced liver cell injury are not presently known, what limits the therapeutic options for treating intoxicated patients (Randle et al., 2008; Rowden et al., 2006). Of high interest, previous clinical evidence has suggested that ACE inhibitors might display protective effects in the acute intoxication evoked by APAP (Yeung, 1988), although this hypothesis remains to be further investigated. Therefore, the present study was designed to evaluate the possible hepatoprotective effects of the highly potent ACE inhibitor enalapril in a mouse model of liver injury induced by a single elevated dose of APAP.

Confirming previous literature data (Holt et al., 2008), the i.p. administration of APAP (400 mg/kg) resulted in hepatotoxicity development in both female and male C57/BL6 mice. Either the macroscopic and the histological evaluation of livers demonstrated that acute APAP treatment led to severe hepatic damage, when compared to saline control mice. As described previously (Bauer et al., 2000; Coen et al., 2003; Ito et al., 2003; Randle et al., 2008; Walker et al., 1980), in the present study, the administration of APAP to mice caused a striking congestion of liver cells, associated to necrosis and a profound accumulation of erythrocytes, according to the histological assessment. The liver damage related to APAP intoxication was also observed macroscopically, as attested by marked hepatic color changes and steatosis appearance.

Notably, both the prophylactic and the therapeutic schedules of treatment with enalapril were able to markedly prevent the morphological alterations evoked by

APAP treatment. The livers of mice in the enalapril groups presented a macroscopic appearance near to the normal. Likewise, the histological analysis revealed that congestion and necrosis evoked by APAP were widely diminished by enalapril treatment. A similar reduction of liver injury was achieved by the therapeutic dosing of NAC, a compound commonly employed in the clinics as the specific antidote for acetaminophen overdose (Bebarta et al., 2010; Millea, 2009). Caspase 3 immunostaining is commonly used as a marker of apoptosis, as this enzyme cleaves different cellular substrates, resulting in apoptotic cell death. In this study, APAP administration markedly increased caspase-3 expression, a parameter that was visibly reduced by the treatment with enalapril. A study conducted by Yuan et al. (2009) similarly demonstrated a reduction of caspase-3 immunopositivity in APAP-treated mice, following administration of *Artemisia sacrorum* extract. It is tempting to propose that enalapril might perhaps represent an attractive alternative for treating APAP-related liver injury, especially in cases of NAC inefficiency. Furthermore, considering some disadvantages of NAC, such as the unpleasant smell and taste, and the occurrence of nausea and vomiting when NAC is used by oral route, as well as the considerable incidence of anaphylactic reactions following intravenous administration (Heard, 2008; Kanter et al., 2006), enalapril could be pointed out as an attractive alternative for treating APAP intoxication.

The serum levels of ALT and AST have been long considered as sensitive indicators of hepatic injury. These enzymes are released into the blood in large quantities, following hepatocyte membrane damage, resulting in increased permeability. Thus, the absolute serum elevation of aminotransferases is a great diagnostic relevance for acute liver diseases (Fakurazi et al., 2008; Yuan et al., 2009). In this study, increased activity of both ALT and AST may be interpreted as a result of liver cell destruction, indicating the severity of hepatocellular damage after the acute administration of APAP to mice. As observed for the positive control drug NAC, our data shows that either the previous or the post-treatment with enalapril virtually suppressed the elevation of ALT and AST serum levels induced by APAP. This evidence supports the potential effectiveness of this ACE inhibitor for treating drug-induced liver failure.

NAC is a thiol-containing compound that is able to modulate the redox signaling and the intracellular GSH levels, what likely accounts for its beneficial effects on APAP-induced liver injury (Parasassi et al., 2010). To gain further insights

on the mechanisms implicated in the hepatoprotective actions of enalapril, we have assessed the effects of this drug on either the liver CAT activity (CAT) and GSH concentrations. The acute administration of APAP resulted in a significant increase of liver GSH concentrations, an event that was markedly reduced by prophylactic or therapeutic administration of enalapril. Relevantly, GSH is an antioxidant factor implicated in detoxification of noxious metabolites, protecting against drug-induced oxidative organ damage (Sener et al., 2003; Wang et al., 2010). In most situations of liver injury, the levels of GSH are found reduced, but in some cases, there is an increase of GSH, what might be interpreted as an attempt to reduce the oxidative stress (Liu et al., 2006). A similar profile for the modulation of GSH levels was observed in our study.

The enzymatic antioxidant defense systems are natural protective barriers against lipid peroxidation. Hydrogen peroxide is a product arising from cellular metabolism and is associated with various pathological alterations related to oxidative stress, including APAP-induced hepatotoxicity (Rojkind et al., 2002). CAT is an important scavenger of superoxide ion and hydrogen peroxide. Thus, it catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide molecules, making it an important enzyme for detoxification of this substance. In our study, the decreased levels of CAT activity following APAP administration were greatly reversed by the previous administration of enalapril, whereas the therapeutic regimen of treatment with either enalapril or NAC failed to significantly restore this parameter. In a study conducted by Morsy et al. (2010), the post-administration of hydrogen sulfide or NAC also failed to interfere with CAT activity in APAP-treated mice.

Liver oxidative injury induced by acute treatment with APAP was accompanied by neutrophil infiltration, as evidenced by an augmentation of tissue MPO activity levels. In fact, MPO-catalyzed oxidative reactions have been previously implicated in drug-related toxicity (Obach and Dalvie, 2006). In our study, the pre- or the post-administration of enalapril was able to widely reduce APAP-induced increase in MPO activity, as demonstrated for the reference compound NAC. One might suggest that hepatoprotective actions of enalapril might be related, at least partially, to its ability of modulating neutrophil-related oxidative stress reactions. In fact, neutrophil infiltration has been implicated in several models of liver injury in rodents, such as alcoholic hepatitis, ischemia/reperfusion and obstructive cholestasis (Liu et al., 2008).

As already mentioned, the initial events in the hepatotoxicity caused by APAP include the hepatocyte death by necrosis and apoptosis. This lead to secondary activation of the innate immune response involving the upregulation of cytokines, and the stimulation of inflammatory cells (Imaeda et al., 2009; Michael et al., 1999). $\text{TNF}\alpha$ is a pro-inflammatory cytokine, which has been pointed out as a primary mediator of liver damage and systematic toxicity (Wu et al., 2008). In fact, $\text{TNF}\alpha$ levels are known to be increased during APAP toxicity (Imaeda et al., 2009; Salam et al., 2005; Wu et al., 2008). In our study, APAP-induced increase of $\text{TNF}\alpha$ levels was not significantly modified by either the prophylactic or the therapeutic administration of enalapril, or by NAC administration. Supporting our data, Randle et al. (2008) demonstrated that hepatoprotective effects of prazosin in the APAP mouse model are likely independent on the production of pro-inflammatory cytokines, including $\text{TNF}\alpha$. Moreover, it was previously reported that APAP-induced hepatotoxicity was not reduced in $\text{TNF}\alpha$ null mouse, or by a $\text{TNF}\alpha$ neutralizing antibody (Boess et al., 1998). Therefore, it is possible to assume that protective actions of enalapril against APAP-evoked liver injury do not rely on the modulation of $\text{TNF}\alpha$ production.

To our knowledge, this is the first report showing the protective effects of the ACE inhibitor enalapril in a mouse model of hepatotoxicity induced by the acute APAP administration. Our data are perfectly aligned with previous literature evidence showing that enalapril is able to reduce hepatic fibrogenesis in rats (Türkay et al., 2008). Similarly, it was previously demonstrated that enalapril administration was able to reduce hepatic ischemia/reperfusion injury, in a rat model of syneigenic liver transplantation. Of high interest, it has been demonstrated that either captopril or enalapril reduced adryamicin-induced cardiac and hepatic damage in rats, by greatly preventing free radical generation (El-Aziz et al., 2001). Therefore, we might propose that in our experimental protocol, both the protective and the curative effects of enalapril are related to the modulation of liver cell redox state. Furthermore, ACE inhibitors both reduce the formation of angiotensin II and block bradykinin (BK) degradation (Ramalho et al., 2002). One might suggest that protective effects of enalapril against APAP-induced liver injury are likely mediated by angiotensin II inhibition and increased BK levels. In fact, ACE inhibitors improve liver regeneration following ischemia/reperfusion in rats by mechanisms dependent on BK B_2 receptor activation (Yayama et al., 2007). In addition, it has been recently demonstrated that

angiotensin II antagonists prevented ischemia/reperfusion liver injury, although they did not promote liver regeneration (Altés et al., 2009). When analyzed in concert, the results presented herein, and the literature data, allow us to suggest that ACE inhibitors might be useful clinical strategies for treating liver damage, especially in the cases of acute intoxication, via mechanisms involving angiotensin II, BK and free radical production. In the Figure 7, we propose a possible mechanism for explaining the protective and the curative effects of enalapril on APAP-induced liver injury. It is possible to assume that enalapril is able to interfere with liver cells homeostasis, mainly by reducing GSH levels, apoptosis grade and neutrophil migration, and to a lesser extent on CAT activity, resulting in diminished ALT and AST levels, without interfering with TNF α production. Whether or not these events are dependent on angiotensin II or BK modulation remains to be further analyzed.

