



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA



FELIPE MIRANDA SANTOS

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO)
NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR PARACETAMOL**

Salvador

2012

FELIPE MIRANDA SANTOS

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO)
NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR PARACETAMOL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra

Salvador

2012

FELIPE MIRANDA SANTOS

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO)
NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR PARACETAMOL**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Patologia.

Salvador, 13 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Helma Pinchemel Cotrim

Dr. Eduardo Antonio Gonçalves Ramos

Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Gerino e Sílvia, e às minhas irmãs, Cíntia e Lorena, pelos ensinamentos, incentivos, e por estarmos sempre juntos em todas as lutas, fracassos e vitórias.
Sobretudo pelo amor compartilhado.
Obrigado família!*

Em especial à minha avó, Maria de Lourdes, a quem com muito carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha sobrinha Luíza, que renova diariamente a minha alegria de viver.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas, por me acolher no laboratório, pelos ensinamentos em patologia, conselhos, e por toda a dedicação e paciência ao longo deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra, pela dedicação e disposição ao longo deste trabalho, obrigado por todas as maravilhosas discussões nos corredores da Fiocruz.

Ao Dr Lain Carlos Pontes de Carvalho, pela inestimável contribuição ao longo do meu mestrado.

Ao professor Dr. Ricardo David Couto, pela colaboração neste trabalho e principalmente pela amizade sincera ao longo desses anos. Agradeço também a Lázaro e Cristiana por todo o suporte no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia (PGPAT) pela formação acadêmica, infra-estrutura para realização deste trabalho e ao apoio financeiro da CAPES.

A todos os orientadores e estudantes do Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) com os quais venho aprendendo a cada dia a fazer perguntas e a buscar respostas.

Em especial a Maria Carolina, muito obrigado pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos e pelas revisões deste trabalho.

À família B05: Luciana Aragão, Viviane Junqueira, Virgínia Góes pelas inúmeras vezes em que pude contar com o apoio de vocês, pelas valiosas sugestões e pela amizade. Thassila Pitanga, Thayna Meirelles e Rodrigo Feitosa, pelo apoio nesse mestrado, muito obrigado por fazerem parte da minha vida. Cintia Araujo e André Cronemberger, pelo suporte em todos os momentos em que precisei. Ayling Ng, Fabio Brasil, Isabela Navarro, Andrea Simões, Naiara Dourado pela colaboração na execução dos experimentos e pelo maravilhoso convívio.

Luana Palma, Micelly, Joselli e Thaís pela contribuição na análise morfométrica.

Ao meu tio Humberto Miranda, pelas nossas discussões sobre ciência e educação que contribuem de modo inestimável para a minha formação.

À Flávia Paixão e Flávia Maciel, sempre atenciosas nos momentos em que precisei.

A todos os profissionais da equipe do Biotério e do Serviço de Histotecnologia.

Muito obrigado!

“A lab is a nurturing environment that aims to maximize the potential of students as scientists and as human beings.”

Uri Alon

RESUMO

INTRODUÇÃO: A intoxicação pelo paracetamol é a principal causa de insuficiência hepática aguda (IHA) em vários países do ocidente. A hepatotoxicidade é mediada por um metabólito intermediário reativo que depleta as reservas do antioxidante endógeno glutathiona (GSH). O tratamento precoce com n-acetilcisteína (NAC) é recomendado para restabelecer a concentração fisiológica de GSH. A s-nitrosoglutationa (GSNO) é uma molécula antioxidante derivada do GSH capaz de reduzir o estresse oxidativo em diversos sistemas celulares e modelos experimentais. **OBJETIVO:** Avaliar se GSNO é capaz de reduzir a taxa de mortalidade, extensão da necrose hepática, manifestações bioquímicas e comparar sua eficácia com NAC e GSH no tratamento da IHA experimental induzida por paracetamol. **METODOLOGIA:** Camundongos isogênicos machos da linhagem C57Bl/6 foram tratados por três semanas com água suplementada com etanol a 10%. Os animais foram divididos em cinco grupos. O grupo 1 (controle negativo) recebeu solução salina 0,9%. Os demais grupos receberam 300 mg/Kg de paracetamol para indução de IHA. Após 3 horas, o grupo 2 (controle positivo) foi tratado com salina tamponada com fosfato (PBS) e os grupos 3, 4 e 5 foram tratados, respectivamente, com 600 μ mol/kg de NAC, GSH e GSNO. A eutanásia foi feita 12 horas após a indução de IHA. A extensão da necrose hepática foi avaliada por morfometria através do software IMAGEPRO-PLUS. Os níveis séricos de transaminases e fosfatase alcalina foram avaliados como marcadores bioquímicos de lesão hepática. A taxa de mortalidade foi avaliada em um experimento independente, após uma dose de 350 mg/Kg de paracetamol. **RESULTADOS:** O tratamento com GSNO 600 μ mol/kg aumentou a taxa de sobrevivência em relação aos grupos tratados com NAC ou PBS. Entretanto, não houve diferença de mortalidade entre os grupos GSNO e GSH. A avaliação morfométrica revelou menor extensão de necrose hepática nos animais tratados com GSNO em comparação com NAC e PBS. Houve redução de atividade sérica de ALT, mas não de AST no grupo GSNO em comparação com PBS e NAC. Os níveis séricos de fosfatase alcalina, albumina, ureia e creatinina não apresentaram diferenças entre os diversos grupos. **CONCLUSÃO:** O tratamento com GSNO aumenta a taxa de sobrevivência e reduz a extensão de necrose hepática na IHA experimental por paracetamol. O GSNO apresenta eficácia superior à NAC e idêntica ao GSH em dose equimolar. Estes achados sugerem que o efeito protetor do GSNO parece independe da porção nitroso da molécula. Possíveis mecanismos de proteção extra-hepáticos merecem ser investigados.

Palavras-chave: Insuficiência hepática aguda; Paracetamol; S-nitrosoglutationa; hepatotoxicidade

ABSTRACT

BACKGROUND: Paracetamol overdose is the main cause of acute liver failure (ALF) in western countries. The hepatotoxicity is mediated by a reactive metabolite that depletes the pool of glutathione (GSH), an endogenous antioxidant molecule. Early treatment with n-acetylcysteine (NAC) is recommended to replenish the pool of GSH. S-nitrosoglutathione (GSNO) is a potent antioxidant molecule that reduces oxidative stress in several cellular systems and experimental models. **OBJECTIVE:** To evaluate if GSNO reduces the mortality rate, the hepatocellular necrosis extension and to compare its therapeutic efficacy with NAC and GSH in experimental ALF induced by paracetamol. **METHODS:** Male mice were treated for three weeks with alcohol 10% orally. The animals were divided in five groups. Group 1 (negative control) received saline 0.9%. All the other groups received 300 mg/Kg paracetamol for induction of ALF. After 3 hours, group 2 (positive control) received phosphate buffered saline (PBS) and groups 3, 4 and 5 were treated respectively with 600 $\mu\text{mol/kg}$ of NAC, GSH and GSNO. The animals were sacrificed after 12 hours of induction of ALF. The area of liver necrosis was evaluated by morphometric analysis with the software IMAGEPRO. Transaminases and alkaline phosphatase were determined as markers of liver injury. Mortality rate was evaluated in an independent experiment after a dose of 350 mg/Kg of paracetamol. **RESULTS:** GSNO treatment (600 $\mu\text{mol/kg}$) significantly improved the survival rate compared to PBS and NAC treatments. There was no statistical difference in survival rate between GSNO and GSH groups. In addition, GSNO attenuated the area of liver necrosis in comparison to NAC and PBS, but not to GSH. GSNO reduced the serum ALT, but not AST activity in comparison to PBS and NAC. There was no statistical difference in alkaline phosphatase, urea, creatinine and albumin among the groups that received paracetamol. **CONCLUSION:** GSNO treatment augmented survival rate and reduced the area of liver necrosis in comparison to NAC, but was equally as effective as GSH. These findings suggest that the hepatoprotector effect of GSNO is independent of the nitroso moiety of the molecule. Potential extra-hepatic mechanisms remain to be evaluated.

Key-words: Acute liver failure; acetaminophen; s-nitrosoglutathione; hepatotoxicity

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotrasferase
ATP	Adenosina trifosfato
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
COX	Ciclooxigenase
CYP450	Citocromo P450
GSH	L-glutationa
GSNO	S-nitroso-L-glutationa
GSNOR	S-nitroso-L-glutationa Redutase
IHA	Insuficiência Hepática Aguda
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAPQI	N-acetil-parabenzoquinonaimina
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RNI	Relação Normalizada Internacional
RSH	Tiol
RSNO	S-nitrosotiol
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UDPGA	Uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico
UDPGT	Uridina Difosfato Glicuroniltransferase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura química do paracetamol
- Figura 2 Estrutura química do GSH
- Figura 3 Metabolismo e mecanismo de hepatotoxicidade do paracetamol
- Figura 4 Estrutura química da NAC
- Figura 5 Estrutura química do GSNO
- Figura 6 Metabolismo do GSNO
- Figura 7 Reação de transnitrosação
- Figura 8 Desenho do estudo
- Figura 9 Experimento I: desenho experimental
- Figura 10 Experimento II: desenho experimental
- Figura 11 Caracterização do GSNO por espectroscopia ultravioleta/visível
- Figura 12 Curva de sobrevida
- Figura 13 Avaliação histológica da lesão hepática
- Figura 14 Área de necrose hepática
- Figura 15 AST e ALT
- Figura 16 Fosfatase alcalina
- Figura 17 Ureia e Creatinina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA.....	14
2.1.1 Definição.....	14
2.1.2 Critérios diagnósticos.....	14
2.1.3 Classificação.....	15
2.1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais.....	16
2.1.5 Etiologia e epidemiologia.....	22
2.1.6 Prognóstico.....	24
2.2 PARACETAMOL.....	24
2.2.1 Considerações gerais.....	24
2.2.2 Mecanismo de ação.....	25
2.2.3 Dose terapêutica e limiar de toxicidade.....	25
2.2.4 Metabolismo e mecanismo de toxicidade.....	26
2.2.5 A hepatotoxicidade por paracetamol.....	28
2.2.6 O papel do NO na intoxicação por paracetamol.....	29
2.2.7 Tratamento da hepatotoxicidade por paracetamol.....	30
2.2.8 Custos relacionados à intoxicação por paracetamol.....	31
2.2.9 Modelo experimental de hepatotoxicidade por paracetamol.....	31
2.3 S-NITROSOGLUTATIONA.....	33
2.3.1 Caracterização e estrutura química.....	33
2.3.2 Síntese e metabolismo.....	33
2.3.3 Efeitos fisiológicos.....	35
2.3.4 Atividade antioxidante.....	36
2.3.5 Atividade anti-inflamatória.....	36
2.3.6 Efeito hepatoprotetor.....	36
3. HIPÓTESE	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
5. JUSTIFICATIVA	40
6. METODOLOGIA	41

6.1 REAGENTES.....	41
6.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	41
6.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	41
6.3.1 Descrição do experimento I.....	42
6.3.2 Descrição do experimento II.....	43
6.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GSNO.....	44
6.5 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	45
6.6 COLETA DE SANGUE E EUTANÁSIA.....	45
6.7 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO FÍGADO.....	46
6.8 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE HEPÁTICA.....	46
6.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	46
6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
7. RESULTADOS.....	48
7.1 CARACTERIZAÇÃO DO GSNO.....	48
7.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.....	49
7.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE HEPÁTICA.....	50
7.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	55
7.4.1 ALT e AST.....	54
7.4.2 Fosfatase alcalina.....	55
7.4.3 Ureia e creatinina.....	56
8. DISCUSSÃO.....	58
9. CONCLUSÕES.....	64
10 PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência hepática aguda (IHA) é uma síndrome clínica que se desenvolve após uma lesão hepática extensa e é caracterizada por rápido desenvolvimento de coagulopatia e encefalopatia em um indivíduo sem doença hepática pré-existente. A IHA é causada principalmente por intoxicação por paracetamol, hepatites virais e hepatite autoimune (NGUYEN; VIERLING, 2011).

O paracetamol é um analgésico e antitérmico seguro quando utilizado em doses terapêuticas, entretanto, quando administrado em sobredose tem o potencial para causar hepatotoxicidade (DAVIDSON; EASTHAM, 1966). O mecanismo de lesão depende da formação de um metabólito tóxico do paracetamol que depleta as reservas endógenas de glutathione (GSH) e liga-se nas proteínas intracelulares. Estes eventos desencadeiam estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção microcirculatória e necrose hepática centrolobular (BULERA *et al.*, 1996; ITO; ABRIL; *et al.*, 2004; REID *et al.*, 2005).

A intoxicação por paracetamol pode desencadear um amplo espectro de manifestações clínicas e laboratoriais que variam desde elevações assintomáticas das transaminases até o desenvolvimento de IHA, com coagulopatia, encefalopatia e outras complicações sistêmicas que podem levar o paciente a óbito. Assim, o tratamento da intoxicação por paracetamol é uma urgência médica que pode ser complexa e custosa a depender da gravidade (BERNAL *et al.*, 2010).

O tratamento preconizado para a intoxicação por paracetamol depende da quantidade de paracetamol ingerida, fatores de risco para hepatotoxicidade e do tempo decorrido pós-intoxicação (WALLACE *et al.*, 2002). O carvão ativado pode ser administrado na primeira hora após a intoxicação para reduzir a absorção do paracetamol (WALLACE *et al.*, 2002). Além disso, recomenda-se a administração de n-acetilcisteína (NAC) dentro das primeiras 8 a 24 horas para prevenir e atenuar a hepatotoxicidade (MAKIN *et al.*, 1995).

Nos casos mais graves, quando o paciente não tem possibilidade de recuperação

espontânea, o transplante hepático é a única alternativa possível, no entanto, é um procedimento de alto risco, requer imunossupressão crônica do indivíduo transplantado e existem poucos órgãos disponíveis para doação (NEWSOME *et al.*, 2000). Por isso é importante o desenvolvimento de alternativas terapêuticas que visem à sobrevida livre de transplante.

A s-nitrosoglutathiona (GSNO) é uma molécula derivada do GSH que apresenta potente atividade antioxidante (RAUHALA *et al.*, 1998). Faz parte de uma família de compostos denominados de s-nitrosotióis, cujas propriedades farmacológicas em muito se assemelham às do óxido nítrico (NO) (RICHARDSON; BENJAMIN, 2002). Por esse motivo, o GSNO e os nitrosotióis vêm sendo utilizados como antioxidantes e como fontes de NO em vários estudos *in vitro* e *in vivo* (FEELISCH, 1998; PRINCE *et al.*, 2010; QUINTANA *et al.*, 2002; TAM *et al.*, 2000).

Nitrosotióis análogos ao GSNO exercem efeito hepatoprotetor importante quando utilizados farmacologicamente em modelos experimentais de doenças hepáticas crônicas associadas a estresse oxidativo (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; VERCELINO *et al.*, 2010). O GSNO por sua vez apresenta efeito protetor em modelos experimentais de estresse oxidativo agudo, como na lesão por reperfusão cardíaca e hepática (KONOREV *et al.*, 1995; QUINTANA *et al.*, 2002).

Neste estudo foram avaliados os efeitos terapêuticos do GSNO no modelo experimental de IHA induzida por intoxicação por paracetamol.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

2.1.1 Definição

A insuficiência hepática aguda (IHA) é uma síndrome clínica potencialmente reversível caracterizada por uma rápida deterioração da função hepática em decorrência de lesão hepatocelular maciça. A característica principal que define a IHA é o desenvolvimento de coagulopatia e encefalopatia em até vinte e seis semanas do início das manifestações hepáticas em indivíduo previamente sadio (POLSON; LEE, 2005; RUTHERFORD; CHUNG, 2008).

2.1.2 Critérios diagnósticos

O diagnóstico de IHA é estabelecido quando um paciente, com evidência clínica ou laboratorial de hepatopatia aguda, apresenta razão normalizada internacional (RNI) maior que 1,5 e qualquer grau de encefalopatia em até vinte e seis semanas do início das manifestações hepáticas (POLSON; LEE, 2005). A encefalopatia pode evoluir desde um quadro leve de irritabilidade e confusão, para formas mais graves com redução no nível de consciência, coma e até a morte. Como a IHA é uma síndrome potencialmente letal e a encefalopatia pode progredir no intervalo de poucas horas, uma vez estabelecido o diagnóstico é importante que o paciente seja admitido o quanto antes em uma unidade de terapia intensiva (UTI) para tratamento adequado (POLSON; LEE, 2005).

2.1.3 Classificação

Diversas terminologias e classificações foram propostas para a IHA baseadas no intervalo de tempo entre o surgimento da icterícia e o desenvolvimento da encefalopatia. Este parâmetro vem sendo utilizado devido ao reconhecimento do seu valor diagnóstico e prognóstico, já que a velocidade de evolução da doença tem correlação com as complicações clínicas e a provável causa (BERNAL *et al.*, 2010).

O termo insuficiência hepática fulminante foi introduzido em 1970 para descrever uma síndrome potencialmente reversível desencadeada por uma lesão extensa no fígado. Sua característica principal era o desenvolvimento de encefalopatia em até oito semanas do aparecimento das manifestações hepáticas, usualmente icterícia, em um indivíduo sem evidência de doença hepática pré-existente (TREY; DAVIDSON, 1970).