Acknowledgements

M.R.B.B is a post-graduate student in Cellular and Molecular Biology (PUCRS), supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). L.F.L is an undergraduate Pharmacy student holding a fellowship from the Institution (BPA Program - PUCRS).

Figure Captions

Fig. 1. Effects of prophylactic and therapeutic treatment with enalapril on macroscopic analysis of mice exposed to APAP. (A) Prophylactic treatment. Data represents means \pm SEM (n= 6); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice). (B) Therapeutic treatment. Data represents means \pm SEM (n=10); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice); ##p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated mice). Macroscopic analysis of mice exposed to APAP: (C) saline group; (D) APAP control group; (E) Enalapril-treated group.

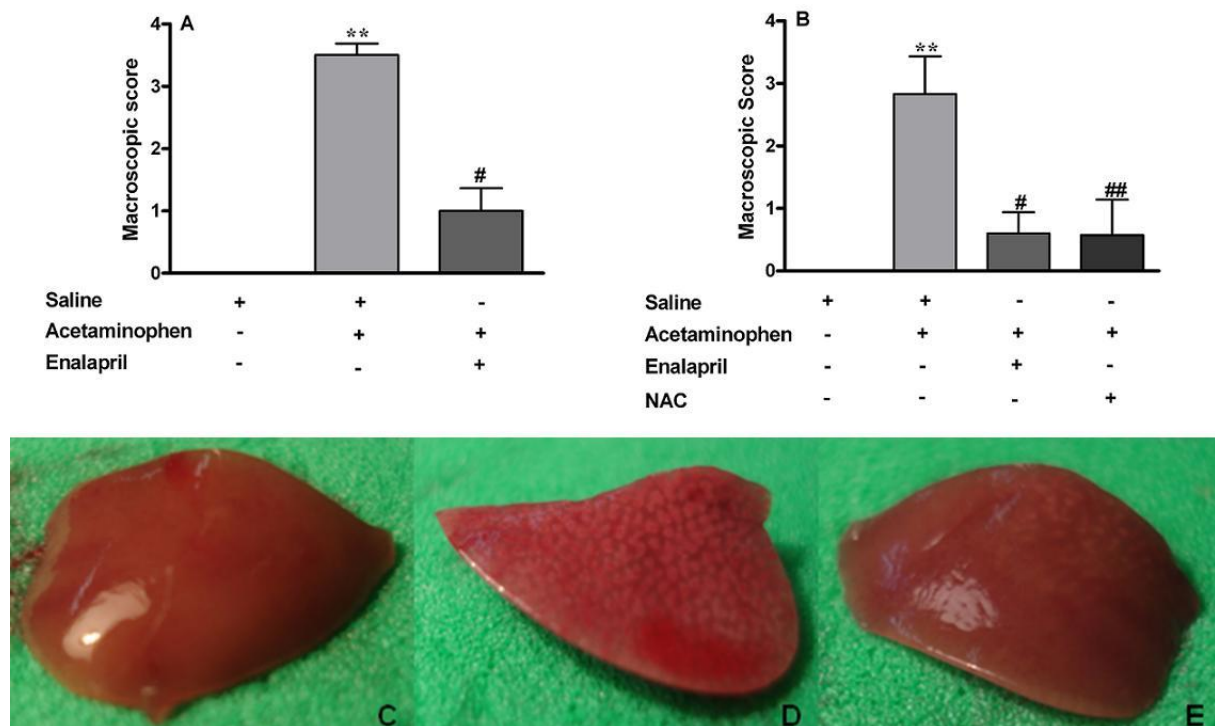


Fig. 2. Effect of prophylactic treatment enalapril on liver histology. A and B (Saline), (A) Hepatocytes with glycogen accumulation from the central lobular vein (HE, 20x magnification) and (B) Hepatocytes without changes (HE, 40x magnification); C and D (Acetaminophen), (C) Extensive area of coagulation necrosis, sometimes coalescent (*) with preservation of peri-portal hepatocytes (**) (HE, 10x magnification) and (D) Three to four layers of hepatocytes with coagulation necrosis moderate (+) with preservation of periportal hepatocytes (++) (HE, 20x magnification); E and F (Treatment with Enalapril), (E) Mixed inflammatory infiltrate in the central-lobular (*), followed by one to two layers hepatocellular swelling (**) (HE, 20x magnification) and (F) Inflammatory cells near the central lobular vein (*).

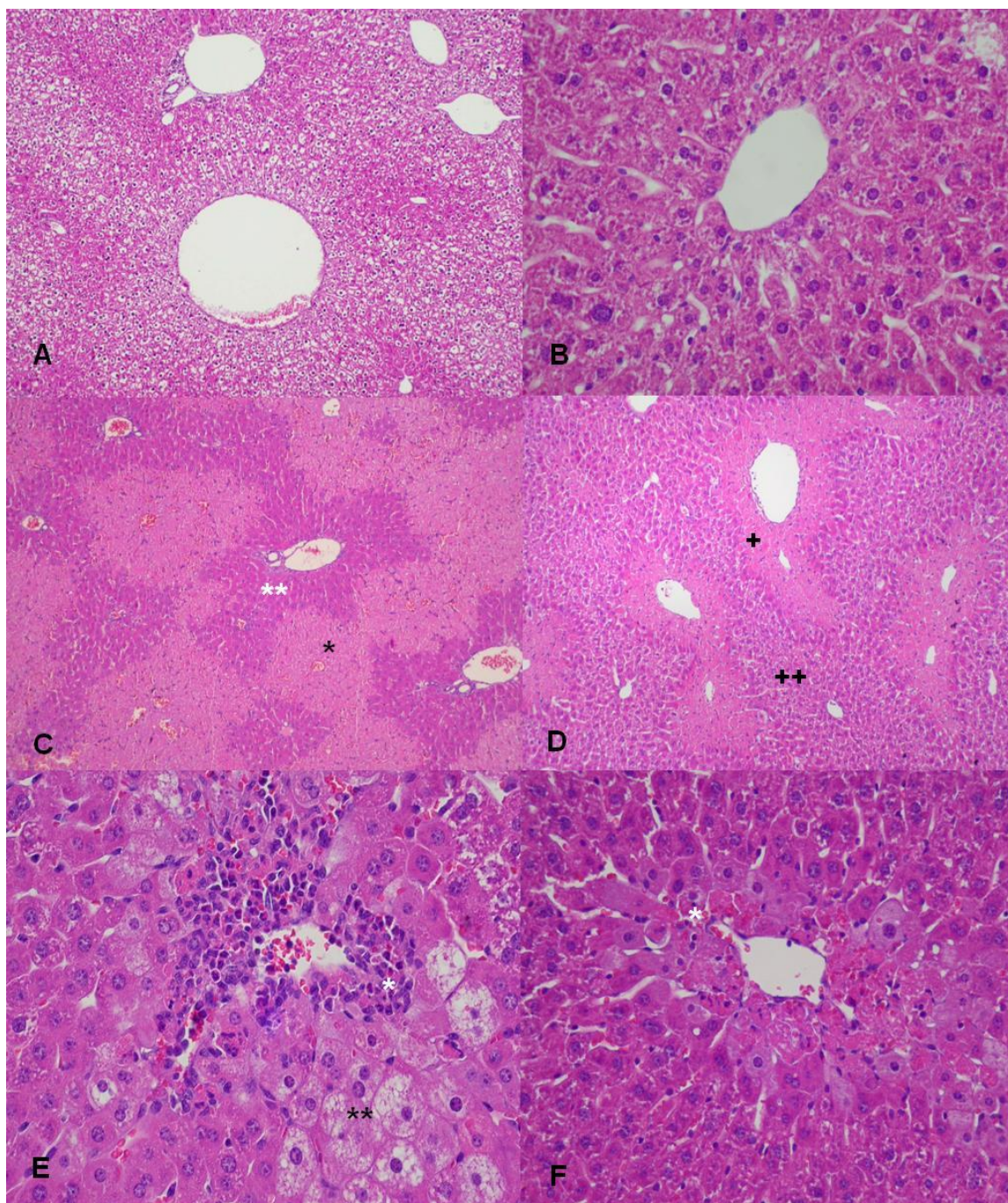


Fig. 3. Effect of prophylactic treatment enalapril on the immunopositivity for caspase-3 (20 x magnification). Mice were pre-treated with enalapril (30 mg/kg p.o.) before APAP (400 mg/kg i.p.) administration. Representative images showing the immunostaining for caspase-3 in saline (A); APAP (B); or enalapril (C) groups.