Em 1986, o termo insuficiência hepática de início tardio foi proposto para categorizar aqueles pacientes que desenvolviam encefalopatia após oito a vinte e quatro semanas do início das manifestações hepáticas (GIMSON *et al.*, 1986). Essa classificação foi considerada como uma extensão da insuficiência hepática fulminante proposta por Trey e Davidson (1970). Embora a insuficiência hepática de início tardio apresentasse evolução mais gradual, ambas as síndromes tinham em comum uma alta taxa de mortalidade, sintomatologias semelhantes e frequente associação com hepatites virais agudas (ELLIS *et al.*, 1995).

No mesmo ano, a IHA foi classificada em fulminante e subfulminante (BERNUAU *et al.*, 1986). A insuficiência hepática fulminante identificava os pacientes que desenvolviam encefalopatia após duas a oito semanas do aparecimento de icterícia. Já o termo insuficiência hepática subfulminante era utilizado quando o aparecimento da encefalopatia ocorria após três a seis meses do início das manifestações hepáticas.

As terminologias insuficiência hepática hiperaguda, aguda e subaguda foram propostas em 1993. O termo insuficiência hepática hiperaguda enquadra os casos

nos quais a encefalopatia se manifesta dentro de sete dias do surgimento da icterícia. Nestes indivíduos, observa-se um rápido declínio da função neurológica e alta frequência de edema cerebral, entretanto, o prognóstico é relativamente bom. A denominação insuficiência hepática aguda é utilizada para os casos onde a encefalopatia ocorre entre 8 a 28 dias após a icterícia. A ocorrência de edema cerebral também é elevada, mas nestes casos o prognóstico é pior se não for realizado o transplante hepático. O termo insuficiência hepática subaguda é reservado aos casos em que a encefalopatia ocorre após 29 a 72 dias (O'GRADY, 1993).

Apesar das diversas classificações da IHA no decorrer dos anos, até o momento não há uma classificação universalmente utilizada porque o perfil etiológico dessa síndrome é bastante heterogêneo nos diferentes países (SASS; SHAKIL, 2005).

2.1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais

a) Manifestações gerais

Devido à ampla variedade de funções que o fígado exerce no organismo, a perda da capacidade funcional deste órgão desencadeia uma série de alterações clínicas e laboratoriais de forma sistêmica. Pode-se observar, sobretudo durante a fase inicial da síndrome, a ocorrência de sinais e sintomas inespecíficos como fadiga, náuseas, vômitos, cefaléia, astenia, bem como febre e mialgias (SASS; SHAKIL, 2005).

b) Manifestações hepáticas

Os pacientes acometidos com IHA frequentemente apresentam queixa de dor abdominal em quadrante superior direito, hepatomegalia ou mesmo redução do

volume do fígado, devido à perda maciça de hepatócitos (POLSON; LEE, 2005; SASS; SHAKIL, 2005).

O fígado é o principal órgão responsável pela síntese dos fatores de coagulação, síntese de albumina, depuração de amônia e lactato, metabolismo da glicose, conjugação da bilirrubina, dentre muitas outras funções. A lesão hepatocelular maciça tem como reflexo a liberação do conteúdo intracelular dos hepatócitos necróticos, redução da capacidade hepática de síntese, depuração e homeostase metabólica (BERNAL *et al.*, 2010).

A agressão aos hepatócitos promove a liberação de enzimas intracelulares na corrente sanguínea em função da alteração da membrana plasmática. Dessa forma, os pacientes apresentam elevação acentuada na atividade sérica das transaminases hepáticas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), sobretudo em decorrência de hepatites virais ou por paracetamol (BREITHERICK *et al.*, 2011; SIMON, 1985). Elevações extremas na atividade sérica de lactato desidrogenase (LDH) também estão presentes, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (BLAZKA *et al.*, 1996; ZIMMERMAN; MADDREY, 1995). Por outro lado, a atividade sérica da fosfatase alcalina apresenta-se normal ou apenas levemente aumentada (BERNUAU *et al.*, 1986; SIMON, 1985).

O prejuízo da atividade de síntese afeta sobremaneira a concentração sérica dos fatores de coagulação, pois a maioria tem meia vida curta (LARSEN; BJERRING, 2011). A deficiência de protrombina é uma manifestação comum que acompanha a evolução clínica dos pacientes e se manifesta com o prolongamento no tempo de protrombina (RUEFF; BENHAMOU, 1973).

O fígado converte a maior parte da amônia proveniente da circulação porta em ureia, através do ciclo da ureia. O comprometimento da função de depuração hepática ocasiona um aumento nos níveis séricos de amônia (hiperamonemia), que aparece com intensidade variável e tem sido implicada na patogênese da encefalopatia hepática (STRAVITZ; KRAMER, 2009).

Na IHA, o estado de hipoperfusão tecidual promove um aumento do metabolismo anaeróbico elevando a concentração de ácido láctico no sangue. A redução do *clearance* hepático desta molécula contribui para o desenvolvimento de acidose metabólica. (SHAH, A. D. *et al.*, 2011). Em casos de IHA por intoxicação por paracetamol, um pH sanguíneo menor que 7,3 está relacionado com pior prognóstico e se constitui em um dos critérios de indicação para transplante hepático (BERNAL *et al.*, 2002).

A hiperbilirrubinemia é o reflexo da depuração hepática comprometida da bilirrubina, que em condições normais é conjugada no fígado com ácido glicurônico e excretada pelos rins. Clinicamente, a hiperbilirrubinemia se manifesta como icterícia, uma coloração amarelada das membranas conjuntivas, mucosas e da pele (BILLING; LATHE, 1958). A fase ictérica da IHA normalmente tem natureza progressiva, mas reversível e precede o surgimento da encefalopatia (RUEFF; BENHAMOU, 1973).

Aproximadamente 45% dos indivíduos acometidos com IHA cursam com hipoglicemia em função da depleção dos estoques de glicogênio nos hepatócitos e também pela redução da capacidade de gliconeogênese (RECORD *et al.*, 1975).

c) Coagulopatia

O fígado tem um papel fundamental na hemostasia, pois sintetiza a maioria dos fatores de procoagulação e anticoagulação. A coagulopatia definida como RNI maior que 1,5 é uma manifestação universal na IHA, ocorrendo em todos os indivíduos (MUNOZ *et al.*, 2008).

A coagulopatia ocorre por deficiência dos fatores de coagulação, particularmente fatores II, V, VII, IX e X, deficiência de protrombina e redução do fibrinogênio plasmático (RUEFF; BENHAMOU, 1973). A deficiência destes fatores é atribuída à síntese reduzida pelo fígado lesado. Porém, há evidências de que, em pelo menos um terço dos pacientes, a utilização destes componentes está acelerada e relacionada com o desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada

(RUEFF; BENHAMOU, 1973). Nestes casos, a CID pode promover a formação de microtrombos no leito capilar, levando à hipoperfusão tecidual, falência múltipla de órgãos, e eventualmente a óbito (MUNOZ *et al.*, 2009)

Cerca de 80% dos indivíduos apresentam coagulopatia de intensidade moderada (RNI entre 1,5 e 5,0) no momento da admissão hospitalar. O diagnóstico de coagulopatia grave, com RNI acima de 10, é feito em torno de 5% dos pacientes (MUNOZ *et al.*, 2008). A intensidade da coagulopatia correlaciona-se com o prognóstico, de modo que o tempo de protrombina acima de 100 segundos é utilizado como um dos critérios de indicação para transplante hepático (O'GRADY, 1989).

A coagulopatia aumenta o risco de sangramento espontâneo, sobretudo sangramento gastrointestinal e hemorragias decorrentes de procedimentos invasivos que se tornem necessários, como inserção de monitor de pressão intracraniana, biópsia hepática ou transplante hepático. Estes procedimentos em alguns casos exigem correção prévia da coagulopatia (MUNOZ, *et al.*, 2009). Os quadros mais graves são observados na IHA causada por hepatite B e intoxicação por paracetamol. Trombocitopenia coexiste em cerca de 50 a 70% dos casos e sua patogênese ainda permanece não esclarecida.

d) Encefalopatia

A encefalopatia hepática abrange um conjunto de alterações cognitivas, psiquiátricas e motoras que se desenvolvem no curso IHA dentro de 26 semanas do início da icterícia. É importante salientar que o surgimento da encefalopatia é o evento que diferencia a IHA das formas graves de hepatite aguda. As manifestações podem variar desde dificuldade de concentração, mudanças súbitas de humor, agitação, insônia, até declínio no nível de consciência e coma hepático. O desenvolvimento de hipertensão intracraniana nos estágios avançados da encefalopatia pode resultar em edema cerebral, herniação de tronco encefálico e morte (GIMSON, 1996).

O estadiamento da encefalopatia hepática pode ser feito pelo critério de *West Haven*. Este critério varia do grau 1 a 4, baseado nas alterações de consciência, função cognitiva, comportamento e controle motor (FERENCI *et al.*, 2002). Na encefalopatia grau 1, o paciente pode apresentar alterações discretas do comportamento e no padrão de sono, déficit de atenção, euforia ou ansiedade; no grau 2, podem estar presentes letargia ou apatia, leve desorientação no tempo e espaço, mudanças de personalidade e comportamento inapropriado; no grau 3, o paciente apresenta um quadro de sonolência, confusão, desorientação acentuada e ainda permanece responsivo a estímulos verbais; na encefalopatia grau 4, o paciente está em coma, não responsivo a estímulos verbais ou nocivos (FERENCI *et al.*, 2002).

O quadro clínico pode evoluir rapidamente do estágio 1 para o coma (estágio 4) em poucas horas, sendo importante o monitoramento da função neurológica e transferência precoce para uma UTI (SHAWCROSS; WENDON, 2011). O risco de edema cerebral é mínimo nos estágios 1 e 2 da encefalopatia, mas aumenta para 25 a 35% com a progressão para o estágio 3. Naqueles que evoluem para o coma (estágio 4), o risco de edema cerebral é de 65 a 75% (POLSON; LEE, 2005). O edema cerebral é mais frequente na forma hiperaguda da IHA e tem sido implicado como causa de morte em cerca de um terço dos pacientes (BERNAL *et al.*, 2007).

A patogênese da encefalopatia e do edema cerebral está associada a moléculas nitrogenadas, principalmente amônia, produzidas a partir de bactérias intestinais. Estes compostos ganham acesso à circulação sistêmica como resultado da depuração hepática diminuída. A amônia induz alterações na síntese e liberação de neurotransmissores, estresse oxidativo neuronal, disfunção mitocondrial, e distúrbios osmóticos decorrentes da conversão da amônia em glutamina pelos astrócitos (SHAWCROSS; WENDON, 2011).

Os mecanismos responsáveis pela formação do edema podem ser citotóxicos ou vasogênicos. O edema de origem citotóxica decorre de entumescimento celular, sobretudo nos astrócitos, que convertem amônia em glutamina, a partir da glutamina sintetase, levando a estresse osmótico. O acúmulo de água ocorre principalmente

na área cinzenta. Por outro lado, o edema vasogênico ocorre secundário a aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo a entrada de plasma no espaço intersticial e acúmulo de água principalmente na região de matéria branca (THUMBURU *et al.*, 2011).

e) Distúrbios Renais

A insuficiência renal aguda é uma complicação comum na IHA e de origem multifatorial, podendo ser ocasionada por diversos fatores, como, necrose tubular aguda, hipovolemia e síndrome hepato-renal. Estima-se que cerca de 50% dos pacientes com IHA desenvolvam disfunção renal aguda associada à azotemia e oligúria (STRAVITZ; KRAMER, 2009). Por isso, é recomendada a monitorização contínua do débito urinário e dos marcadores bioquímicos de função renal, ureia e creatinina (POLSON; LEE, 2005).

A oligúria pode se apresentar como sintoma inicial e se intensificar nos primeiros dias, mesmo na presença de pressão arterial normal (RUEFF; BENHAMOU, 1973). A depender da gravidade, a realização de hemodiálise pode ser necessária (PRESCOTT *et al.*, 1971).

f) Complicações cardiovasculares e pulmonares

Indivíduos com IHA apresentam circulação hiperdinâmica, com taquicardia, resistência vascular periférica reduzida levando à hipotensão arterial. Insuficiência adrenal pode estar presente em 60% dos casos de IHA e parece contribuir para o comprometimento hemodinâmico (O'GRADY, 2005). O déficit de volume intravascular ocorre por transudação de fluido para o espaço intersticial, redução de ingestão de fluidos por via oral, e, possivelmente, perda gastrointestinal (POLSON; LEE, 2005).

Cerca de 37% dos pacientes com IHA desenvolvem insuficiência respiratória aguda com edema pulmonar, que pode levar a um quadro de hipoxemia grave e potencialmente fatal (TREWBY *et al.*, 1978). Os indivíduos com encefalopatia em estágio avançado requerem intubação e ventilação mecânica, o que aumenta o risco de sepse.

g) Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) acomete cerca de 57% dos pacientes ao longo do curso da IHA. A SIRS decorre de produção e liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias principalmente por ativação de monócitos e macrófagos. Os principais produtos dos macrófagos ativados incluem interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas e lisossomais. A presença de SIRS correlaciona-se com a taxa de mortalidade, de modo que a presença concomitante de 0, 1, 2 ou 3 componentes da SIRS em pacientes com IHA correlaciona-se com uma taxa de mortalidade de 16%, 28%, 41%, e 64% respectivamente (ROLANDO *et al.*, 2000). Estima-se que de 10 a 80% dos pacientes com IHA apresentem evidências bacteriológicas de infecção em algum momento da evolução do quadro. Produtos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) são indutores potentes de liberação de TNF, que causa aumento da permeabilidade microvascular, com extravazamento de fluido contribuindo na patogênese do edema cerebral (ROLANDO *et al.*, 2000).

2.1.5 Etiologia e epidemiologia

A etiologia da IHA é bastante diversa e varia ao longo do tempo, da região geográfica e da idade do paciente. As intoxicações medicamentosas, reações idiossincráticas a medicamentos, hepatites virais, autoimunes e isquêmicas são as mais relevantes (LEE *et al.*, 2008; MARUDANAYAGAM *et al.*, 2009). A IHA de causa indeterminada constitui uma parcela considerável dos casos, sobretudo em

crianças (ICHA; SAMUEL, 2008). Cerca de 15% dos casos de IHA em adultos são de origem indeterminada. Destes, em torno de 20% são causados por intoxicação por paracetamol não diagnosticada (DAVERN *et al.*, 2006).

A hepatotoxicidade por paracetamol é a principal causa de IHA nos EUA (BRONSTEIN *et al.*, 2008). Em um estudo realizado entre 1998 a 2007 envolvendo 23 hospitais norte-americanos, a intoxicação por paracetamol foi responsável por 46% dos casos (LEE *et al.*, 2008). A intoxicação ocorre de modo acidental em 48% das vezes (LARSON, 2005). Perfil semelhante é visto também em alguns países da Europa, como na Inglaterra, onde o paracetamol é responsável por cerca de 60% dos casos (MARUDANAYAGAM *et al.*, 2009). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento proporcional de casos de IHA por intoxicação por paracetamol, ao passo que as causas virais e indeterminadas vêm apresentando um declínio significativo (WILLIAMS, 2003).

Em um estudo multicêntrico feito de 1998 a 2003, o paracetamol foi a principal causa de IHA nos EUA, sendo responsável por 51% dos casos. Em 2007, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou uma ocorrência de 1600 casos de IHA nos EUA a cada ano, com o paracetamol sendo a principal causa (BOWER *et al.*, 2007). Anualmente, registram-se cerca de 56.000 visitas a departamentos de emergência, 26.000 internamentos e 458 mortes relacionadas com intoxicação por paracetamol (NOURJAH *et al.*, 2006).

No Brasil, não há dados publicados sobre a incidência de IHA. Recentemente, a Sociedade Brasileira de Hepatologia realizou um inquérito sobre hepatotoxicidade induzida por drogas nos cinco maiores centros de transplantes do país. De um total de 1.622 transplantes, somente 84 (5%) foram por IHA. Apenas 25 casos de IHA foram ocasionados por medicamentos. Os principais agentes envolvidos foram os tuberculostáticos, paracetamol, fitoterápicos e a metildopa (BITTENCOURT, 2011).

2.1.6 Prognóstico

A avaliação prognóstica do paciente com IHA é decisiva no que diz respeito aos possíveis desfecho. A sobrevida na era pré-transplante girava em torno de 15% mas atualmente chega a 65%, graças ao advento do transplante hepático, aos avanços nos tratamentos de suporte, e aos modelos prognósticos que estabelecem os critérios de indicação para a realização do transplante (KHASHAB *et al.*, 2007).

2.2 PARACETAMOL

2.2.1 Considerações gerais

O paracetamol (figura 1), também conhecido como acetaminofeno, ou Tylenol[®], é um analgésico e antitérmico amplamente utilizado na prática clínica para redução de febre e para o alívio temporário de dores leves a moderadas. O paracetamol, diferentemente dos anti-inflamatórios não-esteroidais, não apresenta atividade anti-inflamatória significativa. É um medicamento seguro em doses terapêuticas, porém quando utilizado em sobredose pode causar hepatotoxicidade (HINSON *et al.*, 2010).

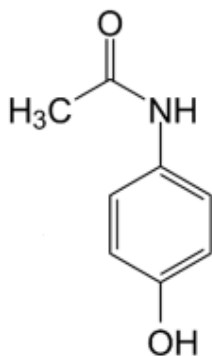


Figura 1: Estrutura química do paracetamol.

2.2.2 Mecanismo de ação

Embora o paracetamol venha sendo utilizado clinicamente há mais de um século, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (HÖGESTÄTT *et al.*, 2005). Acredita-se que seus efeitos farmacológicos sejam resultado da inibição das ciclooxigenases (COX) 1 e 2, à semelhança dos anti-inflamatórios não-esteroidais (FUCHS *et al.*, 2006). A redução da febre, dor e inflamação é considerada um efeito da síntese reduzida de prostaglandinas (FUCHS *et al.*, 2006). Entretanto, devido à sua baixa atividade anti-inflamatória e menor potencial de ocasionar efeitos colaterais no trato gastrointestinal, outros mecanismos têm sido propostos, como a inibição da ciclooxigenase 3 (COX3), uma isoforma supostamente presente no sistema nervoso central (BOTTING, 2000; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Recentemente, foi demonstrado que o paracetamol exerce sua atividade analgésica através da ativação dos receptores canabinóides CB1 (OTTANI *et al.*, 2006). O paracetamol pode ser desacetilado e conjugado com o ácido araquidônico, através da enzima amida hidrolase de ácido graxo, formando o composto N-araquidonoilfenolamina. Esta molécula apresenta atividade analgésica e antipirética através da modulação de receptores endocanabinóides (HÖGESTÄTT *et al.*, 2005).

2.2.3 Dose terapêutica e limiar de hepatotoxicidade

O paracetamol é considerado seguro quando utilizado em doses terapêuticas de até 4 g por dia em adultos. A hepatotoxicidade do paracetamol é dose-dependente e não existe um limiar de toxicidade claramente definido, mas de modo geral estima-se que doses entre 4 a 15 g podem ser suficientes para induzir hepatotoxicidade. Uma dose de 150 mg/Kg é considerada hepatotóxica, o que equivale à ingestão de cerca de 21 comprimidos de 500 mg por um adulto de 70 quilos (DARGAN; JONES, 2002; MYERS *et al.*, 2007; SIMON, 1985).

Alguns indivíduos apresentam fatores de risco que predisõem ao desenvolvimento de hepatotoxicidade em doses menores que 4g/dia. O dano hepático pode ser potencializado por circunstâncias que promovam a indução do citocromo P450 (CYP450) ou depleção de GSH, como etilismo crônico, uso de drogas anticonvulsivantes e desnutrição ou jejum (O'GRADY, 2005; ZIMMERMAN; MADDREY, 1995).

2.2.4 Metabolismo e mecanismo de toxicidade

O paracetamol é eliminado predominantemente (49%) por glicuronidação (CUMMINGS *et al.*, 1967). Sua biotransformação é mediada pela enzima Uridino Glicuroniltransferase (UDPGT), presente no retículo endoplasmático dos hepatócitos. Esta enzima cataliza a transferência do ácido glicurônico, proveniente da Uridina-5'-difosfato- α -D-ácido glicurônico (UDPGA) para a hidroxila fenólica do paracetamol.

Outra via majoritária de biotransformação do paracetamol é a sulfatação, catalisada pela família de enzimas das Sulfotransferases (SULT). O grupamento sulfúrico, proveniente da adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato (PAPS), é transferido para a hidroxila livre do paracetamol. Estima-se que esta via seja responsável por eliminação de 26% de uma dose administrada de paracetamol (CUMMINGS *et al.*, 1967). A glicuronidação e a sulfatação do paracetamol formam compostos com maior hidrossolubilidade, sendo posteriormente eliminados por via renal.

Uma pequena fração do paracetamol é metabolizada em N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) pelo sistema microsomal através de enzimas do CYP450. O NAPQI é um eletrófilo altamente reativo e tem grande afinidade por grupamentos tióis (DAHLIN *et al.*, 1984). Em doses terapêuticas, o NAPQI formado é rapidamente conjugado com o GSH (figura 2) pela enzima glutationa-s-transferase e posteriormente eliminado pela urina (HENDERSON *et al.*, 2000; KETTERER *et al.*, 1983).

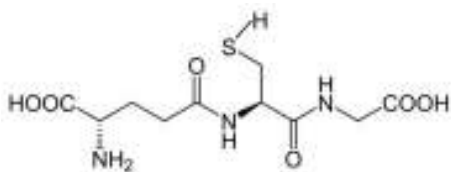


Figura 2: Estrutura química do GSH

Quando o paracetamol é administrado em doses tóxicas, as vias de glicuronidação e de sulfatação tornam-se saturadas. Conseqüentemente uma maior fração do paracetamol é oxidado pelo sistema microsomal hepático (NEWSOME *et al.*, 2000). Há um aumento na extensão de formação de NAPQI ocasionando uma depleção de GSH para níveis críticos. Quando a concentração de GSH alcança cerca de 20% da concentração normal, o NAPQI promove arilação de proteínas intracelulares Figura 3), ligando-se covalentemente aos seus grupos tióis (BULERA *et al.*, 1996). Esta reação leva à perda funcional de proteínas culminando em necrose hepatocelular. (JAMES; MAYEUX; *et al.*, 2003; JOLLOW *et al.*, 1973; MITCHELL *et al.*, 1973; POTTER *et al.*, 1973).

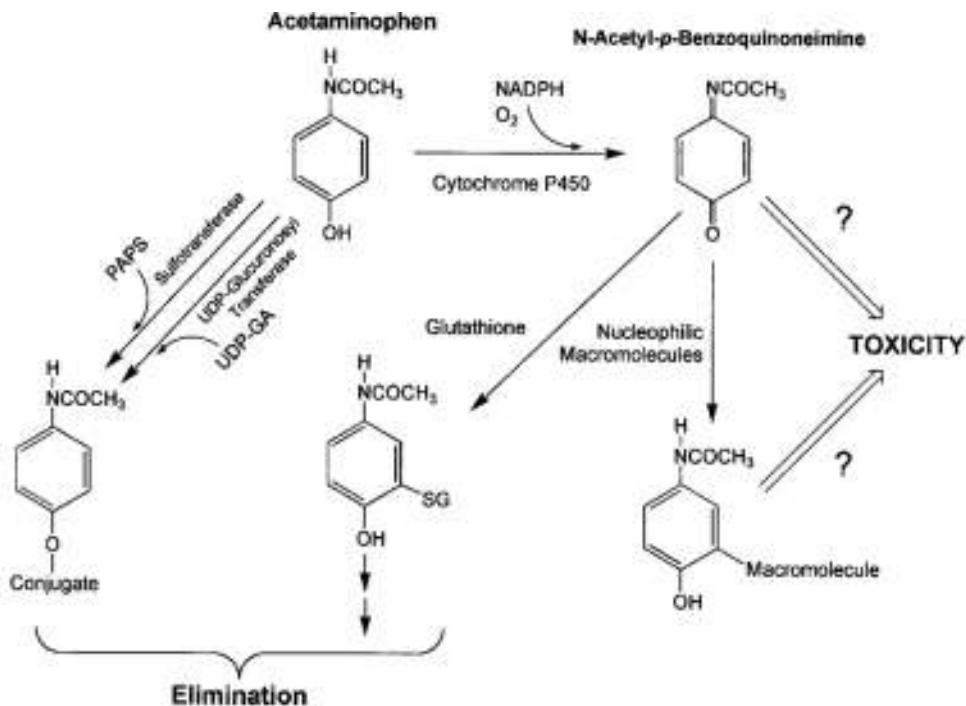


Figura 3: Metabolismo e mecanismo de hepatotoxicidade do paracetamol. O metabólito NAPQI é um eletrófilo altamente reativo contra tióis. Em doses terapêuticas, é rapidamente neutralizado pelo GSH. Em doses tóxicas, ocorre depleção do GSH e ligação covalente do NAPQI com tióis em proteínas celulares levando transição de permeabilidade mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular. Fonte: JAMES *et al.* (2003).

2.2.5 A hepatotoxicidade por paracetamol

A hepatotoxicidade é definida como a presença de atividade sérica de transaminases acima de 1000 UI/L dentro de sete dias do histórico de uso de paracetamol, independente de sua concentração sérica, excluindo-se outras causas potenciais (CRAIG, DARREN *et al.*, 2011). A intoxicação por paracetamol tem um espectro clínico que varia desde a elevação transitória e assintomática das transaminases; o desenvolvimento de hepatotoxicidade (AST ou ALT >1000 UI/L) associada à disfunção hepática; até a IHA com suas complicações sistêmicas (OSTAPOWICZ *et al.*, 2002; WATKINS. *et al.*, 2006).

O curso clínico da IHA por paracetamol é do tipo hiperaguda. A intoxicação evolui em três fases sequenciais. A primeira fase (fase I) inicia-se logo após a intoxicação e dura entre 12 a 24 horas. As principais manifestações são sinais de irritação gastrointestinal, náuseas, vômitos, anorexia e diaforese. Nesta fase, sinais de depressão do sistema nervoso central estão ausentes. Os pacientes que evoluem para a fase II apresentam melhora sintomática que pode perdurar por até 48 horas. Entretanto, é nesta fase que a lesão hepática se intensifica e que ocorre o pico de elevação das transaminases hepáticas. A maioria dos pacientes não chega a progredir além dessa fase quando o tratamento apropriado é instituído. Observa-se, então, a redução gradual das transaminases até os níveis normais. Na fase III, há a intensificação da necrose hepática e desenvolvimento de coagulopatia e icterícia, que se manifesta geralmente entre três a cinco dias da intoxicação. Nos casos mais graves, o indivíduo pode ir a óbito em até sete dias. Em casos não fatais, ocorre a resolução gradual da lesão hepática normalmente sem sequelas anatômicas e funcionais (Tylenol® Professional Product Information, 2010).

As alterações morfológicas hepáticas incluem sinais de necrose hepatocelular, que ocorre predominantemente em área centrolobular ou zona 3 dos ácinos de Rappaport. As manifestações incluem degeneração eosinofílica no citoplasma celular, picnose nuclear, cariorrexe e cariólise em hepatócitos nas áreas centrais. Vacuolização e alterações degenerativas podem ser observadas em células periféricas ao redor das áreas portais (zonas 1 dos ácinos de Rappaport). Uma

infiltração discreta de polimorfonucleares também pode ser visualizada (DAVIDSON; EASTHAM, 1966). A hepatotoxicidade por paracetamol também induz alterações no endotélio que levam à congestão sinusoidal devido ao colapso da parede sinusoidal e infiltração de eritrócitos no espaço de Disse. Estas alterações microcirculatórias antecedem a necrose hepatocelular (HINSON *et al.*, 2010; ITO *et al.*, 2004).

2.2.6 O papel do NO na intoxicação por paracetamol

O NO tem um papel duplo e antagônico no fígado e na IHA induzida por paracetamol. Funciona como um agente responsável pela manutenção da microcirculação hepática e regeneração celular, mas em condições patológicas pode atuar como mediador da lesão celular.

O NO é produzido em condições fisiológicas pela enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS) nos sinusóides hepáticos. O NO produzido pela eNOS tem um papel protetor na intoxicação por paracetamol, pois participa da manutenção da microcirculação hepática (ITO; ABRIL; *et al.*, 2004). Os inibidores que atuam nesta isoenzima agravam a necrose hepatocelular induzida pelo paracetamol (ITO; ABRIL; *et al.*, 2004).

Na intoxicação pelo paracetamol, a NOS induzível (iNOS) é ativada no interior do hepatócito. O NO sintetizado em grandes quantidades pela iNOS parece atuar como um dos mediadores da toxicidade hepática pela formação de metabólitos tóxicos do NO, como o peroxinitrito, causando estresse nitrosativo principalmente na zona centrolobular (ITO; ABRIL; *et al.*, 2004). Os inibidores específicos da iNOS são capazes de atenuar a lesão hepática e a disfunção microcirculatória (GARDNER, C R *et al.*, 1998; ITO; ABRIL; *et al.*, 2004). Por outro lado, já foi demonstrado que a atividade de iNOS é um pré-requisito importante na regeneração tecidual hepática em outro modelo experimental (RAI *et al.*, 1998).

2.2.7 Tratamento da hepatotoxicidade por paracetamol

Caso o paciente seja admitido no hospital dentro da primeira hora da intoxicação, é recomendada a administração de carvão ativado 1g/Kg para adsorção do paracetamol no estômago, reduzindo a sua absorção sistêmica (POLSON; LEE, 2005).

O tratamento da intoxicação por paracetamol é feito com a administração por via oral ou intravenosa de N-acetilcisteína (NAC, figura 4). Recomenda-se a administração intravenosa de uma dose de ataque de 140 mg/Kg de NAC, seguida por doses de manutenção de 70 mg/kg a cada quatro horas, até um total de 17 doses ou RNI < 1,5 (POLSON; LEE, 2005). O objetivo do tratamento é prevenir ou atenuar o dano hepático mediado pela ligação covalente do NAPQI às proteínas intracelulares. A NAC atua como substrato para síntese de GSH e o tratamento deve ser instituído nas primeiras 8 a 10 horas após a intoxicação (KANTER, 2006). Se o tratamento for realizado tardiamente a efetividade terapêutica é limitada.

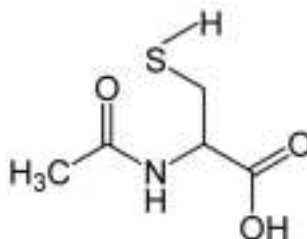


Figura 4: Estrutura química da NAC.

O transplante hepático é um procedimento capaz de reduzir a mortalidade na IHA quando não há perspectiva de recuperação espontânea do paciente. De modo geral, cerca de 25 a 50% dos pacientes com IHA (envolvendo todas as etiologias) são submetidos a transplante (OSTAPOWICZ *et al.*, 2002; O'GRADY *et al.*, 1993). Na IHA por paracetamol, a sobrevida livre de transplante estimada gira em torno de 66% (OSTAPOWICZ *et al.*, 2002). Aproximadamente 7% dos pacientes são submetidos ao transplante e a taxa de mortalidade em pacientes não transplantados gira em torno de 27% (OSTAPOWICZ *et al.*, 2002) Apesar de ser um procedimento capaz de

salvar vidas, o transplante hepático é um procedimento de risco, tem custo elevado, alguns pacientes apresentam contraindicações e acarreta necessidade de imunossupressão do paciente pelo resto da vida. Assim, é importante a investigação de alternativas terapêuticas que favoreçam a recuperação do paciente sem a necessidade de transplante hepático.

2.2.8 Custos relacionados à intoxicação por paracetamol

Os custos associados às intoxicações por paracetamol são significativos. Os custos diretos associados à intoxicação por paracetamol foram estimados em torno de US\$ 87 milhões anuais nos EUA, (BOND; NOVAK, 1995). No Reino Unido esse valor foi estimado em 8 milhões de Euros, sem levar em consideração os custos associados com transplante hepático e cuidados especializados (SHEEN *et al.*, 2002).

O custo médio do tratamento de pacientes com intoxicação acidental é de US\$ 19.000, enquanto que naqueles que tentaram suicídio esse valor cai para US\$ 8.500. Essa diferença é atribuída ao maior tempo de internação nos pacientes com intoxicação acidental (SCHIODT *et al.*, 1997).

2.2.9. Modelo experimental de hepatotoxicidade por paracetamol

Existem diversos modelos experimentais de IHA. A maioria se baseia no uso de substâncias químicas hepatotóxicas (tetracloreto de carbono, paracetamol, tioacetamida) ou procedimentos cirúrgicos como hepatectomia e cirurgias para devascularização hepática (NEWSOME *et al.*, 2000).

As principais características desejadas em um modelo de IHA são (NEWSOME *et al.*, 2000):

- (1) A IHA induzida deve ser potencialmente reversível;
- (2) A lesão hepática deve ser reprodutível;

- (3) Fácil execução
- (4) A morte por IHA deve ocorrer em intervalo de tempo semelhante ao homem;
- (5) Deve haver uma janela terapêutica adequada entre o estímulo nocivo e a morte
- (6) Baixo custo
- (7) A toxina não deve levar riscos ao manipulador

O modelo murino de hepatotoxicidade por paracetamol preenche estes pré-requisitos e por isso vem sendo amplamente utilizado para a investigação da IHA e potenciais tratamentos. É importante ressaltar que a NAC foi introduzida na prática clínica a partir de estudos experimentais com este modelo.

Neste modelo a extensão da lesão hepática ocorre de modo dose-dependente. O mecanismo principal que desencadeia a necrose (ligação covalente de NAPQI com as proteínas intracelulares) ocorre em um período de 2 a 3 horas após a intoxicação (BULERA *et al.*, 1996; JOLLOW *et al.*, 1973). A evolução morfológica da lesão é semelhante em camundongos e ratos. Ocorre perda de glicogênio e vacuolização de hepatócitos centrolobulares após duas horas da intoxicação. Após 3 horas, vários hepatócitos individuais apresentam núcleos picnóticos e degeneração eosinofílica. Com 6 horas de lesão, já há necrose centrolobular com eosinofilia picnose, cariólise, cariorrexe. Após 12 horas, a necrose é maciça havendo sobreposição de lóbulos hepáticos necróticos adjacentes (MITCHELL *et al.*, 1973).