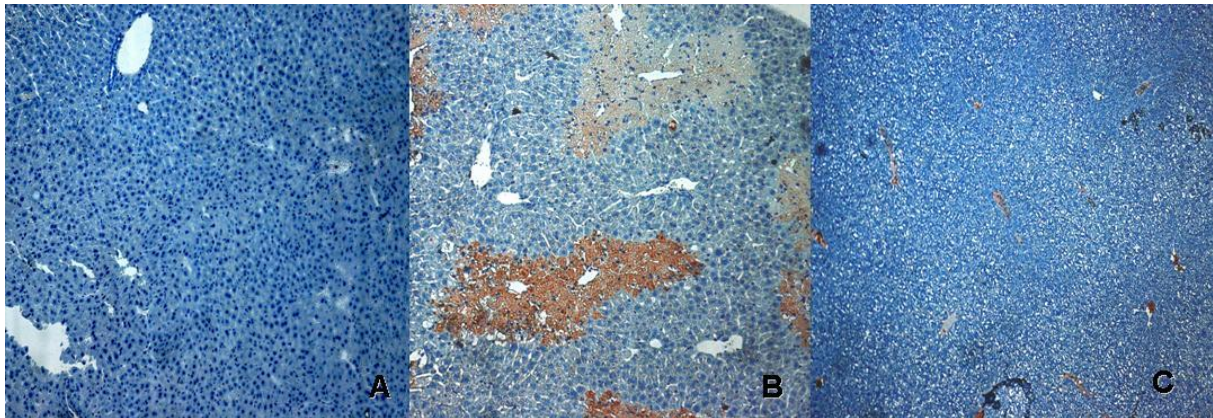


Fig. 4. Effects of enalapril treatment on ALT and AST activity. Mice were pre-treated with enalapril (30 mg/kg p.o.) before APAP (400 mg/kg i.p.) administration. (A) Serum ALT levels and (B) Serum AST levels in preventive treatment. Data represents means \pm SEM (n=6); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice). Mice were treated with enalapril (30 mg/kg p.o.) only after APAP (400 mg/kg i.p.) administration. (C) Serum ALT levels on therapeutic treatment. Data represents means \pm SEM (n=7); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice); ##p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated). (D) Serum AST levels in therapeutic treatment. Data represents means \pm SEM (n=7); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated); ###p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated mice).

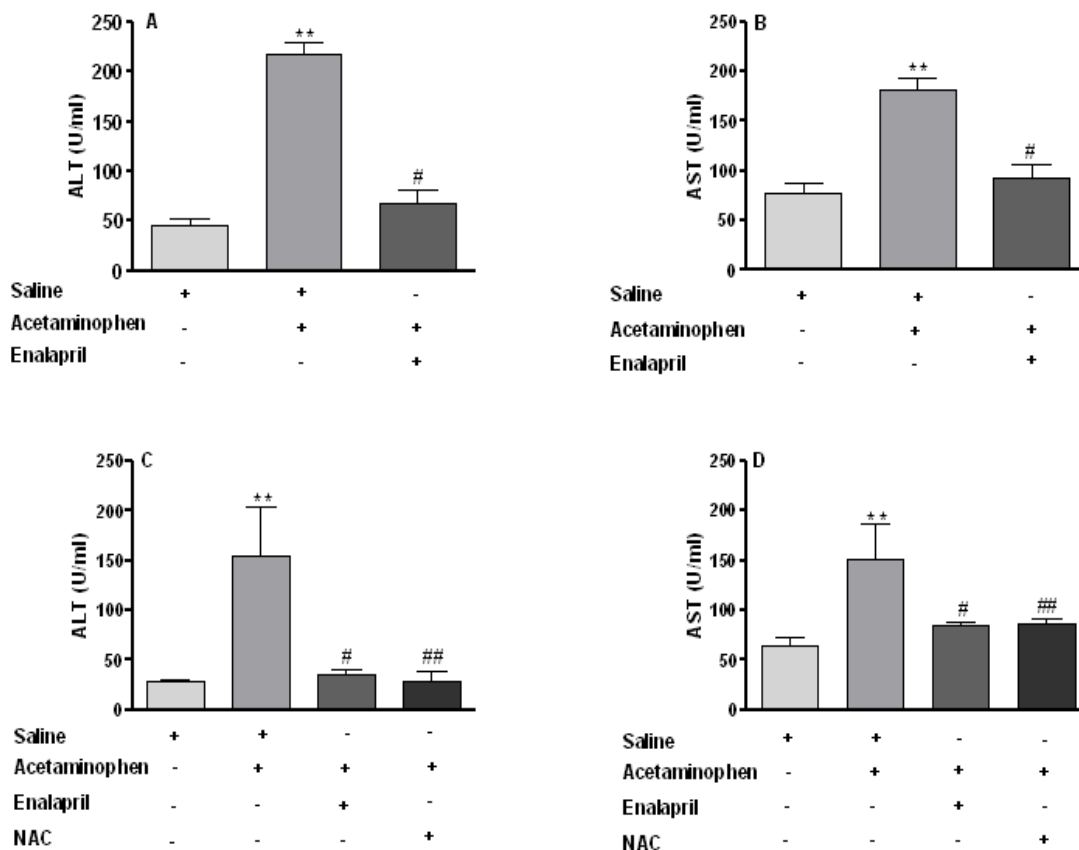


Fig 5. Activity of the antioxidant enzyme CAT and the endogenous levels of GSH mice exposed to APAP. (A) Activity of CAT following prophylactic treatment with enalapril. Data represents means \pm SEM (n=6); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice). (B) Levels of GSH in prophylactic treatment. Data represents means \pm SEM (n=7); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice). (C) Levels of GSH following therapeutic treatment with enalapril. Data represents means \pm SEM (n=7); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated mice); ###p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated mice).