Este modelo é usado principalmente com o objetivo de compreender os mecanismos patogênicos e fisiopatológicos da IHA bem como de explorar novas opções de tratamento. A maioria dos estudos realiza o tratamento experimental dentro da janela terapêutica de até 3 horas após a intoxicação e outros o fazem antes mesmo da intoxicação, de modo preventivo (HINSON *et al.*, 2002; ITO; ABRIL; *et al.*, 2004; JAMES; MCCULLOUGH *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2010; TERNEUS *et al.*, 2008).

2.3 S-NITROSOGLUTATIONA

2.3.1 Caracterização e estrutura química

A S-nitrosoglutationa (GSNO, figura 5) é um metabólito fisiológico produzido a partir da reação do NO com o GSH. Quimicamente é um s-nitrosotiol, também conhecido como tionitrito. Os nitrosotióis são uma família de moléculas orgânicas cujas estruturas químicas podem ser representadas genericamente como RSNO, sendo R uma cadeia carbônica qualquer. A característica principal dos nitrosotióis é a ligação de um grupo nitroso (-N=O) a um átomo de enxofre de um tiol (MORAKINYO, 2010).

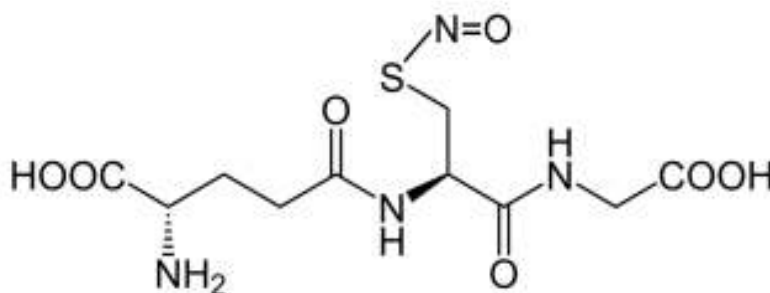


Figura 5: Estrutura química do GSNO

O GSNO e os nitrosotióis têm a propriedade química de liberar equivalentes de NO *in vitro* e *in vivo* e, portanto são considerados como doadores de NO por alguns autores (FEELISCH, 1998; SINGH *et al.*, 1996). São também conhecidos como carreadores ou reservatórios de NO, uma vez que a principal forma de transporte e armazenamento do óxido nítrico no plasma humano é através de um nitrosotiol de alto peso molecular, a s-nitrosoalbumina (STAMLER, *et al.*, 1992).

2.3.2 Síntese e metabolismo

O GSNO e os nitrosotióis são formados *in vivo* a partir da reação do óxido nítrico

com tióis de baixo peso molecular ou tióis protéicos em condições aeróbicas (MORAKINYO, 2010). Até o momento, não foi descrita nenhuma enzima diretamente associada à catálise da formação da ligação RS-NO. No entanto, as enzimas responsáveis pela síntese de óxido nítrico, as três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS), estão relacionadas com o conteúdo de GSNO no organismo (figura 6).

Embora já tenha sido demonstrado que uma variedade de enzimas pode decompor o GSNO *in vitro*, como a tiorredoxina, glutatona peroxidase, gama glutamil transpeptidase e xantina oxidase, nenhuma enzima, à exceção da GSNO redutase (GSNOR), é capaz de regular os níveis de GSNO e dos nitrosotióis endógenos (LIU, L. *et al.*, 2001). A atividade da GSNOR é altamente específica para a molécula do GSNO, mas sua função é bastante robusta já que regula não somente os níveis celulares de GSNO, como também os nitrosotióis protéicos, que estão em equilíbrio com o GSNO (LIU, L. *et al.*, 2001). Além da degradação enzimática, o GSNO pode sofrer degradação térmica, fotoquímica ou induzida por metais de transição, normalmente ocorrendo a formação de GSH oxidado (GSSG) e NO como produtos finais (MORAKINYO, 2010).

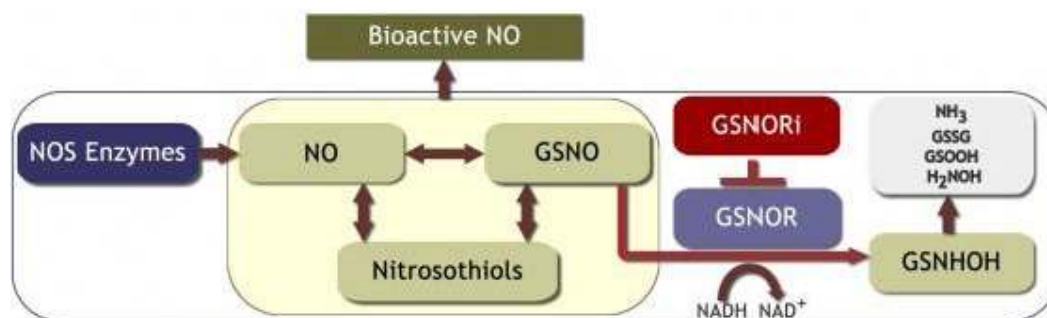


Figura 6: Metabolismo do GSNO.

Fonte: <http://n30pharma.com/platform/gsnor-science/>

O GSNO é um intermediário importante no metabolismo do NO e medeia muitas das vias de sinalização do NO através da modificação pós-translacional de proteínas, via reação de transnitrosação. Trata-se de uma reação reversível, na qual ocorre a transferência de NO, na forma de íon nitrosônio (NO^+), do nitrosotiol para um resíduo de cisteína de outro tiol, seja protéico ou de baixo peso molecular (figura 7). As

reações de transnitroação modulam a função protéica promovendo aumento ou redução de atividade, a exemplo da inibição das caspases por transnitroação (GASTON *et al.*, 2003).

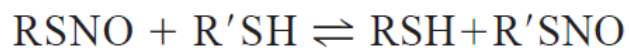


Figura 7: Reação de transnitroação.

2.3.3 Efeitos fisiológicos

De modo geral, o GSNO tem efeitos fisiológicos semelhantes ao NO. O GSNO apresenta potente efeito antiagregante plaquetário. Além disso, o GSNO promove vasodilatação e broncodilatação, devido ao seu efeito relaxante sobre a musculatura lisa vascular e brônquica. Porém, diferentemente de outros doadores de NO, o GSNO atua como vasodilatador arteriosseletivo (GORDGE; ADDIS; *et al.*, 1998). Estes efeitos são observados em concentrações superiores às requeridas para o efeito antiplaquetário (RICHARDSON; BENJAMIN, 2002)

A princípio, acreditava-se que a liberação de NO era necessária para bioatividade dos nitrosotióis. Entretanto, alguns estudos vêm demonstrando que diversos efeitos fisiológicos dos nitrosotióis são estereosseletivos, o que sugere uma possível interação destes com algum receptor de superfície celular (LI; WHORTON, 2005). O efeito broncodilatador e antiagregante do GSNO persiste mesmo com a adição de *scavengers* de NO, o que sugere que o seu mecanismo de ação não depende unicamente da liberação espontânea de NO no meio (GORDGE; ADDIS; *et al.*, 1998). O mecanismo de regulação do tônus vascular e da musculatura lisa brônquica, bem como o efeito antiagregante parece ser mediado em parte por ativação da guanilato ciclase promovendo aumento da concentração de GMP cíclico intracelular. Mecanismos independentes de desta via também já foram propostos (GORDGE; HOTHERSAL; *et al.*, 1998).

2.3.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do GSNO já foi demonstrada em diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* para uma ampla variedade de agentes oxidantes. O GSNO inibe a formação de radicais hidroxil em neurônios dopaminérgicos com potência cem vezes superior ao GSH (RAUHALA *et al.*, 1998). O GSNO é capaz de bloquear a cadeia de peroxidação lipídica *in vivo* por meio da inativação de radicais alcóxil/peróxil e de hidroperóxidos lipídicos (SIMPLICIO, FERNANDA IBANEZ, 2007). O GSNO também reduz a formação de peroxinitrito, um agente mediador de lesão na hepatotoxicidade por paracetamol (KHAN *et al.*, 2005).

2.3.5 Atividade anti-inflamatória

A molécula de GSNO apresenta atividade anti-inflamatória potente. Já foi demonstrado o efeito inibitório do GSNO sobre a quimiotaxia e adesão de leucócitos ao endotélio. (CATERINA, *et al.*, 1995). O GSNO inibe a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 e também a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 (CATERINA, *et al.*, 1995). Alguns estudos revelam que o GSNO exerce uma atividade moduladora sobre as isoformas de NOS, promovendo redução da expressão de iNOS e aumentando a expressão de eNOS (KHAN *et al.*, 2011; KUO *et al.*, 2004). A maioria dos efeitos anti-inflamatórios do GSNO está associada à redução da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B por s-nitrosilação (KHAN *et al.*, 2005).

2.3.6 Efeito hepatoprotetor

Em lesão hepática por isquemia/reperfusão, o sistema microcirculatório é o alvo primário da lesão. Esta se caracteriza por insuficiência de perfusão sinusoidal devido a alterações morfológicas e funcionais ao endotélio (QUINTANA *et al.*, 2002; SHAH

et al., 1997) Fenômeno semelhante ocorre na hepatotoxicidade por paracetamol, que induz lesão endotelial levando à disfunção microcirculatória que antecede a necrose hepatocelular (ITO; MACHEN; *et al.*, 2004). No modelo de isquemia/reperfusão, o GSNO foi capaz de melhorar a função microcirculatória e a capacidade funcional do fígado, prevenindo o aumento de resistência intra-hepática, liberação de LDH, melhorando produção de bile e reduzindo lesão endotelial (QUINTANA *et al.*, 2002). É razoável supor que o GSNO poderia apresentar um papel importante na manutenção ou reestabelecimento da microperfusão hepática na hepatotoxicidade por paracetamol.

Na hepatotoxicidade por paracetamol, o TNF- α é produzido em grandes quantidades em decorrência da ativação das células de Kupffer sendo considerado um dos mediadores de lesão hepática, (HINSON *et al.*, 2010). O GSNO promove proteção contra a morte celular induzida por TNF alfa em cultura de hepatócitos (KIM *et al.*, 1997).

Além disso, o GSNO é capaz de inibir a atividade catalítica da CYP2E1, impedindo a formação de metabólitos reativos que dependem da bioativação por esta enzima (GERGEL *et al.*, 1997). Assim, o GSNO poderia atenuar a hepatotoxicidade do paracetamol por reduzir a formação de NAPQI.

3. HIPÓTESE

GSNO diminui a taxa de mortalidade em um modelo experimental de IHA induzida por paracetamol, por reduzir a extensão de necrose hepática e suas consequências bioquímicas e manifestações sistêmicas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial terapêutico do GSNO na IHA experimental induzida por paracetamol.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o GSNO reduz a mortalidade por IHA induzida por paracetamol.
- Avaliar se o GSNO reduz a extensão da necrose hepática induzida por paracetamol
- Avaliar se o GSNO reduz as manifestações bioquímicas da IHA experimental induzida por paracetamol.
- Comparar a eficácia terapêutica do GSNO com a do GSH e da NAC no tratamento da IHA experimental.

5. JUSTIFICATIVA

A IHA é uma síndrome complexa, multissistêmica e apresenta uma elevada taxa de mortalidade. A intoxicação por paracetamol é a principal causa de IHA em diversos países e poucas opções terapêuticas estão disponíveis. O tratamento à base de NAC é seguro e efetivo quando realizado dentro de 8 a 12 horas da intoxicação para prevenir a disfunção hepática. Porém quando administrado tardiamente apresenta benefício clínico limitado.

O transplante hepático é um procedimento capaz de modificar a história natural da IHA, porém apresenta um custo elevado, requer a imunossupressão do paciente pelo resto da vida e a quantidade de doadores é escassa.

Desse modo, novas alternativas terapêuticas vêm sendo investigadas sob a perspectiva de que possam trazer algum benefício em termos de redução da mortalidade ou da necessidade de transplante hepático.

Em um trabalho recentemente desenvolvido em nosso laboratório, o transplante de células mesenquimais de medula óssea (CMMO) foi utilizado como intervenção terapêutica na IHA induzida por paracetamol. Os resultados evidenciaram um aumento na sobrevivência dos animais tratados com CMMO em relação aos que receberam salina, mesmo sem haver redução na extensão da necrose hepática (SOUZA *et al.*, 2012).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico do GSNO na IHA experimental induzida por paracetamol. Esta molécula tem sido descrita na literatura como um potente antioxidante em modelos experimentais e sistemas celulares. É uma molécula derivada do GSH que apresenta propriedades bioquímicas que poderiam ser aproveitadas como recurso farmacológico para o tratamento da IHA.

6. METODOLOGIA

6.1 REAGENTES

Os reagentes L-Glutationa reduzida (GSH) e N-Acetil-L-cisteína (NAC) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O Paracetamol foi obtido pela empresa *All Chemistry*, Brasil. O Nitrito de Sódio (NaNO_2) utilizado foi proveniente da empresa VETEC. Álcool etílico (92,8° GL) foi obtido da empresa Mega Química. A heparina sódica (5000 U.I./mL) utilizada foi da marca Hepamax-S[®] da Blausiegel. Os anestésicos Ketamina 10% (Vetanarcol[®]) e Xilazina 2% (Calmium[®]) foram adquiridos da Konig e da Agener União, respectivamente. Os reagentes utilizados para as avaliações bioquímicas foram da empresa Labtest Diagnóstica S.A (ALT/GPT Liquiform; AST/GOT Liquiform; Fosfatase Alcalina; Ureia UV Liquiform, Creatinina enzimática, Albumina).

6.2 ANIMAIS

Camundongos C57Bl/6 adultos machos foram mantidos em gaiolas (4 a 5 animais por gaiola) com acesso a ração e água, ciclo de 12 horas de claro/escuro, temperatura média de 22°C e umidade de 55%. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os protocolos institucionais preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) Fiocruz (Protocolo CEUA nº 008/2011).

6.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado em dois experimentos principais (figura 8). O experimento I teve como objetivo avaliar a eficácia do GSNO na taxa de sobrevivência após uma dose letal de 50% (DL50) de paracetamol (350 mg/kg). O experimento II foi conduzido

com o objetivo de avaliar os efeitos do GSNO sobre a extensão da necrose hepática e as alterações bioquímicas após 12 horas da intoxicação por paracetamol (300 mg/kg).

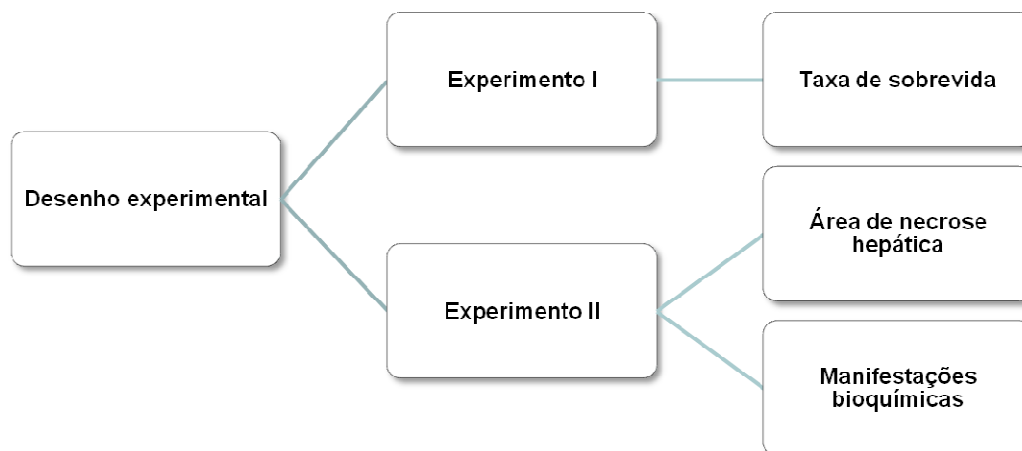


Figura 8: Desenho do estudo.

6.3.1 Descrição do experimento I

Primeiramente, camundongos C57Bl/6 machos (n=75), com cerca de seis a oito semanas, beberam água suplementada com 10% de álcool etílico *ad libitum* durante as três semanas anteriores ao experimento (MCCLAIN *et al.*, 1980). Em seguida, todos os camundongos foram submetidos a jejum de 12 horas e randomizados em 5 grupos de 15 animais (figura 9).

Após o jejum, a IHA foi induzida com a administração intraperitoneal de paracetamol na dose de 350 mg/Kg (tempo = 0h). O paracetamol foi administrado dissolvido em salina 0,9% estéril em concentração final de 15 mg/mL. Os animais do grupo controle negativo receberam apenas volume equivalente de solução salina 0,9% por via intraperitoneal.

Os grupos que receberam paracetamol foram tratados respectivamente com PBS 20 µL/g, NAC 600 µmol/kg, GSH 600 µmol/kg ou GSNO 600 µmol/kg após 3 horas da

intoxicação. O tempo de espera de 3 horas foi definido para permitir que o paracetamol fosse completamente metabolizado pelo fígado, assegurando que o mecanismo de lesão hepática tenha sido estabelecido (JOLLOW *et al.*, 1973) . A taxa de sobrevivência em cada grupo foi avaliada a cada 6 horas ao longo de 96 horas a partir da seguinte fórmula: Taxa de sobrevivência = (nº de animais vivos ÷ 15) x 100.