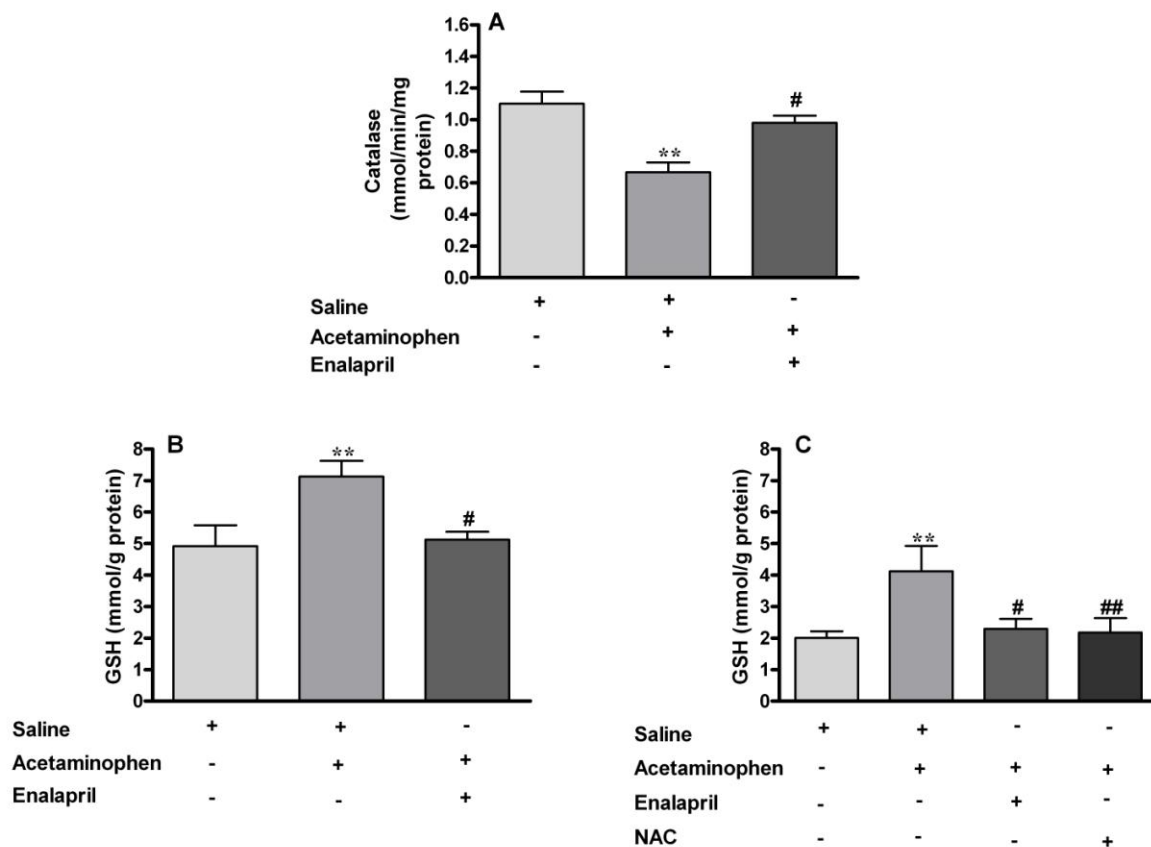


Fig. 6. Effects of treatment with enalapril on MPO activity of mice exposed to APAP. (A) MPO activity in prophylactic treatment. Data represents means \pm SEM (n=10); **p \leq 0.05 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated). (B) MPO activity in therapeutic treatment. Data represents means \pm SE (n=10); **p \leq 0.01 (compared to saline-treated controls); #p \leq 0.05 (compared to acetaminophen-treated); ##p \leq 0.01 (compared to acetaminophen-treated mice).

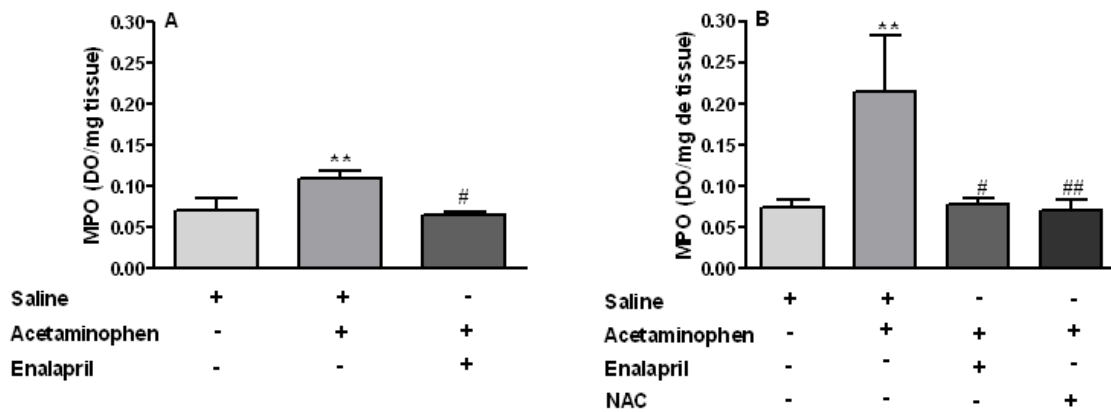
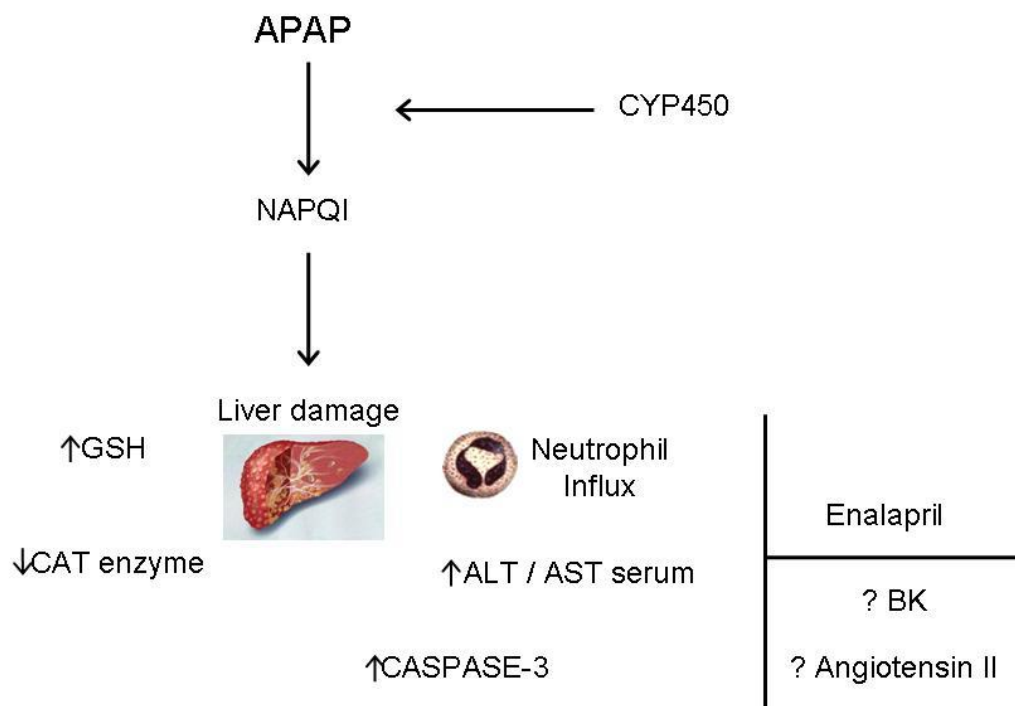


Fig.7. Proposed mechanism of action of Enalapril in the APAP mouse model of hepatotoxicity.



References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Altés, S.P., Gou, R.F., Boillot, O., Serafin, A., Rimola, A., Arroyo, V., Rodés, J., Peralta, C., Catafau, J.R., 2009. Effect of angiotensin II and bradykinin inhibition in rat reduced-size liver transplantation. *Liver Transpl.* 15, 313-320.
- Bauer, I., Vollmar, B., Jaeschke, H., Rensing, H., Kraemer, T., Larsen, R., 2000. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J. Hepatol.* 33, 395-406.
- Bebarta, V.S., Kao, L., Froberg, B., Clark, R.F., Lavonas, E., Qi, M., Delgado, J., McDonagh, J., Arnold, T., Odujebi, O., O'Malley, G., Lares, C., Aguilera, E., Dart, R., Heard, K., Stanford, C., Kokko, J., Bogdan, G., Mendoza, C., Mlynarchek, S., Rhyee, S., Hoppe, J., Haur, W., Tan, H.H., Tran, N.N., Varney, S., Zosel, A., Buchanan, J., Al-Heljal, M., A multicenter comparison of the safety of oral versus intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen overdose. *Clin. Toxicol.* 48(5), 424-430.
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., Leone, S., 2006. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Reviews.* 12, 250-275.
- Boess, F., Bopst, M., Althaus, R., Polsky, S., Cohen, S.D., Fugster, H.P., Boelsterli, U.A., 1998. Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin- α gene knockout mice. *Hepatology.* 27, 1021-1029.
- Canchihuamán, J.P., Méndez, O.P., Muñoz, R.H., Duran, P.T., Oropez, M.J., 2010. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids Health Dis.* 9, 35.
- Cavanagh, E.M.V., Inserra, F., Ferder, L., Fraga, C.G., 2000. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278, R572-R577.
- Chandrasekaran, V.R.M., Periasamy, S., Liu, L.L., Liu, M.Y., 2010. 17 β -Estradiol protects against acetaminophen-overdose-induced acute oxidative hepatic damage and increases the survival rate in mice. *Steroids.*
- Coen, M., Lenz, E.M., Nicholson, J.K., Wilson, I.D., Pognan, F., Lindon, J.C., 2003. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 295-303.
- El-Aziz, M.A., Othman, A.I., Amer, M., El-Missiry, M.A., 2001. Potential protective role of angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* 21, 469-473.
- Fakurazi, S., Hairuszah, I., Nanthini, U., 2008. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2611-2615.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Campos, M.M., Araújo, J.G.V.C., Pesquero, J.L., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2003. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B₁ receptors in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* 139, 973-981.
- Fernandes E.S., Passos G.F., Campos M.M., Souza G.E.P., 2005. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B₁ receptor expression. *Br. J. Pharmacol.* 146, 209-216.
- Fontana, R.J., 2008a. Acute liver failure due to drugs. *Semin. Liver Dis.* 28, 175-189.
- Fontana, R.J., 2008b. Acute liver failure including acetaminophen overdose. *Med. Clin. North Am.* 92(4), 761-794.