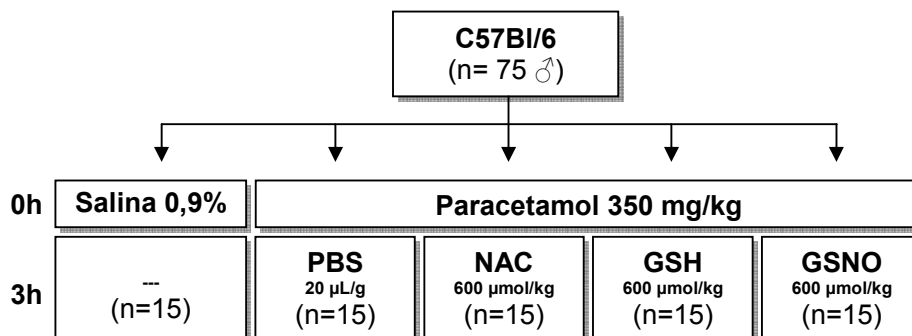


Figura 9: Experimento I: desenho experimental.

6.3.2 Descrição do Experimento II

Camundongos C57Bl/6 machos (n=40) com cerca de seis a oito semanas foram previamente tratados com álcool 10% e jejum de 12 horas de modo idêntico ao experimento I e randomizados em 5 grupos de 8 animais conforme a figura 10. Após 3 horas, os grupos que receberam paracetamol foram tratados respectivamente com PBS 20 µL/g, NAC 600 µmol/kg, GSH 600 µmol/kg ou GSNO 600 µmol/kg. O grupo controle negativo recebeu volume equivalente de solução salina 0,9%. Todos os animais foram eutanasiados após 12 horas da intoxicação para a coleta de sangue e excisão do fígado, conforme descrição nos itens 6.6 e 6.7.

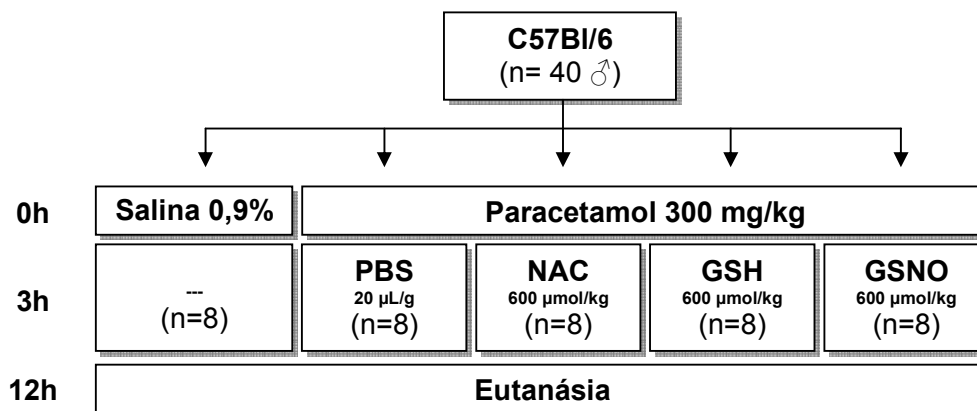


Figura 10. Experimento II: desenho experimental.

6.4. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GSNO

A síntese de GSNO foi realizada imediatamente antes da administração a partir da reação de quantidades equimolares de GSH e nitrito de sódio (NaNO_2) em meio ácido (HART, 1985). GSH (600 μmol ; 184,4 mg) foi dissolvido em 780 μL de água MilliQ acidificada (706 μL de água + 74 μL de ácido sulfúrico concentrado). NaNO_2 (600 μmol ; 41,4 mg) foi dissolvido em 120 μL de água milliQ. A síntese foi realizada a partir da mistura da solução de NaNO_2 na solução acidificada de GSH em gelo e protegida da luz durante 30 minutos. A solução de GSNO foi posteriormente diluída com PBS (pH 7,4) para uma concentração final de 30 $\mu\text{mol/mL}$ e filtrada em filtro de 0,22 μm . A concentração de GSNO foi determinada por espectrometria através do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) igual a 922 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em comprimento de onda (λ) igual a 336 nanômetros em cubeta de quartzo de caminho óptico de 01 centímetro. A caracterização do GSNO foi feita por espectrometria de absorção UV-Visível de 200 a 700 nm, com resolução de 10 nm em espectrofotômetro SpectraMax[®] 190 (Molecular Devices, San Diego, CA).

6.5 PREPARO E ADMINISTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES

GSNO foi preparado conforme descrito no item 6.4. GSH e NAC foram pesados nos respectivos tubos e diluídos em PBS (pH 7,4) para uma concentração final de 30 $\mu\text{mol/mL}$. Em seguida, todas as soluções foram filtradas em filtro de 0,22 μm . As soluções de NAC, GSH e GSNO foram administradas por via intraperitoneal nos animais dos respectivos grupos em dose de 600 $\mu\text{mol/kg}$, volume final de 20 $\mu\text{L/g}$ com o uso de seringa de 1 mL (BD Plastipak) e agulha de 0,45 x 13 mm (BD PrecisionGlide). A solução de PBS foi administrada por via intraperitoneal em volume equivalente (20 $\mu\text{L/g}$).

A solução de paracetamol foi preparada diluindo-se o pó do paracetamol em solução salina 0,9% previamente aquecida em banho-maria (60 °C). A solução foi agitada em vortex até a completa dissolução do paracetamol. A concentração final de paracetamol utilizada foi de 15 mg/mL. A solução foi filtrada em filtro de 0,22 μm e administrada via intraperitoneal com o uso de seringa de 1 mL (BD Plastipak) e agulha de 0,45 x 13 mm (BD PrecisionGlide).

6.6 COLETA DE SANGUE E EUTANÁSIA

Depois de decorridas 12 horas da intoxicação com paracetamol 300 mg/kg, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina/Xilazina (50/5 mg/Kg) diluídas em PBS por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram colhidas através do plexo retro-orbital e transferidas para microtubos contendo 10 μL de heparina. O sangue foi centrifugado a 1.200 g, 10 minutos, 4°C para a coleta do plasma, que foi armazenado a 4°C até o momento das determinações bioquímicas. Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ para posterior excisão do fígado.

6.7 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO FÍGADO

Após a eutanásia, a cavidade peritoneal foi aberta através de incisão mediana para excisão do fígado. O órgão foi removido e lavado em PBS gelado para remoção do excesso de sangue. Fragmentos de fígado em forma de cunha foram obtidos com o auxílio de uma lâmina de barbear, em seguida, fixados em solução de formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram enviadas ao serviço de histotecnologia para desidratação em álcool, diafanização com xilol, impregnação e inclusão em blocos de parafina. Secções de 5 µm de espessura foram obtidas por microtomia e coradas com hematoxilina e eosina para confecção das lâminas histológicas.

6.8 AVALIAÇÃO DA ÁREA DA NECROSE HEPÁTICA

Cada lâmina foi fotografada em três campos aleatórios e sem sobreposição entre si em aumento de 4x e 10x em microscópio óptico CX 41 (Olympus, Tóquio, Japão). As fotografias foram salvas em arquivo tipo JPG e carregadas no *software* Image Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, EUA). A área de necrose hepática em cada animal foi calculada como a média obtida dos três campos analisados pela equação abaixo. As áreas que não continham hepatócitos (lúmen de veia central e espaço porta) foram desconsideradas do cálculo.

$$\text{Percentual de necrose} = \frac{\text{área de hepatócitos necróticos}}{\text{área total de hepatócitos}} = \frac{\text{área necrótica} - \text{área de lúmen (veia central)}}{\text{área total} - \text{área de lúmen (veia central + porta)}} \times 100$$

6.9 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

As determinações das atividades de AST, ALT, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, e albumina ao final do experimento II foram feitas por métodos colorimétricos

enzimáticos padrão utilizando-se kits da Labtest Diagnóstica. As determinações foram realizadas por método de automação no equipamento Labmax 240 (Labtest, Brasil) no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados e analisados no pacote estatístico *GraphPad versão 5.0*. Os dados foram avaliados quanto à sua distribuição normal através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de *One Way ANOVA* seguida pelo pós-teste de Bonferroni para avaliação das diferenças individuais entre os grupos. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para a avaliação da curva de mortalidade foi utilizado o teste *Log-Rank*.

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO DO GSNO

O GSNO foi sintetizado no próprio laboratório a partir da reação de GSH e NaNO em quantidades equimolares em meio ácido. O GSNO apresenta uma característica comum dos s-nitrosotióis que é um pico de absorção no comprimento de onda de 336 nm pelo grupo cromofórico s-nitroso. A figura 11 apresenta o espectro de absorção no ultravioleta/visível do GSNO. O espectro obtido evidenciou uma forte banda de absorção em torno de 336 nm com intensidade diretamente proporcional à concentração avaliada, sugerindo a presença de GS-NO na amostra.

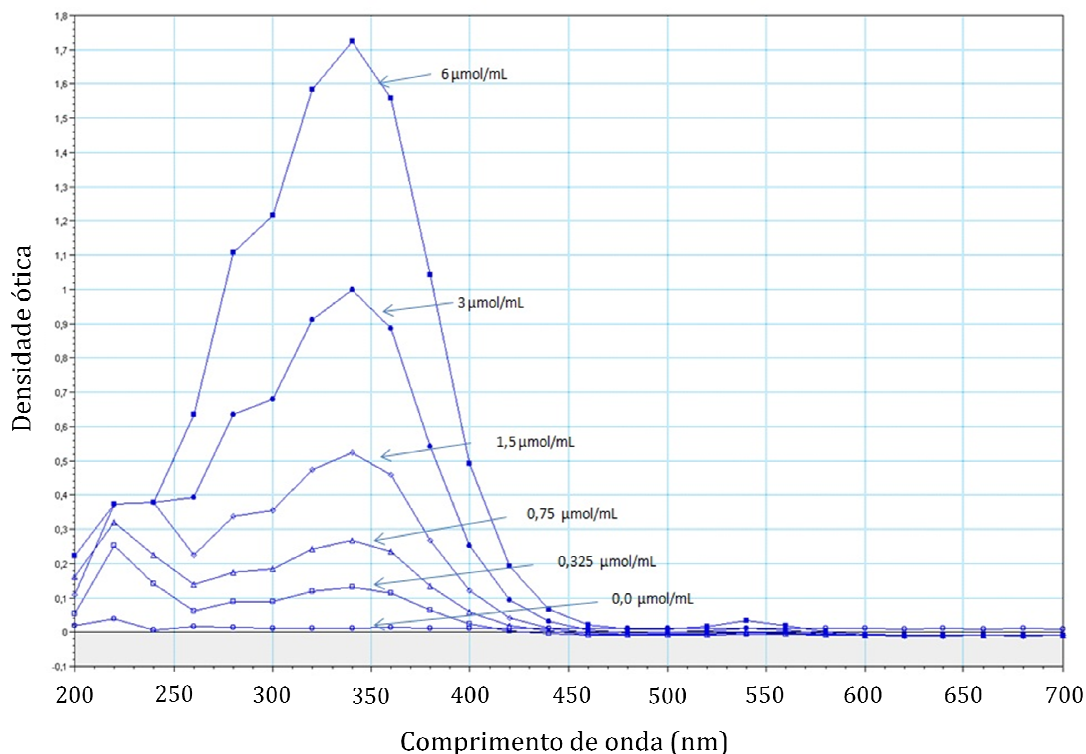


Figura 11: Caracterização do GSNO por espectroscopia ultravioleta/visível: Soluções de GSNO em diferentes concentrações foram preparadas e diluídas em PBS em pH 7,4. O espectro de absorção foi realizado no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 700 nm, com resolução de 10 nm.

7.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

A taxa de sobrevivência (figura 12) foi avaliada como o desfecho principal deste estudo. Neste experimento (n=15 animais por grupo), os camundongos foram submetidos a um período de 3 semanas de condicionamento com álcool 10% *ad libitum* via oral. Em seguida os animais permaneceram em jejum por 12 horas. Uma dose letal de 50% (DL50) de 350 mg/Kg foi administrada para indução de IHA. Após 3 horas, o tratamento foi realizado com administração de 600 $\mu\text{mol/Kg}$ de NAC, GSH ou GSNO ou volume equivalente de PBS.

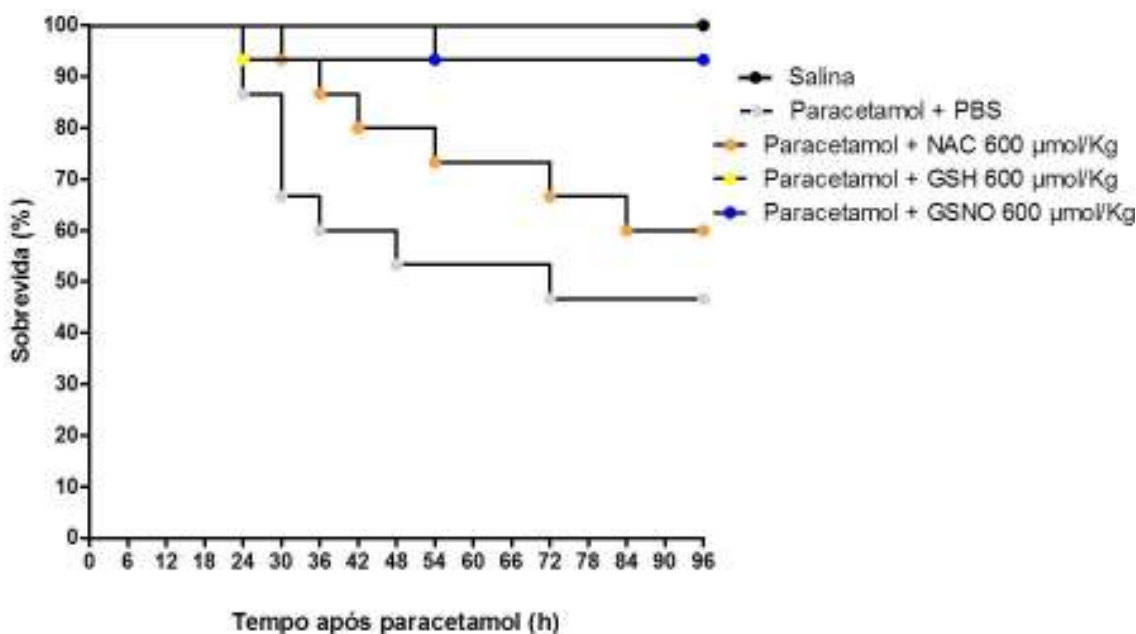


Figura 12: Curva de sobrevivência. A taxa de sobrevivência foi avaliada a cada 6 horas após uma dose de 350mg/Kg de paracetamol. Os animais foram tratados após 3 horas da intoxicação com 600 $\mu\text{mol/Kg}$ de NAC, GSH, GSNO ou volume equivalente de veículo (PBS). Teste de Mantel-Cox ($p = 0,0002$).

Nos animais tratados com PBS observou-se uma taxa de mortalidade de cerca de 50% após 96 horas. Os animais tratados com NAC apresentaram taxa de mortalidade de 60% após o mesmo período. A taxa de sobrevivência foi de 93% (1 óbito) nos animais tratados com GSH ou GSNO. Neste experimento, o maior número de óbitos (pico) ocorreu no período entre 24 e 48 horas após a intoxicação do paracetamol. Até o prazo de 48 horas, apenas os grupos Salina e GSNO permaneceram sem óbito.

7.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE HEPÁTICA

A extensão de necrose hepática foi avaliada por morfometria após 12 horas da intoxicação por paracetamol no experimento II. A análise morfológica do fígado (figura 13) revelou mínima presença de hepatócitos com características necróticas no grupo salina. O parênquima hepático de modo geral apresentava-se preservado morfológicamente. Foram observados escassos hepatócitos individuais ou grupos de hepatócitos apresentando eosinofilia e picnose nuclear, sem padrão definido de localização, podendo ser em área perivenular, bem como em áreas portais.

Nos animais que receberam paracetamol, pode-se observar um padrão de necrose coagulativa centrolobular, estendendo-se para lóbulos hepáticos adjacentes. Com frequência, foi possível identificar diversos focos hemorrágicos nas áreas necróticas. Nas áreas perivenulares, o processo necrótico apresentou-se mais avançado com ausência de material nuclear (cariólise) e formando um parênquima fantasma.

Circundando as áreas necróticas, pode-se observar uma borda de hepatócitos em processo de degeneração, formando uma linha divisória entre a zona de necrose e a zona portal. Observou-se a ausência de infiltrados polimorfonucleares. Em alguns tecidos com lesões mais extensas foi possível identificar a presença de hepatócitos necróticos até mesmo em áreas periportais.

Além disso, foi observada a escassa presença de vacúolos intracelulares, compatíveis com esteatose microvesicular em todos os grupos avaliados, incluindo o grupo salina. A lesão hepática não apresentou diferenças no seu padrão morfológico entre os diversos grupos que receberam paracetamol.