- Harbior, A., 1992. Effect of captopril on glutathione level in the liver and paracetamol-induced liver damage in rats. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 87(6), 332-340.
- Heard K.J., 2008. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N. Engl. J. Med.* 359(3), 285-292.
- Holt, M.P., Cheng, L., Ju, C., 2008. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1410-1421.
- Imaeda, A.B., Watanabe, A., Sohail, M.A., Mahmood, S., Mohamadnejad, M., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Mehal, W., 2009. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J. Clin. Invest.* 119, 305-314.
- Ito, Y., Bethea, N.W., Abril, E.R., Mccuskey, R.S., 2003. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation.* 10, 391-400.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., McGrill, M.R., Farhooh, A., 2010. Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity. *World J. Gastroenterol.* 16(19), 2448-2450.
- Kanter, M.Z., 2006. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 63, 1079-2082.
- Larson, A.M., 2007. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin. Liver Dis.* 11, 525-548.
- Liu, Z.X., Han, D.H., Gunawan, B., Kaplowitz, N., 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology.* 43, 1220-1230.
- Michael, S.L., Pumford, N.R., Mayeux, P.R., Niesman, M.R., Hinson, J.A., 1999. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology.* 30, 186-195.
- Millea, P.J., 2009. N-acetylcysteine: multiple clinical Applications. *Am. Fam. Physician.* 80(3), 265-269.
- Morsy, M. A., Ibrahim, S. A., Abdelwahab, S. A., Zedan, M. Z., Elbitar, H. I., 2010. Curative effects of hydrogen sulfide against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci.* 87(23-26), 692-698.
- Myers, S. H., Laporte, D. M., 2009. Acetaminophen: safe use and associated risks. *JHS.* 34.
- North, T.E., Babu, I.R., Vedder, L.M., Lord, A.M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Zon, L.I., Goessling, W., 2010. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(40), 17315-17320.
- Obach, R.S., Dalvie, D.K., 2006. Metabolism of nomifensine to a dihydroisoquinolinium ion metabolite by human myeloperoxidase, hemoglobin, cytochrome P450 enzymes. *DMD.* 34, 1310-1316.
- Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., Spirito, M., Krasnowska, E., Lundeberg, T., Pittaluga, E., Ursini, F., 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Scientific World Journal.* 29(10), 1192-1202.
- Ramalho, F.S., Ramalho, L.N., Silva, O., Zucoloto, S., Corrêa, F.M., 2002. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepatogastroenterology.* 49(47), 1347-1351.
- Randle, L.E., Sathish, J.G., Kitteringham, N.R., Macdonald, I., Williams, D.P., Park, B.K., 2008. α 1- Adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Br. J. Pharmacol.* 153, 820-830.

- Rojkind, m., Rosales, J.A.D., Nieto, N., Greenwel, P., 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(11), 1872-1891.
- Rowden, A.K., Norvell, J., Eldridge, D.L., Kirk, M.A., 2006. Acetaminophen poisoning. *Clin. Lab. Med.* 26, 49-65.
- Salam, O.M.E.A., Baiuomy, A.R., El-Shenawy, S.M., Hassan, N.S., 2005. Effect of pentoxifylline on hepatic injury caused in the rat by the administration of carbon tetrachloride or acetaminophen. *Pharmacol. Rep.* 57, 596-603.
- Sener, G., Sehirli, A.Ö., Ayanoglu-Dülger, G., 2003. Protective effects of melatonin, vitamine E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J. Pineal Res.* 35, 61-68.
- Shim, J.Y., Kim, M.H., Kim, H.D., Ahn, J.Y., Yun, Y.S., Song, J.Y., 2010. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 318–325.
- Smith, H.S., 2009. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician.* 12, 269-280.
- Souza, D.G., Cassali, G.D., Poole, S., Teixeira, M.M., 2001. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology.* 134(5), 985-994.
- Sukamoto, K.I., Sugimoto, K.I., Sudoh, T., Fujimura, A., 2005. Different effects of imidapril and enalapril on aminopeptidase P activity in the mouse trachea. *Hypertens. Res.* 28, 243-247.
- Suzuki, A., Yuen, N., Walsh, J., Papay, J., Hunt, C.M., Diehl, A. M., 2009. Co-mediations that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 882-888.
- Türkay, C., Yönm, O., Arıcı, S., Koyuncu, A., Kanbay, M., 2008. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. *Dig. Dis. Sci.* 53, 789-793.
- Walker, R., Racz, W., Mcelligott, T., 1980. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Lab. Invest.* 42, 181–189.
- Wang, A.Y., Lian, L.H., Jiang, Y.Z., Wu, Y.L., Nan, J.X., 2010. *Gentiana manshurica* Kitagawa prevents acetaminophen induced acute hepatic injury in mice via inhibiting JNK/ERK MAPK pathway. *World J. Gastroenterol.* 16(3), 384-391.
- Williams, C.D., Farhood, A., Jaeschke, H., 2010. Role of caspase-1 and interleukin-1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 169-178.
- Wu, Y.L., Piao, D.M., Han, X.H., Nan, J.X., 2008. Protective effects of salidroside against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31(8), 1523-1529.
- Yapar, K., Kart, A., Karapehlivan, M., Atakisi, O., Tunca, R., Erginsoy, S., Cital, M., 2007. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 121-128.
- Yayama, K., Sugiyama, K., Miyagi, R., Okamoto, H., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol. Pharm. Bull.* 30(3), 591-594.
- Yee, S. B., Bourdi, M., Masson, M. J., Pohl, L. R., 2007. Hepatoprotective role of endogenous interleukin-13 in a murine model of acetaminophen-induced liver disease. *Chem. Res. Toxicol.* 20(5), 734-744.

- Yeung J.H., 1988. Effect of sulphhydryl drugs on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 6(3-4), 295-301.
- Yuan, H.D., Jun, G.Z., Piao, G.C., 2009. Protective effects of the active part of *Artemisia sacrorum* Ledeb. Against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32(10), 1683-1688.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agentes terapêuticos modernos têm contribuído favoravelmente contra as várias morbidades que acometem a humanidade. A terapêutica medicamentosa é essencial para o controle da maioria destas morbidades, no entanto, deve-se considerar que não existem fármacos completamente seguros, visto que todos, em maior ou menor grau, podem desencadear reações adversas a medicamentos (RAM), definidas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), como “qualquer resposta prejudicial ou indesejável e não intencional que ocorre com medicamentos em doses normalmente utilizadas no homem para profilaxia, diagnóstico, tratamento de doença ou para modificação de funções fisiológicas” (Edward *et al.*, 2000; WHO, 2002). RAMs ocorrem frequentemente em pacientes com hipersensibilidade ou, que tiveram alguma reação adversa anterior e, ainda, após a tolerância ao medicamento com o aumento de dose, podendo predispor um quadro de toxicidade (Magalhães *et al.*, 2001).

As RAMs constituem um problema importante na prática do profissional da saúde. Sabe-se que essas reações são causas significativas de hospitalização, de aumento do tempo de permanência hospitalar e até mesmo de óbito. Além disso, elas afetam negativamente a qualidade de vida do paciente (Wu *et al.*, 1996). Dados sugerem que estas reações são responsáveis por uma proporção maior de doenças hepáticas do que se acreditava previamente. A lesão hepática induzida por medicamentos (DILI) é a principal causa de descontinuação do desenvolvimento de drogas e de ações regulatórias de drogas previamente aprovadas. Muitos casos de DILI demonstraram prevalência em pacientes mulheres e em pacientes que evoluíram para lesão aguda no fígado (ALF) (Ostapowicz *et al.*, 2002; Bjornsson *et*

al., 2005; Fontana 2008b). Na prática clínica, muitos agentes potencialmente hepatotóxicos continuam sendo utilizados. Alguns, como o acetaminofeno (APAP) são hepatotóxicos em superdosagens, sendo comum a tentativa de suicídio com esta medicação no Reino Unido (Fontana, 2008b; Randle *et al.*, 2008; Lopez, 2009; Morsy *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010).

O APAP (N-acetil-p-aminofenol), também conhecido como paracetamol, é um fármaco com propriedades analgésicas e efeitos antipiréticos, mas sem ação antiinflamatória significativa (Grypioti *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Myers e Laporte, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; North *et al.*, 2010). Atualmente, existe em várias formas de apresentação, como cápsulas, comprimidos, gotas, xaropes e injetáveis, sendo desta forma uma das substâncias mais utilizadas na clínica; porém, é altamente perigoso devido ao seu alto potencial hepatotóxico, não devendo ser utilizados mais que 4 g diários. Crianças com menos de 37 kg tem a dose limite diária em 80 mg/kg. Em indivíduos adultos, pode ocorrer toxicidade em doses únicas de 10 - 15 g (150 - 250 mg/kg) e uma dose de 20 a 25 g pode levar a óbito (Chun *et al.*, 2009; Myers e Laporte, 2009 Jaeschke *et al.*, 2010).

Quimicamente, o APAP é um composto p-aminofenólico. Os derivados p-aminofenólicos são compostos de síntese derivados da anilina (APAPe fenacetina), que se distinguem pelos seus efeitos tóxicos. Farmacologicamente, as ações analgésicas de APAP ocorrem a nível periférico ou central. Ao nível periférico, o efeito do APAP está relacionado com a capacidade de modular os receptores. Já, ao nível central, está relacionado à medula espinhal e ao tronco cerebral, onde exerce suas ações na transmissão nociceptiva. No entanto, a ação antiinflamatória é fraca ou inexistente. O APAP não é capaz de inibir a COX quando existem peróxidos e radicais livres em concentrações elevadas. É importante ressaltar que, em locais de

inflamação, normalmente existem grandes concentrações de peróxidos produzidos pelos leucócitos. Quando há peróxidos e radicais livres indicadores de inflamação (mensageiros pós-inflamatórios) a COX fica ativada e produz prostaglandinas (Bertolini *et al.*, 2006). Todavia, a ação antipirética pode ser explicada pela capacidade de inibir a COX no cérebro, onde o conteúdo de peróxidos é baixo (Bertolini *et al.*, 2006; Högestätt *et al.*, 2006; Smith, 2009).

O APAP, apesar de já ser usado há mais de um século e haver mecanismos descritos para tal substância, seu modo de ação ainda não está claro. Estudos recentes fornecem evidências de um novo mecanismo de ação, através do qual o APAP poderia exercer seus efeitos analgésicos. Há indicações de que o efeito antinociceptivo do APAP é mediado por alvos moleculares diferentes da COX e, é este ponto que os pesquisadores estão investigando atualmente. O estímulo para estes estudos é a estreita relação entre a estrutura do APAP e da N-araquidonoilfenolamina (AM404), a qual tem efeitos nos receptores canabinóides CB1. Os receptores CB1 estão envolvidos nos mecanismos da dor e da termoregulação e são vistos como alvos promissores no tratamento da dor e da inflamação. A relação estrutural entre a AM404 e o APAP sugere que, seguindo a desacetilação em seu metabólito p-aminofenol, o APAP pode ser conjugado com o ácido araquidônico para formar AM404 (Hogestatt, 2005).

O APAP é rapidamente e quase completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, com uma distribuição relativamente uniforme ao longo da maior parte dos fluidos corporais. Ele é metabolizado no organismo pelas enzimas microssomais hepáticas. Durante a permanência do fármaco no organismo, este é biotransformado/metabolizado, ou seja, a molécula sofre a ação de enzimas que mantêm o metabolismo normal do organismo, modificando a sua estrutura e,

consequentemente, as suas características físico-químicas e farmacológicas, podendo gerar moléculas mais simples ou mais complexas. Assim, o APAP é metabolizado pelo sistema de enzimas citocromo P450. Os citocromos oxidam o APAP produzindo uma substância intermediária muito reativa, a N-acetil-p-benzoquinonimina (NAPQI). Em condições normais a NAPQI é neutralizada pela ação da glutathione (Bertolini *et al.*, 2006; Grypioti *et al.*, 2008; Chun *et al.*, 2009; Lopez, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010). Em situações de toxicidade por APAP, a quantidade de GSH é esgotada pela NAPQI, que por sua vez, pode reagir livremente com as membranas celulares, causando muitos danos e morte de muitos hepatócitos, resultando em seguida a necrose hepática aguda (Bertolini *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2008; Chandrasekaran *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010). Após a *overdose* de APAP, os principais sintomas são alterações gastrintestinais não específicas como náuseas e vômitos, que desaparecem com o tempo; após alterações bioquímicas começam a aparecer mudanças que evoluem para necrose hepatocelular. Ao final, o paciente intoxicado se recupera ou morre de insuficiência hepática (Rowden *et al.*, 2006; Bataller, 2007; Fontana, 2008a; Lopez, 2009).

Atualmente, o tratamento inicial para uma superdosagem é o mesmo utilizado para as *overdoses* comuns, ou seja, a lavagem gástrica. Adicionalmente, administra-se o antídoto, NAC, por via endovenosa ou oralmente. A absorção do APAP pelo trato gastrointestinal é completa ao fim de quatro horas em circunstâncias normais. Por este motivo, a lavagem gástrica só tem vantagem se for utilizada durante este período. Nestas circunstâncias, o médico deve decidir se é suficiente a administração de carvão ativado, que diminui a absorção do APAP (Vale *et al.*, 2004).

O NAC funciona como antídoto, reduzindo a toxicidade do APAP ao fornecer grupos sulfidrilos (principalmente na forma de GSH) que neutralizam o metabólito tóxico, prevenindo o dano aos hepatócitos, podendo ser seguramente excretado. A eficácia da NAC é bastante significativa se administrado até 8 horas após a intoxicação por APAP. Assim, como descrito, quanto mais cedo se administrar a NAC, maiores são os benefícios (Keays *et al.*, 1991). No entanto, a administração de NAC por via oral pode ser acompanhada de náuseas e vômitos, bem como, da ocorrência de reações anafiláticas quando administrado por via endovenosa (Kanter *et al.*, 2006; Heard, 2008). Neste sentido, considerando as inúmeras desvantagens do NAC, o estudo de outras substâncias é de grande relevância para o tratamento de pacientes intoxicados com APAP.

A enzima conversora da angiotensina (ECA), também chamada de cininase II, é responsável pela síntese da angiotensina II, o produto final da cascata renina-angiotensina. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina possuem dois mecanismos distintos: (i) impedem a conversão da angiotensina I em seu metabólito ativo, angiotensina II e; (ii) bloqueiam a degradação das cininas. Estes fármacos, como o enalapril, são utilizados no tratamento clínico da hipertensão arterial sistêmica, da insuficiência cardíaca congestiva e da nefropatia diabética (Takai *et al.*, 1996; Cavanagh *et al.*, 2000; Ramalho *et al.*, 2002; Altés *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostraram que inibidores da ECA protegeram contra o dano hepático causado por isquemia/reperfusão em modelos de transplante de fígado. Além disto, estes inibidores favoreceram a regeneração hepática após a hepatectomia parcial (Altés *et al.*, 2009). Outros dados na literatura mostraram que enalapril foi capaz de reduzir a fibrinogênese hepática em ratos (Türkay *et al.*, 2008). Também, resultados similares demonstraram que o captopril e o enalapril

preveniram o dano cardíaco e hepático em ratos que receberam o quimioterápico, adriamicina, por prevenir a geração de radicais livres (El-Aziz *et al.*, 2001).

O enalapril, depois de administrado, é absorvido e sofre uma hidrólise, formando o enalaprilat, que é um inibidor da ECA de especificidade alta, de longa ação e não sulfidrílico. O enalapril, como mencionado anteriormente, inibe a formação de angiotensina II, um potente vasoconstritor (substância que diminui o calibre dos vasos sanguíneos e aumenta a pressão arterial). Portanto, a inibição da ECA resulta em uma redução dos níveis plasmáticos de angiotensina II e, como consequência, a uma diminuição da atividade vasopressora. O início da ação do maleato de enalapril é suave e gradativo; inicia-se dentro de uma hora e seus efeitos geralmente continuam por 24 horas. Desta maneira, pode-se sugerir que os efeitos protetores do enalapril contra lesão hepática induzida por APAP, observados no presente estudo, se devem, provavelmente, à inibição da angiotensina II ou ao aumento dos níveis de bradicinina (BK).