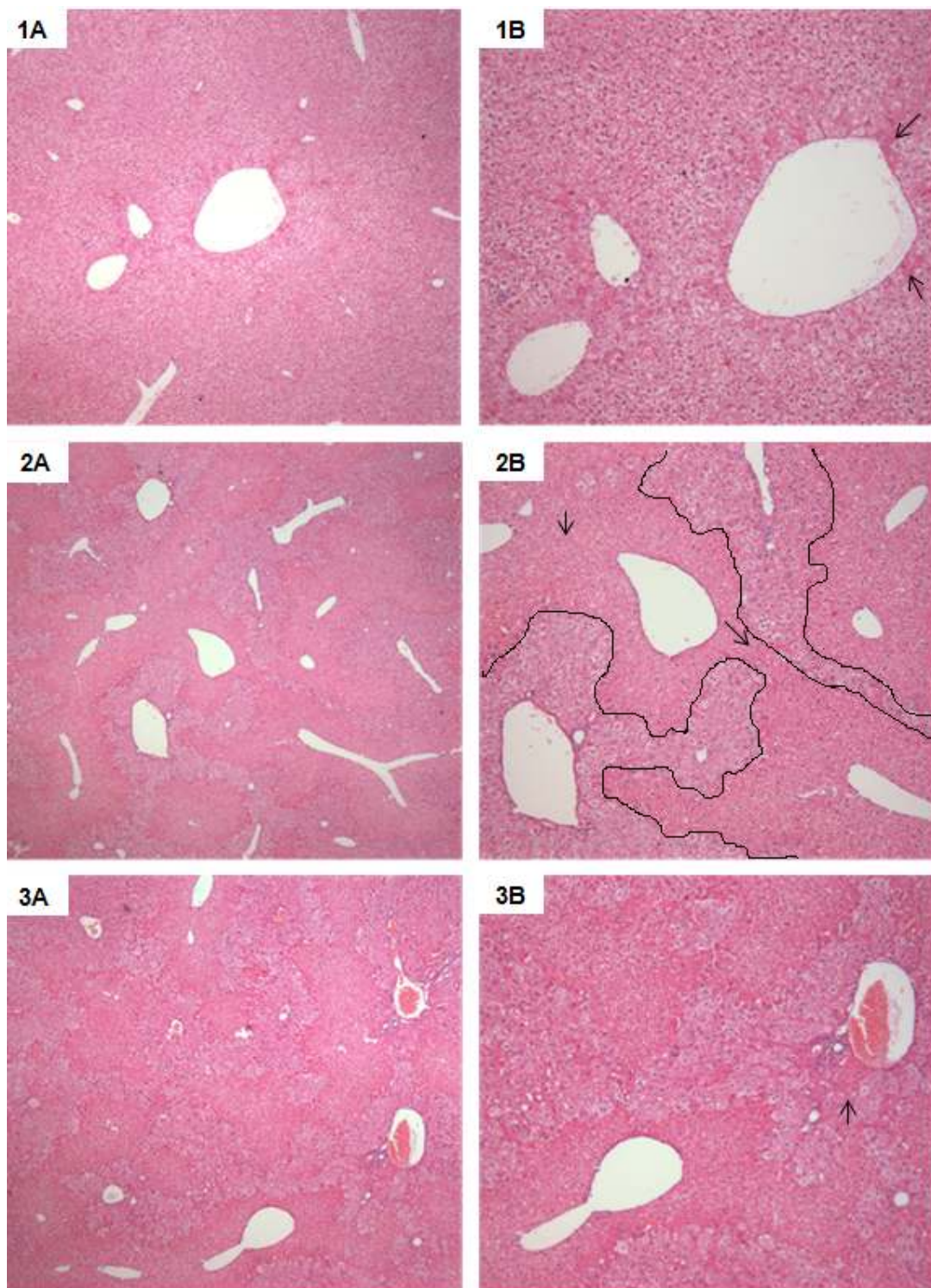


Figura 13: Avaliação histológica da lesão hepática. A avaliação histológica foi feita em secções histológicas de tecido hepático corado com hematoxilina-eosina. As figuras representam a lesão hepática após 12 horas da intoxicação por paracetamol. (1) Grupo salina 0,9%. Parênquima preservado, com presença de escassos hepatócitos com eosinofilia e picnose nuclear (seta). (2) Paracetamol 300 mg/Kg + PBS. Necrose centrolobular (área delimitada por linha) com ausência de núcleos (cariólise) e sobreposição de lobulos necróticos (setas) (3) Paracetamol 300 mg/Kg + NAC 600 μ mol/Kg. Necrose centrolobular com padrão semelhante. Evidência de necrose em alguns hepatócitos portais (seta); (A) Magnificação 4x; (B) Magnificação 10x.

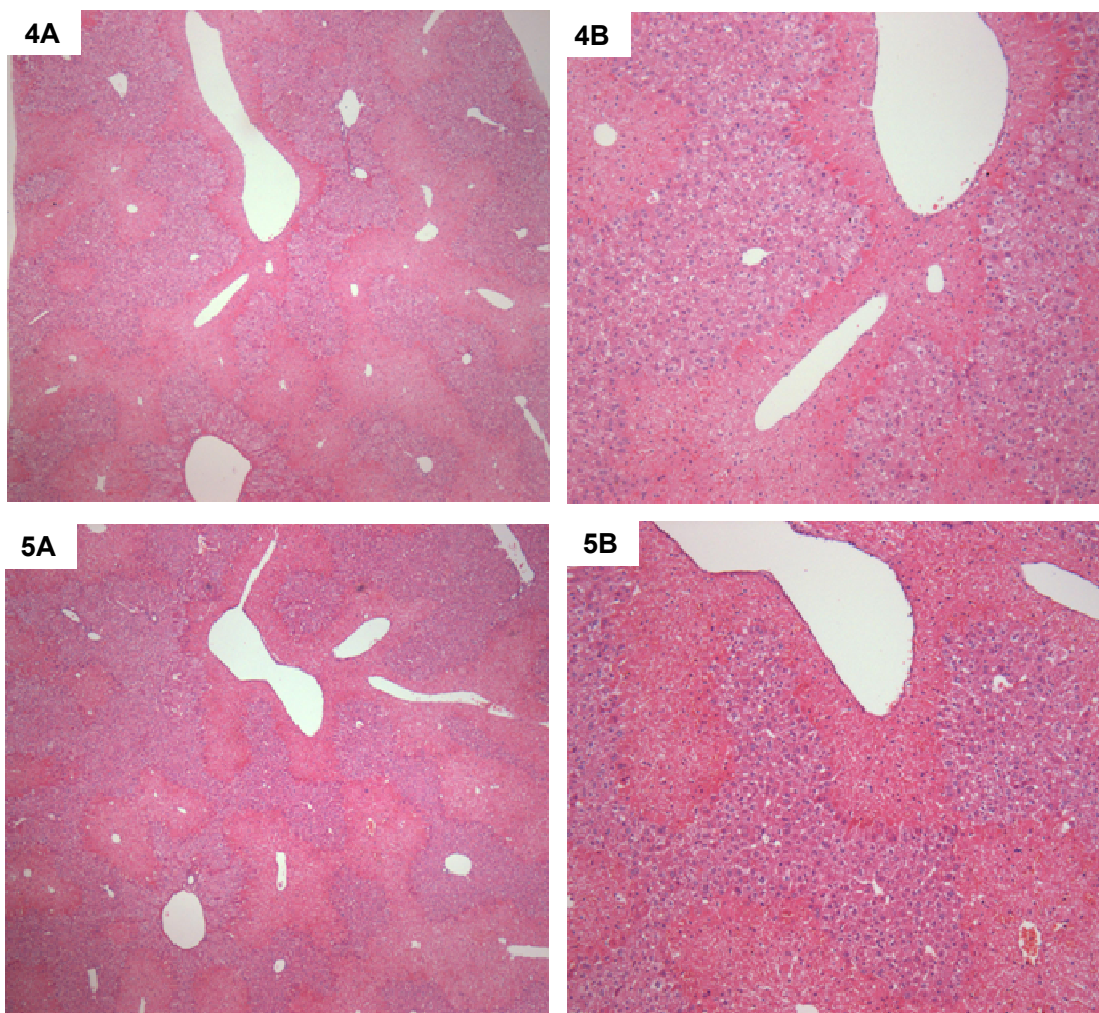


Figura 13: Avaliação histológica da lesão hepática (continuação). (4) Paracetamol 300mg/Kg + GSH 600 μ mol/Kg. Padrão de necrose similar aos demais grupos que receberam paracetamol. (5) Paracetamol 300mg/Kg + GSNO 600 μ mol/Kg. Padrão morfológico de necrose perivenular semelhante aos demais grupos que receberam paracetamol. (A) Magnificação 4x; (B) Magnificação 10x.

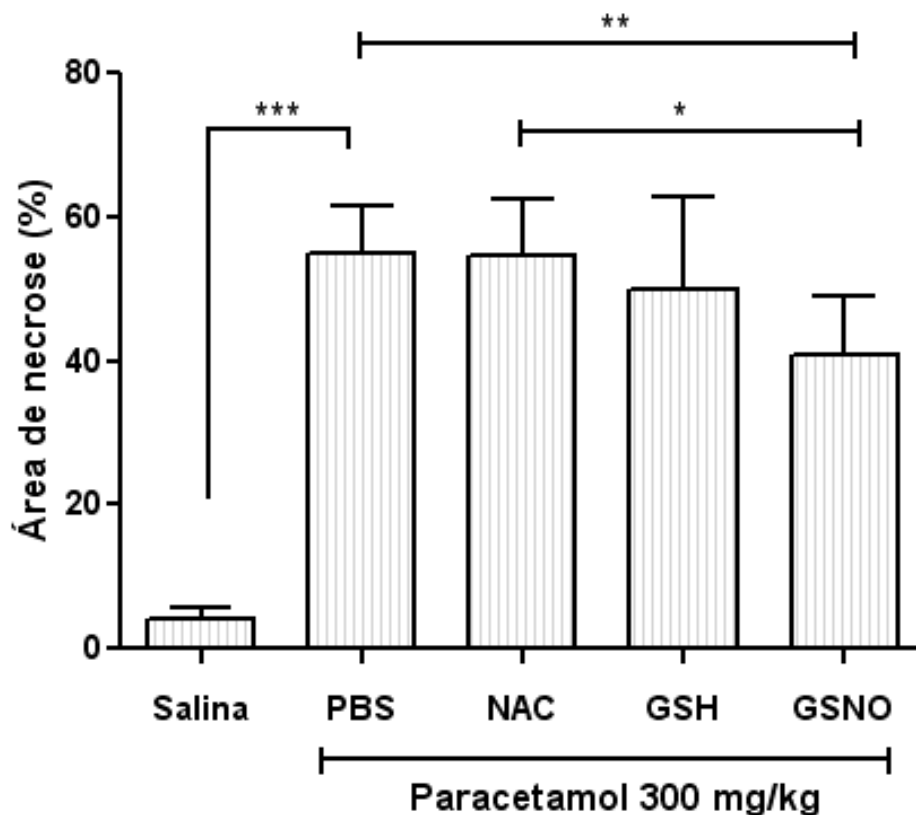


Figura 14: Área de necrose hepática. A área (%) de necrose hepática foi avaliada por morfometria após 12 horas da intoxicação por paracetamol. As barras representam a média \pm desvio padrão do percentual de necrose de 8 animais por grupo. Foi utilizado o teste estatístico *One Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A análise morfométrica (figura 14) da área de necrose hepática revelou a presença mínima de cerca de 4% de necrose nos animais do grupo salina. A área de necrose nos animais que receberam paracetamol e PBS foi de cerca de 55%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBS (55% \pm 6,4), NAC (54% \pm 7,6) e GSH (50% \pm 12,8). Os animais tratados com GSNO apresentaram percentual de necrose em torno de 40% (\pm 8,0), redução estatisticamente significativa em comparação com PBS, NAC, mas não com GSH.

7.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

7.4.1 ALT e AST

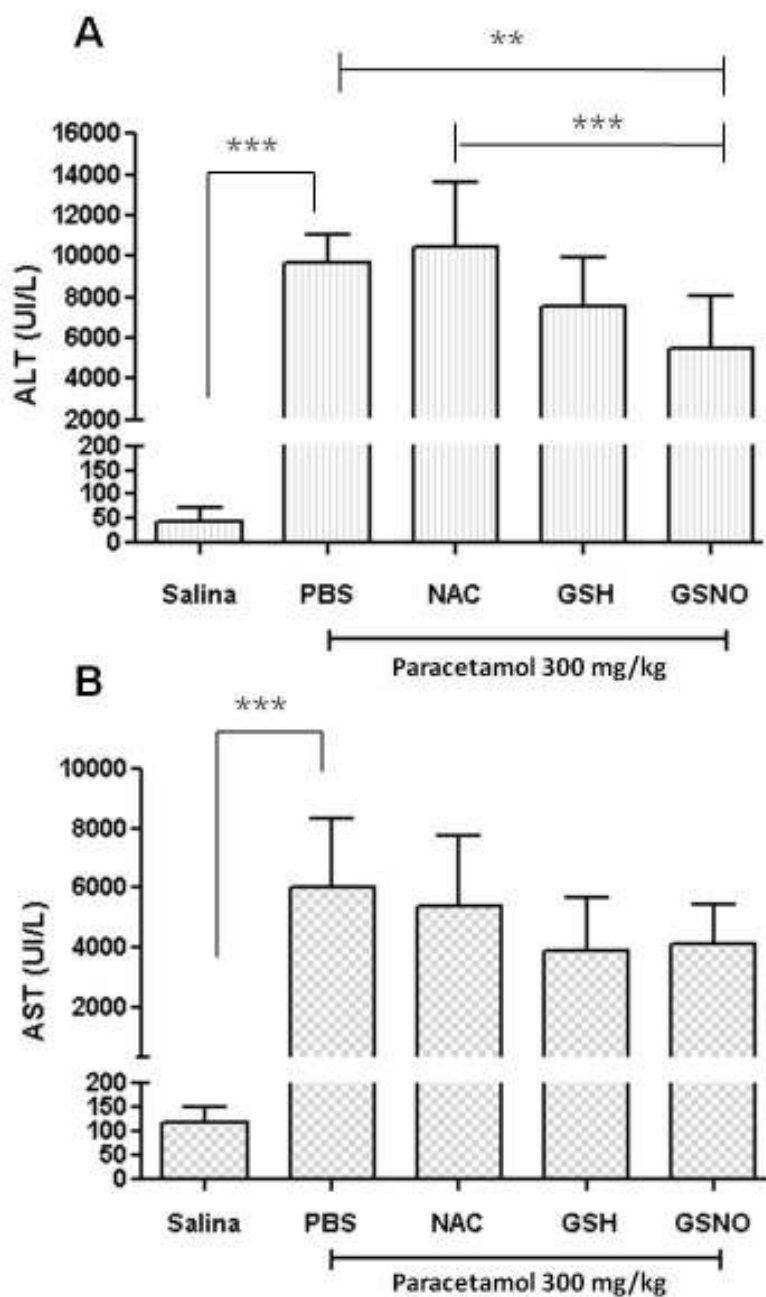


Figura 15: ALT e AST. A avaliação da atividade das transaminases hepáticas ALT (A) e AST (B) foi feita após 12 horas da intoxicação por paracetamol como marcadores de lesão hepatocelular. As barras representam a média \pm desvio padrão da atividade (UI/L) de ALT e de AST de 8 animais por grupo. Foi utilizado o teste estatístico *One Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os animais do grupo salina apresentaram valores de ALT em torno de 50 UI/L, enquanto que os animais que receberam paracetamol e PBS apresentaram atividade sérica de ALT em torno de 10.000UI/L após 12 horas da intoxicação por paracetamol. Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de ALT para os animais tratados com NAC em comparação com PBS. O grupo tratado com GSNO apresentou valores de ALT em torno de 5.000UI/L. Houve redução estatisticamente significativa de ALT no grupo GSNO quando comparado com PBS e NAC, mas não com o GSH. A intoxicação por paracetamol produziu aumento de AST em todos os grupos em comparação ao grupo salina. Embora haja uma tendência de redução de AST nos grupos GSH e GSNO, nenhum tratamento foi efetivo em reduzir significativamente a atividade de AST em comparação com o grupo tratado PBS

7.4.2 Fosfatase alcalina

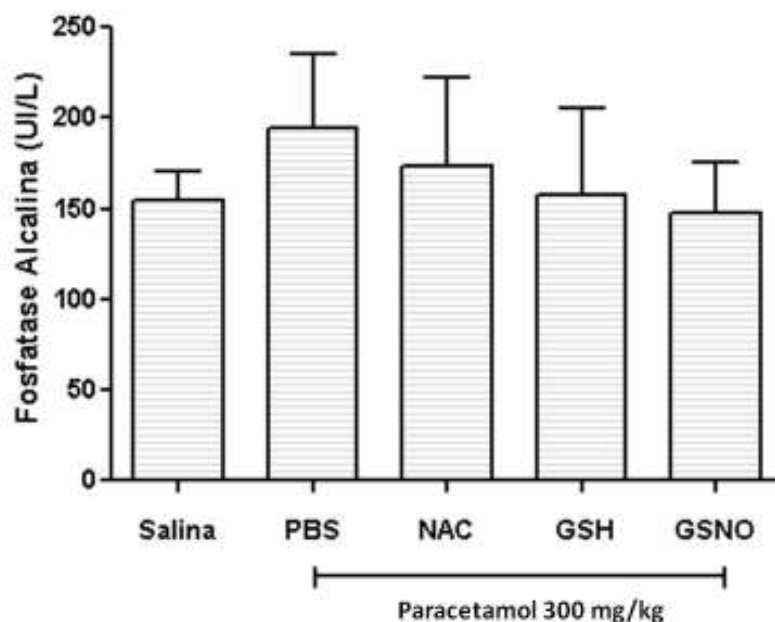


Figura 16: Fosfatase alcalina. A avaliação da atividade da fosfatase alcalina foi feita após 12 horas da intoxicação por paracetamol. As barras representam a média \pm desvio padrão da atividade (UI/L) de fosfatase alcalina de 8 animais por grupo. Foi utilizado o teste estatístico *One Way ANOVA*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A atividade de fosfatase alcalina foi avaliada após 12 horas da intoxicação como marcador de lesão hepática. Observou-se uma leve tendência de aumento no grupo PBS, no entanto, não houve diferença estatística em nenhum dos grupos avaliados.