O presente trabalho investigou como o uso do enalapril poderia representar uma nova abordagem terapêutica para o controle da hepatotoxicidade induzida por APAP. Nossos resultados mostraram que a administração de APAP em camundongos C57BL/6 induziu toxicidade significativa sobre os tecidos hepáticos, que apresentaram necrose celular ou degeneração hepática, acompanhada por aumento de caspase-3. Estas mudanças apresentaram modificações específicas, como aumento das enzimas ALT e AST, bem como aumento de GSH e infiltração de neutrófilos, como ocorre normalmente nas inflamações. Ademais, a ação do APAP diminuiu os níveis da atividade de CAT e aumentou a produção de TNF α . A administração de enalapril, em esquemas de pré- e pós-tratamento, foi capaz de interferir com as alterações ocorridas no fígado durante a intoxicação por APAP,

revertendo, em grande parte, os parâmetros que foram avaliados. Quando analisados em conjunto, os resultados aqui apresentados, e os dados da literatura, permitem sugerir que os inibidores da ECA, como o enalapril, pode ser útil estratégias clínicas para o tratamento de lesões hepáticas, através de mecanismos que possivelmente envolvem a produção de angiotensina II, a BK e de radicais livres, além da migração de neutrófilos.

REFERÈNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Altés, S.P., Gou, R.F., Boillot, O., Serafín, A., Rimola, A., Arroyo, V., Rodés, J., Peralta, C., Catafau, J.R., 2009. Effect of angiotensin II and bradykinin inhibition in rat reduced-size liver transplantation. *Liver Transpl.* 15, 313-320.
- Anderson, B.J., 2008. Paracetamol (acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr. Anaesth.* 18, 915-921.
- Bataller, R.M., 2007. Evidence for practice: education about the dangers of acetaminophen. *J. Emerg. Nurs.* 33, 327-330.
- Bauer, I., Vollmar, B., Jaeschke, H., Rensing, H., Kraemer, T., Larsen, R., 2000. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J. Hepatol.* 33, 395-406.
- Bebarta, V.S., Kao, L., Froberg, B., Clark, R.F., Lavonas, E., Qi, M., Delgado, J., McDonagh, J., Arnold, T., Odujebi, O., O'Malley, G., Lares, C., Aguilera, E., Dart, R., Heard, K., Stanford, C., Kokko, J., Bogdan, G., Mendoza, C., Mlynarchek, S., Rhyee, S., Hoppe, J., Haur, W., , Tan, H.H., Tran, N.N., Varney, S., Zosel, A., Buchanan, J., Al-Helial, M., 2010. A multicenter comparison of the safety of oral versus intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen overdose. *Clin. Toxicol.* 48(5), 424-430.
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., Leone, S., 2006. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Reviews.* 12, 250-275.
- Bjornsson, E., Olsson, R., 2005. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology.* 42,481-489.

- Boess, F., Bopst, M., Althaus, R., Polsky, S., Cohen, S.D., Fugster, H.P., Boelsterli, U.A., 1998. Acetaminophen hepatotoxicity in tumor necrosis factor/lymphotoxin- α gene knockout mice. *Hepatology*. 27, 1021-1029.
- Bond, G.R., 2009. Acetaminophen protein adducts: a review. *Clin. Toxicol.* 47, 2-7.
- Brok, J., Buckley, N., Gluud, C., 2006. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst. Rev.* 19(2).
- Canchihuamán, J.P., Méndez, O.P., Muñoz, R.H., Duran, P.T., Oropez, M.J., 2010. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids Health Dis.* 9, 35.
- Cavanagh, E.M.V., Inserra, F., Ferder, L., Romano, L., Ercole, L., Fraga, C.G., 1995. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are increased by enalapril and captopril in mouse liver. *FEBS Letters* 361, 22-24.
- Cavanagh, E.M.V., Inserra, F., Ferder, L., Fraga, C.G., 2000. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278, R572-R577.
- Chandrasekaran, V.R.M., Periasamy, S., Liu, L.L., Liu, M.Y., 2010. 17 β -Estradiol protects against acetaminophen-overdose-induced acute oxidative hepatic damage and increases the survival rate in mice. *Steroids*.
- Chun, L.J., Tong, M.L., Busuttil, R.W., Hiatt, J. R., 2009. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *J. Clin. Gastroenterol.* 43, 342-349.
- Coen, M., Lenz, E.M., Nicholson, J.K., Wilson, I.D., Pognan, F., Lindon, J.C., 2003. An integrated metabolomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 295-303.

- Dai, G., He, L., Chou, N., Wan, Y.J.Y., 2006. Acetaminophen metabolism does not contribute to gender difference in its hepatotoxicity in mouse. *Toxicol. Sci.* 92, 33-41.
- Edwards, I.R., Aronson, J.K., 2000. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet.* 356(9237), 1255-1259.
- El-Aziz, M.A., Othman, A.I., Amer, M., El-Missiry, M.A., 2001. Potential protective role of angiotensin-converting enzyme inhibitors captopril and enalapril against adriamycin-induced acute cardiac and hepatic toxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* 21, 469-473.
- Fakurazi, S., Hairuszah, I., Nanthini, U., 2008. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2611-2615.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Campos, M.M., Araújo, J.G.V.C., Pesquero, J.L., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2003. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B₁ receptors in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* 139, 973-981.
- Fernandes E.S., Passos G.F., Campos M.M., Souza G.E.P., 2005. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B₁ receptor expression. *Br. J. Pharmacol.* 146, 209-216.
- Fontana, R.J., 2008a. Acute liver failure due to drugs. *Semin. Liver Dis.* 28, 175-189.
- Fontana, R.J., 2008b. Acute liver failure including acetaminophen overdose. *Med. Clin. North Am.* 92(4), 761-794.
- Grypioti, A., D., Kostopanagiotou, G., Demopoulos, C.A., Roussos, A., Mykoniatis, M., 2008. Platelet activating factor (PAF) antagonism with ginkgolide B protects the liver against acute injury. Importance of controlling the receptor of PAF. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1054-1062.

- Harbior, A., 1992. Effect of captopril on glutathione level in the liver and paracetamol-induced liver damage in rats. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 87(6), 332-340.
- Heard K.J., 2008. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N. Engl. J. Med.* 359(3), 285-292.
- Högestätt E.D., Jönsson B.A., Ermund A., Andersson D.A., Björk H., Alexander J.P., Cravatt B.F., Basbaum A.I., Zygmunt P.M., 2005. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J. Biol. Chem.* 280, 31405-31412.
- Holt, M.P., Cheng, L., Ju, C., 2008. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1410-1421.
- Imaeda, A.B., Watanabe, A., Sohail, M.A., Mahmood, S., Mohamadnejad, M., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Mehal, W., 2009. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J. Clin. Invest.* 119, 305-314.
- Ito, Y., Bethea, N.W., Abril, E.R., Mccuskey, R.S., 2003. Early hepatic microvascular injury in response to acetaminophen toxicity. *Microcirculation.* 10, 391-400.
- Jackson, E.K., Garrison, J.C., 2003. Renin and angiotensin. In: Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth ed. McGraw-Hill, New York.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., McGrill, M.R., Farhooh, A., 2010. Herbal extracts as hepatoprotectants against acetaminophen hepatotoxicity. *World J. Gastroenterol.* 16(19), 2448-2450.

- Kanter, M.Z., 2006. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 63, 1079-2082.
- Keays, R., Harrison, P., Wendon, J., Forbes, A., Gove, C., Alexander, G., Williams, R., 1991. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *BMJ* 303 (6809), 1026-1029.
- Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E., Chalasani, N., 2008. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*. 47(6).
- Larson, A.M., 2007. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin. Liver Dis.* 11, 525-548.
- Lazebnik, L.B., Mikheeva, O.M., Drozdov, V.N., Petrakov, A.V., Sil'vestrova, S., 2007. Pharmacokinetics of enalapril and metoprolol in hypertensive patients with hepatic pathology. *Ter. Arkh.* 79(9), 18-25.
- Liu, Z.X., Han, D.H., Gunawan, B., Kaplowitz, N., 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*. 43, 1220-1230.
- Lopez, D. P., 2009. Acetaminophen poisoning. *AJN*. 109.
- Magalhães, S.M.S., Carvalho, W.S., 2001. *Reações Adversas a Medicamentos. Ciências Farmacêuticas. Uma Abordagem em Farmácia Hospitalar.* Atheneu. São Paulo.
- Mazer M., Perrone J., 2008. Acetaminophen induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J. Med. Toxicol.* 4(1), 2-6.
- Michael, S.L., Pumford, N.R., Mayeux, P.R., Niesman, M.R., Hinson, J.A., 1999. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology*. 30, 186–195.

- Millea, P.J., 2009. N-acetylcysteine: multiple clinical Applications. *Am. Fam. Physician.* 80(3), 265-269.
- Morais, F.V., Molina, H.M., Borges, D.R., Kouyoumdjian, M. 1999. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado *ex-vivo*. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 45, 19-23.
- Morsy, M. A., Ibrahim, S. A., Abdelwahab, S. A., Zedan, M. Z., Elbitar, H. I., 2010. Curative effects of hydrogen sulfide against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci.* 87(23-26), 692-698.
- Murray, K.F., Hadzic, N., Wirth, S., Bassett, M., Kelly, D., 2008. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 47, 395-405.
- Myers, S. H., Laporte, D. M., 2009. Acetaminophen: safe use and associated risks. *JHS.* 34.
- North, T.E., Babu, I.R., Vedder, L.M., Lord, A.M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Zon, L.I., Goessling, W., 2010. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(40), 17315-17320.
- Obach, R.S., Dalvie, D.K., 2006. Metabolism of nomifensine to a dihydroisoquinolinium ion metabolite by human myeloperoxidase, hemoglobin, cytochrome P450 enzymes. *DMD.* 34, 1310-1316.
- Ostapowicz, G.A., Fontana, R.J., Schiodt, F.V., 2002. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann. Intern. Med.* 137, 947–954.
- Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., Spirito, M., Krasnowska, E., Lundeberg, T., Pittaluga, E., Ursini, F., 2010. Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *Scientific World Journal.* 29(10), 1192-1202.

- Ramachandran, A., Lebofsky, M., Baines, C.P., Lemasters, J.J., Jaeschke, H., 2010. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic. Res.* 0(0), 1-9.
- Ramalho, F.S., 2000. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. *Acta Cir. Bras.* 15(2).
- Ramalho, F.S., Ramalho, L.N.Z., Zucoloto, S., Silva, O.S., Corrêa, F.M.A., 2000. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. *Acta Cir. Bras.* 15(2).
- Ramalho, F.S., Ramalho, L.N., Silva, O., Zucoloto, S., Corrêa, F.M., 2002. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepatology.* 49(47), 1347-1351.
- Randle, L.E., Sathish, J.G., Kitteringham, N.R., Macdonald, I., Williams, D.P., Park, B.K., 2008. α 1- Adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Br. J. Pharmacol.* 153, 820-830.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., 2007. *Fármacos antiinflamatórios e imunossupressores.* Sixth ed. Elsevier.
- Roberts, L.J., Morrow, J.D., 2003. *Analgésico-Antipiréticos, Agentes Antiinflamatórios e Fármacos utilizados no tratamento da gota.* Tenth ed. Mc Graw-Hill, New York.
- Rojkind, m., Rosales, J.A.D., Nieto, N., Greenwel, P., 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(11), 1872-1891.
- Ronsein, G.E., Guidi, D.B., Benassi, J.C., Filho, D.W., Pedrosa, R.C., Pedrosa, R.C., 2005. Cytoprotective effects of carvedilol against oxygen free radical generation in rat liver. *Redox Rep.* 10(3), 131-137.

- Rowden, A.K., Norvell, J., Eldridge, D.L., Kirk, M.A., 2006. Acetaminophen poisoning. *Clin. Lab. Med.* 26, 49-65.
- Salam, O.M.E.A., Baiuomy, A.R., El-Shenawy, S.M., Hassan, N.S., 2005. Effect of pentoxifylline on hepatic injury caused in the rat by the administration of carbon tetrachloride or acetaminophen. *Pharmacol. Rep.* 57, 596-603.
- Sener, G., Sehirli, A.Ö., Ayanoglu-Dülger, G., 2003. Protective effects of melatonin, vitamine E and N-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *J. Pineal Res.* 35, 61-68.
- Sener, G., Toklu, H.Z., Sehirli, O., Ögünç, A.V., Çetinel, S., Gedik, N., 2006. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol. Res.* 35, 62-68.
- Shim, J.Y., Kim, M.H., Kim, H.D., Ahn, J.Y., Yun, Y.S., Song, J.Y., 2010. Protective action of the immunomodulator ginsan against carbon tetrachloride-induced liver injury via control of oxidative stress and the inflammatory response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 318–325.
- Smith, H.S., 2009. Potential analgesic mechanisms of acetaminophen. *Pain Physician.* 12, 269-280.
- Souza, D.G., Cassali, G.D., Poole, S., Teixeira, M.M., 2001. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology.* 134(5), 985-994.
- Su, G.L., Hoesel, L.M., Bayliss, J., Hemmila, M.R., Wang, S.C., 2010. Lipopolysaccharide binding protein inhibitory peptide protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299(6), 1319-1325.

- Sukamoto, K.I., Sugimoto, K.I., Sudoh, T., Fujimura, A., 2005. Different effects of imidapril and enalapril on aminopeptidase P activity in the mouse trachea. *Hypertens. Res.* 28, 243-247.
- Suzuki, A., Yuen, N., Walsh, J., Papay, J., Hunt, C.M., Diehl, A. M., 2009. Co-mediations that modulate liver injury and repair influence clinical outcome of acetaminophen-associated liver injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 882-888.
- Takai, S., Song, K., Tanaka, T., Okunishi, H., Miyazaki, M., 1996. Antinociceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist in mice. *Life Sciences.* 59, 331-336.
- Türkay, C., Yönm, O., Arıcı, S., Koyuncu, A., Kanbay, M., 2008. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. *Dig. Dis. Sci.* 53, 789-793.
- Vale, J.A., Kulig, K., 2004. American Academy of Clinical Toxicology; European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42 (7), 933-943.
- Walker, R., Racz, W., Mcelligott, T., 1980. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Lab. Invest.* 42, 181-189.
- Wang, A.Y., Lian, L.H., Jiang, Y.Z., Wu, Y.L., Nan, J.X., 2010. *Gentiana manshurica* Kitagawa prevents acetaminophen induced acute hepatic injury in mice via inhibiting JNK/ERK MAPK pathway. *World J. Gastroenterol.* 16(3), 384-391.
- Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Leite, M.R., Nogueira, C.W., 2009. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J. Pathophys.*

- Williams, C.D., Farhood, A., Jaeschke, H., 2010. Role of caspase-1 and interleukin-1 β in acetaminophen-induced hepatic inflammation and liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 169-178.
- World Health Organization (WHO), 2002. *The Importance of Pharmacovigilance: safety monitoring of medicinal products.* Geneva: World Health Organization.
- Worriax J.D., Yates J.E., Flake D., Saseen J.J., 2007. Alcoholic liver disease: is acetaminophen safe? *J. Fam. Pract.* 56(8), 673-4.
- Wu, F.L.L., Yang, C.C., Shen, L.J., Chen, C.Y., 1996. Adverse Drug Reactions in a Medical Ward. *Journal Formos. Medicin. Association.* 95 (3), 241-246.
- Wu, Y.L., Piao, D.M., Han, X.H., Nan, J.X., 2008. Protective effects of salidroside against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31(8), 1523-1529.
- Yapar, K., Kart, A., Karapehlivan, M., Atakisi, O., Tunca, R., Erginsoy, S., Citil, M., 2007. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 59, 121-128.
- Yayama, K., Sugiyama, K., Miyagi, R., Okamoto, H., 2007. Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol. Pharm. Bull.* 30(3), 591-594.
- Yee, S. B., Bourdi, M., Masson, M. J., Pohl, L. R., 2007. Hepatoprotective role of endogenous interleukin-13 in a murine model of acetaminophen-induced liver disease. *Chem. Res. Toxicol.* 20(5), 734-744.
- Yeung J.H., 1988. Effect of sulphydryl drugs on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 6(3-4), 295-301.

- Yuan, H.D., Jun, G.Z., Piao, G.C., 2009. Protective effects of the active part of *Artemisia sacrorum* Ledeb. Against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32(10), 1683-1688.
- Xu, J. J., Hendriks, B. S., Zhao, J., Graaf, D., 2008. Multiple effects of acetaminophen and p38 inhibitors: Towards pathway toxicology. *FEBS Letters.* 582, 1276-1282.