7.4.3 Ureia e Creatinina

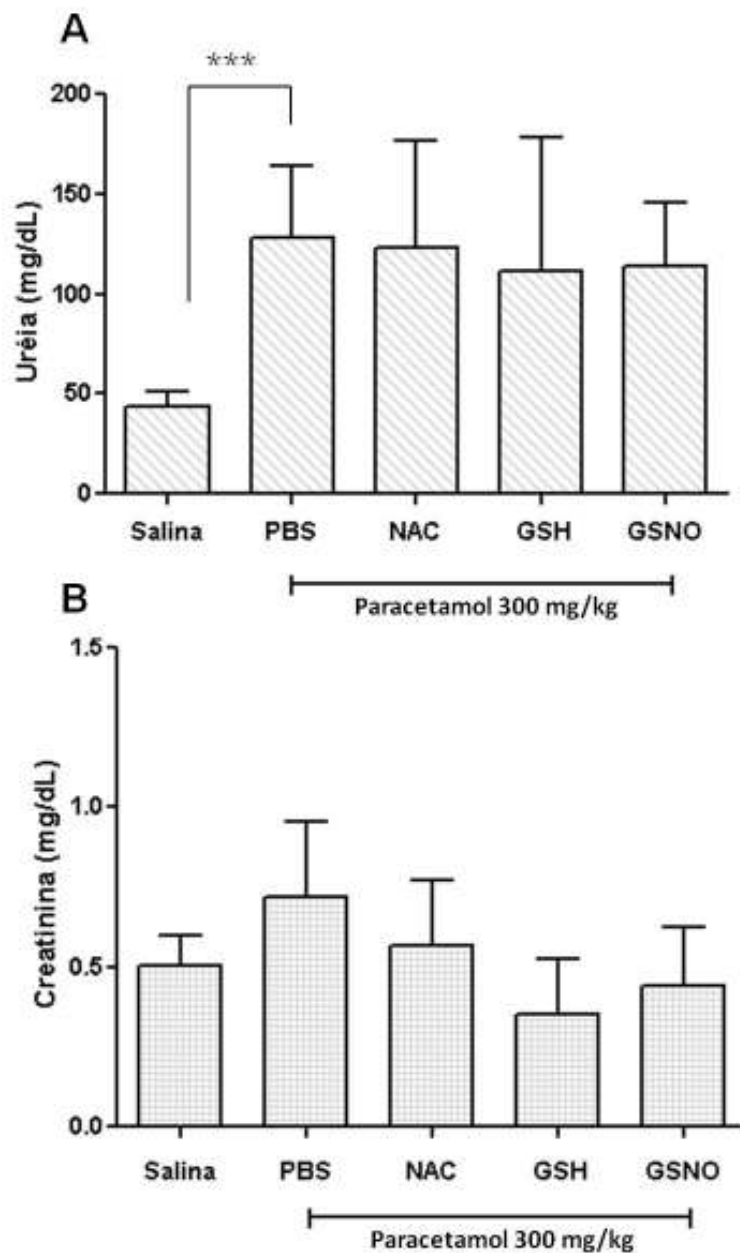


Figura 17: Ureia e creatinina. A avaliação de ureia (A) e creatinina (B) foi realizada após 12 horas da intoxicação por paracetamol. As barras representam a média \pm desvio padrão da concentração (mg/mL) de ureia e creatinina de 8 animais por grupo. Foi utilizado o teste estatístico *One Way ANOVA* para comparação entre os grupos.

Todos os animais que receberam paracetamol apresentaram elevação estatisticamente significativa dos níveis de ureia em comparação com o grupo salina. Entretanto, não houve diferença entre os diferentes tratamentos. Não houve alteração significativa nos níveis séricos de creatinina em nenhum dos grupos avaliados.

8. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial benefício da utilização do GSNO como intervenção farmacológica em um modelo experimental de IHA induzida por paracetamol. Para tanto, foram avaliados três desfechos principais: taxa de sobrevivência após uma DL50% de paracetamol; área de necrose hepática e manifestações bioquímicas após 12 horas da intoxicação.

A administração intraperitoneal de paracetamol em dose de 350 mg/kg foi capaz de induzir uma taxa de mortalidade de 50% (DL50) em camundongos tratados apenas com PBS. O tratamento com NAC conferiu pouca ou nenhuma proteção contra mortalidade quando administrado em dose de 600 $\mu\text{mol/Kg}$ após 3 horas da intoxicação. Por outro lado, o tratamento com GSNO em dose equimolar foi capaz de reduzir significativamente a taxa de mortalidade em relação aos animais tratados com PBS ou NAC. Não se observou diferença de mortalidade entre os animais tratados com GSNO ou GSH, com um óbito em cada grupo. No grupo GSNO o óbito ocorreu mais tardiamente com diferença de 30 horas. Se esta diferença temporal fosse estatisticamente confirmada, este achado seria relevante na tentativa de prolongamento do tempo de vida de pacientes que aguardam disponibilidade de órgão para transplante.

A baixa eficácia da NAC neste estudo poderia ser atribuída, sobretudo a dois fatores: a dose administrada pode ter sido insuficiente para conferir proteção; ou o tratamento foi realizado muito tardiamente. Uma dose de 650 $\mu\text{mol/kg}$ de NAC é suficiente para ressintetizar duas vezes o conteúdo de GSH do fígado de um camundongo (SAITO *et al.*, 2010). O tratamento com NAC é mais efetivo quando administrado dentro de 1 hora da intoxicação em camundongos. Por outro lado, o benefício é mínimo quando administrado 3 a 4 horas depois (JAMES; MCCULLOUGH; *et al.*, 2003; TERNEUS *et al.*, 2008) Assim, é mais provável que o tempo de tratamento tardio (3 horas) tenha influenciado negativamente na eficácia da NAC neste estudo.

Este resultado levanta a seguinte questão: GSNO apresenta benefício mesmo

quando administrado tardiamente? Esta pergunta assume especial relevância, uma vez os que pacientes com admissão hospitalar tardia apresentam taxa de mortalidade mais elevada em relação aos que recebem tratamento hospitalar precoce (MAKIN *et al.*, 1995).

O dano induzido pelo paracetamol aos hepatócitos é atribuído, dentre outros fatores, à ligação covalente do NAPQI às proteínas celulares. Isto leva à perda de função de uma série de proteínas, incluindo proteínas mitocondriais, ocasionando aumento abrupto de permeabilidade da membrana mitocondrial interna a íons e solutos de baixo peso molecular, desacoplamento da fosforilação oxidativa, intumescimento mitocondrial e redução na síntese de ATP (HINSON *et al.*, 2010).

Os achados deste estudo demonstraram superioridade de GSH e GSNO em relação a NAC na proteção contra necrose hepática e mortalidade. De modo semelhante, no estudo de Saito e colaboradores (2011), o GSH apresentou maior eficácia no tratamento da hepatotoxicidade experimental por paracetamol em relação a uma dose equimolar de NAC. Os autores propuseram um mecanismo alternativo que justifica a diferença observada. Embora ambas as moléculas sejam capazes de fornecer a mesma quantidade de cisteína para ressintetizar o GSH hepático, o GSH administrado pode atuar também como substrato energético, preservando de forma mais eficiente os níveis de ATP e prevenindo a morte celular.

A análise histopatológica evidenciou um processo de necrose hepatocelular maciça, sobretudo em áreas perivenulares. Não foram evidenciadas diferenças no padrão de necrose entre os grupos estudados. Todos os grupos apresentaram os mesmos elementos de lesão hepática, com necrose perivenular, áreas hemorrágicas, e bordas de hepatócitos em degeneração separando as áreas necróticas das áreas portais.

A zona centrolobular é altamente susceptível a estresse oxidativo e diversos mecanismos favorecem a lesão nessa área. Por exemplo, a expressão de CYP450 ocorre predominantemente na zona centrolobular, o que favorece a formação de metabólitos reativos como o NAPQI. O gradiente de tensão de oxigênio, favorecendo as áreas centrais (aferentes) em detrimento da zona centrolobular (eferente) é outro

fator que favorece a lesão nessa zona (LINDROS, 1997). Em contrapartida as enzimas de glicuronidação e de conjugação distribuem-se mais fortemente nas áreas perivenulares, o que confere certo grau de proteção, juntamente com um sistema de captação de cisteína mais eficiente (SAIKI *et al.*, 1992).

A lesão centrolobular também é considerada resultado da interação entre os hepatócitos e as células de Kupffer. Estas são mais resistentes à necrose induzida por paracetamol do que os hepatócitos. Uma vez ativadas, as células de Kupffer atuam como fontes de fatores pró-inflamatórios, quimiotáticos e intermediários reativos de oxigênio, que atuam como mediadores da lesão hepática (BOYD; BERECZKY, 1966).

As transaminases são amplamente utilizadas como marcadores de lesão hepática, sendo AST um preditor independente de morte em lesões hepatocelulares ocasionadas por medicamentos (BJÖRNSSON; OLSSON, 2005). A maioria dos indivíduos com hepatotoxicidade induzida por paracetamol apresenta elevação de transaminases dentro das primeiras vinte e quatro horas da ingestão. Níveis de AST e ALT superiores 1.000 UI/L normalmente estão associados à disfunção hepática e têm sido utilizados como valor limiar para definição de hepatotoxicidade (CRAIG, DARREN *et al.*, 2011). Neste estudo, todos os animais que receberam paracetamol apresentaram valores de AST e ALT acima de 1000 UI/L após 12 horas. Isto significa que nenhum tratamento foi capaz de abreviar o desenvolvimento de hepatotoxicidade nas condições experimentais avaliadas. Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade sérica de AST entre os grupos que receberam paracetamol. Por outro lado, o tratamento com GSNO promoveu redução de ALT em comparação com PBS e NAC, sugerindo um menor grau de lesão hepática, que foi confirmado na análise da área de necrose (figura 14).

Não houve diferença estatisticamente significativa nos marcadores de função renal, ureia e creatinina, entre os animais que receberam paracetamol. Entretanto todos os animais que receberam paracetamol apresentaram níveis séricos de ureia elevados, refletindo um possível comprometimento da função renal, uma vez que a capacidade de conversão de amônia em ureia pelo fígado está prejudicada durante a IHA (THERUVATH *et al.*, 2006).

Embora a redução da capacidade sintética do fígado favoreça o desenvolvimento de hipoalbuminemia, este quadro não é muito frequente devido à meia-vida longa da albumina (LARSEN; BJERRING, 2011). Neste estudo não houve diferenças na concentração de albumina no plasma dos animais após 12 horas da intoxicação (dado não apresentado).

A atividade inibitória de GSNO sobre a CYP2E1 pode prevenir a formação de NAPQI e reduzir a lesão hepática. Entretanto, a administração de GSNO após 3 horas da intoxicação não favorece este mecanismo de proteção porque após esse tempo praticamente todo o paracetamol já foi metabolizado (JOLLOW *et al.*, 1973).

Embora o GSNO tenha promovido uma redução estatisticamente significativa na extensão de necrose hepática, esta diferença pode não ser suficiente, por si só, para produzir a diferença de mortalidade observada. Deste modo, mecanismos de ação extra-hepáticos podem ser levantados para justificar a diferença de mortalidade observada entre os grupos.

Uma das principais causas de morte na IHA é o desenvolvimento de edema cerebral, cujo mecanismo envolve o rompimento da barreira hematoencefálica (THUMBURU *et al.*, 2011). Um estudo recente demonstrou o potencial neuroprotetor do GSNO em modelo experimental de lesão cerebral por traumatismo. O tratamento com GSNO promoveu redução da produção de peroxinitrito e reduziu o edema cerebral por manter a integridade da barreira hematoencefálica (KHAN *et al.*, 2011).

Embora o GSNO tenha apresentado efeito protetor neste trabalho, é importante considerar que suas propriedades são pleiotrópicas, o que implica na possibilidade de ocorrência de inúmeros efeitos adversos. A atividade antioxidante do GSNO pode ser contraposta pelo seu efeito pro-oxidante. Quando presente em concentrações elevadas, o GSNO e os nitrosotióis podem induzir estresse nitrosativo e lesão celular (BROWN-STEINKE *et al.*, 2010; LIU. *et al.*, 2001). Pacientes com IHA apresentam coagulopatia com risco aumentado de sangramento. O GSNO é um potente anticoagulante e antiagregante plaquetário e no cenário da IHA poderia aumentar o risco de sangramento nestes indivíduos (LIU, L. *et al.*, 2001). Além disso, o efeito vasodilatador do GSNO que pode contribuir para melhora da perfusão hepática

poderia, por outro lado, agravar a hipotensão e o edema cerebral por vasodilatação periférica (POLSON; LEE, 2005).

A literatura acerca do uso de doadores de NO como tratamento da hepatotoxicidade por paracetamol é bastante escassa. Foram identificados dois estudos publicados em revistas indexadas no Pubmed. A administração de um doador de NO derivado do ácido ursodesoxicólico após duas horas da intoxicação por paracetamol reduziu a taxa de mortalidade, melhorou as alterações histopatológicas hepáticas, preservou a integridade mitocondrial e reduziu a expressão de Interferon gama, TNF- α , Fas/Fas ligante e iNOS. Entretanto, o estudo foi recolhido por problemas de autenticidade na apresentação de um dos resultados (FIORUCCI *et al.*, 2004). Um doador de NO hepatosselativo, PYRRO/NO, foi avaliado na hepatotoxicidade experimental por paracetamol. Esta molécula libera NO quando é metabolizada pelas enzimas microsossomais hepáticas. Os achados deste estudo demonstraram que PYRRO/NO conferiu proteção hepática evidenciada por redução de atividade sérica de ALT, redução de estresse oxidativo e congestão hepática. Entretanto, a administração de PYRRO/NO foi realizada antes da intoxicação pelo paracetamol, e os efeitos foram limitados quando administrado após duas horas (LIU *et al.*, 2003). O presente estudo demonstrou pela primeira vez que um doador de NO da classe dos nitrosotióis é capaz de reduzir lesão hepática e reduzir a mortalidade na IHA experimental. O efeito hepatoprotetor do GSNO pode estar associado, sobretudo, à sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, bem como à sua capacidade moduladora da microcirculação hepática. É possível que o GSNO possa melhorar a perfusão hepática por meio da vasodilatação, reduzindo os danos induzidos pela disfunção microcirculatória. Neste cenário, o GSNO pode atuar na modulação das isoformas de NOS no fígado, reduzindo expressão de iNOS evitando a formação de peroxinitrito e induzindo a expressão de eNOS aumentando o fluxo sanguíneo. Além disso, o GSNO previne morte de hepatócitos induzida por citotoxicidade por TNF- α , citocina produzida em grandes quantidades durante a IHA (KIM *et al.*, 1997). Entretanto é importante salientar que o TNF- α pode apresentar um papel protetor na IHA, uma vez que animais *knockout* para receptor de TNF- α apresentavam hepatotoxicidade mais intensa (CHIU *et al.*, 2003). Não foram observadas diferenças entre GSNO e GSH nos parâmetros avaliados. Em outras palavras, a porção NO da molécula do GSNO não promoveu ganho significativo na proteção contra

mortalidade e lesão hepática. Não se pode descartar que a porção glutationil, comum a ambas as moléculas, pode ter sido responsável pelos efeitos observados, uma vez que o mecanismo clássico de proteção baseia-se na ligação do GSH ao NAPQI. Portanto, outros doadores de NO não nitrosotióis, a exemplo do nitroprussiato de sódio, poderiam ser utilizados como controle para melhor compreensão do papel do NO neste modelo.

Estudos recentes sugerem que NAC é capaz de reduzir o tempo de internamento, a necessidade de transplante hepático e de aumentar a taxa de sobrevida pós-transplante em pacientes com IHA induzida por outras causas (KORTSALIOUDAKI *et al.*, 2008). Assim, seria razoável avaliar o potencial do GSNO em outros modelos experimentais de IHA, uma vez que o GSNO apresentou eficácia superior à NAC neste estudo.

Atualmente, inibidores de GSNOR estão em fase de desenvolvimento, (ensaios clínicos fase 2) com resultados promissores para o tratamento da asma (SUN *et al.*, 2011). Os resultados deste estudo abrem a perspectiva de investigação dos inibidores de GSNOR para o tratamento da IHA.

9. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o GSNO é efetivo como tratamento da IHA experimental induzida por paracetamol. O GSNO reduz a mortalidade, a extensão de necrose hepática, porém tem efeito limitado sobre as manifestações bioquímicas. A eficácia do GSNO é superior a NAC e idêntica ao GSH em dose equimolar. O efeito protetor do GSNO parece independender da porção nitroso da molécula, uma vez que não houve diferença entre GSNO e GSH nos parâmetros avaliados.

10. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre perspectivas para a avaliação dos possíveis mecanismos extra-hepáticos envolvidos na proteção conferida pelo GSNO na IHA. A encefalopatia pode ser estudada por meio da análise da lesão em barreira hematoencefálica através do teste de Evan's Blue, bem como, da determinação do conteúdo de água no cérebro para estimar o grau de edema cerebral. Além disso, marcadores inflamatórios como TNF- α e IL-1, e de estresse oxidativo, como nitrotirosina, devem ser avaliados. Outros doadores de NO, não nitrosotíóis, podem ser utilizados como controle para melhor compreensão do papel do NO neste modelo. Por fim, os efeitos do GSNO podem ser avaliados em modelos experimentais de IHA não induzida por paracetamol, para as quais não existem tratamentos farmacológicos estabelecidos.

REFERÊNCIAS

- BERNAL, W.; AUZINGER, G.; DHAWAN, A.; WENDON, JULIA. Acute liver failure. **Lancet**, v. 376, n. 9736, p. 190-201, 17 jul 2010.
- BERNAL, W.; DONALDSON, N.; WYNCOLL, D.; WENDON, JULIA. Blood lactate as an early predictor of outcome in paracetamol-induced acute liver failure: a cohort study. **Lancet**, v. 359, n. 9306, p. 558-63, 16 fev 2002.
- BERNAL, W.; HALL, C.; KARVELLAS, C. J. *et al.* Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. **Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1844-52, dez 2007.
- BERNUAU, J.; RUEFF, B.; BENHAMOU, J P. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. **Seminars in Liver Disease**, v. 6, n. 2, p. 97-106, 1986.
- BILLING, B. H.; LATHE, G. H. Bilirubin metabolism in jaundice. **Seminar on Liver Disease**, v. 24, n. 1, p. 111-121, 1958.
- BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Rev Suplemento Hepatotoxicidade**, v. 30, n. 1, p. 14-16, 2011.
- BJÖRNSSON, E.; OLSSON, R. Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 2, p. 481-9, ago 2005.
- BLAZKA, M. E.; ELWELL, M. R.; HOLLADAY, S. D.; WILSON, R. E.; LUSTER, M. I. Histopathology of Acetaminophen-Induced Liver Changes: Role of Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor alpha. **Toxicologic Pathology**, v. 24, n. 2, p. 181-189, 1 mar 1996.
- BOND, G. R.; NOVAK, J. E. The human and economic cost of paracetamol (acetaminophen) overdose. **Pharmacoeconomics**, v. 8, n. 3, p. 177-181, 1995.
- BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clinical infectious diseases** □: **an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31 Suppl 5, p. S202-10, out 2000.
- BOWER, W. A.; JOHNS, M.; MARGOLIS, H. S.; WILLIAMS, I. T.; BEL, B. P. Population-based surveillance for acute liver failure. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 102, n. 11, p. 2459-2463, 2007.
- BOYD, E. M.; BERECZKY, G. M. Liver necrosis from paracetamol. **British Journal of Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 606-14, mar 1966.
- BREITHERICK, A D.; CRAIG, D G N; MASTERTON, G. *et al.* Acute liver failure in Scotland between 1992 and 2009; incidence, aetiology and outcome. **Quarterly Journal Of Medicine**, v. 104, p. 945-56, nov 2011.

BROWN-STEINKE, K.; DERONDE, K.; YEMEN, S.; PALMER, L. A. Gender differences in S-nitrosoglutathione reductase activity in the lung. **Plos One**, v. 5, n. 11, p. e14007, jan 2010.

BULERA, S. J.; COHEN, S. D.; KHAIRALLAH, E. A. Acetaminophen-arylated proteins are detected in hepatic subcellular fractions and numerous extra-hepatic tissues in CD-1 and C57B1/6J mice. **Toxicology**, v. 109, n. 2-3, p. 85-99, 17 maio 1996.

CATERINA, R. DE; LIBBY, P.; PENG, H. B. *et al.* Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 1, p. 60-8, jul 1995.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13926-31, 15 out 2002.

CHIU, H.; GARDNER, C. R.; DAMBACH, D. M. *et al.* Role of tumor necrosis factor receptor 1 (p55) in hepatocyte proliferation during acetaminophen-induced toxicity in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 193, n. 2, p. 218-227, 2003.

CRAIG, DARREN G N; BATES, C. M.; DAVIDSON, J. S. *et al.* Overdose pattern and outcome in paracetamol-induced acute severe hepatotoxicity. **British journal of clinical pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 273-82, fev 2011.

CUMMINGS, A J.; KING, M. L.; MARTIN, B. K. A kinetic study of drug elimination: the excretion of paracetamol and its metabolites in man. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 29, n. 2, p. 150-7, fev 1967.

DAHLIN, D. C.; MIWA, G. T.; LU, A Y.; NELSON, S. D. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 5, p. 1327-31, mar 1984.

DARGAN, P. I.; JONES, A. L. Acetaminophen poisoning: an update for the intensivist. **Critical Care**, v. 6, n. 2, p. 108-10, abr 2002.

DAVERN, T. J.; JAMES, L. P.; HINSON, J. A; *et al.* Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 687-94, mar 2006.

DAVIDSON, D. G.; EASTHAM, W. N. Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. **British medical journal**, v. 2, n. 5512, p. 497-9, 27 ago 1966.

ELLIS, A. J.; SALEH, M.; SMITH, H. *et al.* Late-onset hepatic failure: clinical features, serology and outcome following transplantation. **Journal of Hepatology**, v. 23, p. 363-372, 1995.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 113-22, jul 1998.

FERENCI, P.; LOCKWOOD, A.; MULLEN, K. *et al.* Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 716-21, mar 2002.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E. *et al.* Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 33-42, 2004.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Analgésicos não-opioides. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. p. 228-235.

GARDNER, C R; HECK, D. E.; YANG, C. S. *et al.* Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. **Hepatology**, v. 27, n. 3, p. 748-54, mar 1998.

GASTON, B. M.; CARVER, J.; DOCTOR, A.; PALMER, L. A. S-nitrosylation signaling in cell biology. **Molecular interventions**, v. 3, n. 5, p. 253-263, ago 2003.

GERGEL, D.; MISÍK, V.; RIESZ, P.; CEDERBAUM, A I. Inhibition of rat and human cytochrome P450E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 337, n. 2, p. 239-50, 15 jan 1997.

GIMSON, A E. Fulminant and late onset hepatic failure. **British journal of anaesthesia**, v. 77, n. 1, p. 90-8, jul 1996.

GIMSON, A. E.; O'GRADY, J.; EDE, R. J.; PORTMANN, B; WILLIAMS, R. Late onset hepatic failure: clinical, serological and histological features. **Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 288-294, 1986.

GORDGE, M. P.; ADDIS, P.; NORONHA-DUTRA, A. A.; HOTHERSALL, J. S. Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione. **Biochemical pharmacology**, v. 55, n. 5, p. 657-65, 1 mar 1998.

GORDGE, M. P.; HOTHERSALL, J. S.; DUTRA, A. A. N. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. **British journal of pharmacology**, v. 124, n. 1, p. 141-8, maio 1998.

HART, T. W. Some observations concerning the s-nitroso and s-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 16, p. 2013-2016, 1985.

HENDERSON, C. J.; WOLF, C. R.; KITTERINGHAM, N. *et al.* Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, n. 23, p. 12741-5, 7 nov 2000.

HINSON, J. A.; ROBERTS, D. W.; JAMES, L. P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. **Handb. Exp. Pharmacol**, v. 196, n. 196, p. 369-405, 2010.

HINSON, J. A.; BUCCI, T. J.; IRWIN, L. K.; MICHAEL, S. L.; MAYEUX, P. R. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 6, n. 2, p. 160-7, mar 2002.

HÖGESTÄTT, E. D.; JÖNSSON, B. A G.; ERMUND, A. *et al.* Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31405-12, 9 set 2005.

ITO, Y.; ABRIL, E. R.; BETHEA, N. W.; MCCUSKEY, R. S. Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 286, n. 1, p. G60-G67, jan 2004.

ITO, Y.; MACHEN, N. W.; ABRIL, E. R.; MCCUSKEY, R. S. Effects of acetaminophen on hepatic microcirculation in mice. **Comparative hepatology**, v. 3 Suppl 1, n. S33, p. 1-3, 14 jan 2004.

JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 12, p. 1499-1506, jan 2003.

JAMES, L. P.; MCCULLOUGH, S. S.; LAMPS, L. W.; HINSON, J. A. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 75, n. 2, p. 458-67, out 2003.

JOLLOU, D. J.; MITCHELL, J. R.; POTTER, W. Z. *et al.* Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 195-202, 1973.

KANTER, M. Z. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. **American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, v. 63, n. 19, p. 1821-7, 1 out 2006.

KETTERER, B.; COLES, B.; MEYER, D. J. The Role of Glutathione in Detoxication by Glutathione. **Environmental Health**, v. 49, p. 59-69, 1983.

KHAN, M.; SAKAKIMA, H.; DHAMMU, T. S. *et al.* S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 78, jan 2011.

KHAN, M.; SEKHON, B.; GIRI, S. *et al.* S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, v. 25, n. 2, p. 177-92, fev 2005.

KHASHAB, M.; TECTOR, A J.; KWO, P. Y. Epidemiology of acute liver failure. **Current gastroenterology reports**, v. 9, n. 1, p. 66-73, mar 2007.

KIM, Y. M.; VERA, M. E. DE; WATKINS, S. C.; BILLIAR, T R. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1402-11, 10 jan 1997.

KONOREV, E. A.; JOSEPH, J.; PALMER, N. S-Nitrosoglutathione Improves Functional Recovery in the Isolated Rat Heart After Cardioplegic Ischemic Arrest-Evidence for a Cardioprotective Effect of Nitric Oxide¹ damage. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, n. 1, p. 200-206, 1995.

KORTSALIOUDAKI, C.; TAYLOR, R. M.; CHEESEMAN, P. *et al.* Safety and Efficacy of N-Acetylcysteine in Children With Non-Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. **Liver transplantation**, v. 44, p. 25-30, 2008.

KUO, Y.-R.; WANG, F.-S.; JENG, S.-F. *et al.* Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia / reperfusion injury. **Surgery**, v. 135, n. 4, p. 437-446, 2004.

LARSEN, F. S.; BJERRING, P. N. Acute liver failure. **Current opinion in critical care**, v. 17, n. 2, p. 160-4, abr 2011.

LEE, W. M.; SQUIRES, R. H.; NYBERG, S. L.; DOO, E.; HOOFNAGLE, J. H. Acute liver failure: Summary of a workshop. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1401-15, abr 2008.

LI, S.; WHORTON, A R. Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20102-10, 20 maio 2005.

LINDROS, K. O. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver. **General pharmacology**, v. 28, n. 2, p. 191-6, fev 1997.

LIU, J.; LI, C.; WAALKES, M. P. *et al.* The Nitric Oxide Donor, V-PYRRO/NO, Protects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. **Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 324-333, 2003.

LIU, L.; HAUSLADEN, A; ZENG, M. *et al.* A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 490-4, 22 mar 2001.

MAKIN, A. J.; WENDON, JULIA; WILLIAMS, ROGER. A 7-Year Experience of Severe Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity (1987-1993). **Gastroenterology**, v. 109, p. 1907-1916, 1995.

MARUDANAYAGAM, R.; SHANMUGAM, V.; GUNSON, B. *et al.* Aetiology and outcome of acute liver failure. **HPB**: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association, v. 11, n. 5, p. 429-34, ago 2009.

MCCLAIN, C. J.; KROMHOUT, J. P.; PETERSON, F. J.; HOLTZMAN, J. L. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by alcohol. **JAMA**: the journal of the American Medical Association, v. 244, n. 3, p. 251-3, 18 jul 1980.

MITCHELL, J. R.; JOLLOW, D. J.; POTTER, W. Z. *et al.* Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 185-194, 1973.

MORAKINYO, M. K. **S-Nitrosothiols: Formation, Decomposition, Reactivity and Possible Physiological Effects**. [S.l.]: Portland State University, 2010.

MUNOZ, S. J.; RAJENDER REDDY, K.; LEE, W. The coagulopathy of acute liver failure and implications for intracranial pressure monitoring. **Neurocritical care**, v. 9, n. 1, p. 103-7, jan 2008.

MUNOZ, S. J.; STRAVITZ, R. T.; GABRIEL, D. A. Coagulopathy of acute liver failure. **Clinics in liver disease**, v. 13, n. 1, p. 95-107, mar 2009.

MYERS, R. P.; LI, B.; FONG, A.; SHAHEEN, A. A. M.; QUAN, H. Hospitalizations for acetaminophen overdose: a Canadian population-based study from 1995 to 2004. **BMC public health**, v. 7, p. 143, jan 2007.

NEWSOME, P. N.; PLEVRIS, J. N.; NELSON, L. J.; HAYES, P. C. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. **Liver transplantation**: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society, v. 6, n. 1, p. 21-31, jan 2000.

NGUYEN, N. T. T.; VIERLING, J. M. Acute liver failure. **Current opinion in organ transplantation**, v. 16, n. 3, p. 289-96, jun 2011.

NOURJAH, P.; AHMAD, S. R.; KARWOSKI, C.; WILLY, M. Estimates of acetaminophen (Paracetamol)-associated overdoses in the United States. **Pharmacoepidemiol. Drug Safe.**, v. 15, n. 6, p. 398-405, 2006.

OLIVEIRA, C. P. M. S. DE; LIMA, V. M. R. DE; SIMPLICIO, FERNANDA I; *et al.* Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 299-305, abr 2008.

OSTAPOWICZ, G.; FONTANA, R. J.; SCHIØDT, F. V. *et al.* Results of a Prospective Study of Acute Liver Failure at 17 Tertiary Care Centers in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 137, n. 12, p. 947-955, 2002.

OTTANI, A.; LEONE, S.; SANDRINI, M.; FERRARI, A.; BERTOLINI, A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1, p. 280-281, 2006.

O'GRADY, J. G. Acute liver failure. **Postgraduate medical journal**, v. 81, n. 953, p. 148-54, mar 2005.

O'GRADY, J. G.; SCHALM, S. W.; WILLIAMS, R. Acute liver failure: redefining the syndromes. **Lancet**, v. 342, n. 8866, p. 273-5, 31 jul 1993.

POLSON, J.; LEE, W. M. AASLD position paper: the management of acute liver failure. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 1179-97, maio 2005.

POTTER, W. Z.; DAVIS, D. C.; MITCHELL, J. R. *et al.* Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 203-210, 1973.

PRESCOTT, L. F.; ROSCOE, P.; WRIGHT, N.; BROWN, S. S. Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdosage. **The Lancet**, v. 297, n. 7698, p. 519-522, 1971.

PRINCE, J. M.; VODOVOTZ, Y.; BAUN, M. J. *et al.* The nitric oxide donor S-nitrosoglutathione reduces apoptotic primary liver cell loss in a three-dimensional perfusion bioreactor culture model developed for liver support. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 3, p. 861-6, mar 2010.

QUINTANA, A. B.; LENZI, H. L.; ALMADA, L. L. *et al.* Effect of S-nitrosoglutathione (GSNO) added to the University of Wisconsin solution (UW): II) Functional response to cold preservation/reperfusion of rat liver. **Annals of hepatology □: official journal of the Mexican Association of Hepatology**, v. 1, n. 4, p. 183-91, 2002.

RAI, R. M.; LEE, F. Y. J.; ROSEN, A. *et al.* Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. **Medical Sciences**, v. 95, n. November, p. 13829-13834, 1998.

RAUHALA, P.; LIN, A.; CHIUEH, C. C. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 165-173, fev 1998.

RECORD, C. O.; ILES, R. A.; COHEN, R. D.; WILLIAMS, R. Acid-base and metabolic disturbances in fulminant hepatic failure. **Gut**, v. 16, n. 2, p. 144-9, fev 1975.

REID, A. B.; KURTEN, R. C.; MCCULLOUGH, S. S.; BROCK, R. W.; HINSON, J. A. Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity □: Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 509-516, 2005.

RICHARDSON, G.; BENJAMIN, N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. **Clinical Science**, v. 102, p. 99-105, 2002.

ROLANDO, N.; WADE, J.; DAVALOS, M. *et al.* The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 32, n. 4 Pt 1, p. 734-9, out 2000.

RUEFF, B.; BENHAMOU, J. P. Acute hepatic necrosis and fulminant hepatic failure. **Gut**, v. 14, p. 805-815, 1973.

SAIKI, H.; CHAN, E. T.; WONG, E. *et al.* Zonal distribution of cysteine uptake in the perfused rat liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 1, p. 192-6, 5 jan 1992.

SAITO, C.; ZWINGMANN, C.; JAESCHKE, H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and n-acetylcysteine. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 246-254, 2010.

SASS, D. A.; SHAKIL, A. O. Fulminant hepatic failure. **Liver transplantation**, v. 11, n. 6, p. 594-605, jun 2005.

SCHIODT, F. V.; ROCHLING, F. A.; CASEY, D. L.; LEE, W. M. Acetaminophen toxicity in an urban county hospital. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 16, p. 1112-1117, 19 fev 1997.

SHAH, A. D.; WOOD, D. M.; DARGAN, P. I. Understanding lactic acidosis in paracetamol (acetaminophen) poisoning. **British journal of clinical pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 20-8, jan 2011.

SHAH, V.; HADDAD, F. G.; GARCIA-CARDENA, G. *et al.* Liver Sinusoidal Endothelial Cells Are Responsible for Nitric Oxide Modulation of Resistance in the Hepatic Sinusoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2923-2930, 1997.

SHAWCROSS, D. L.; WENDON, JULIA A. The neurological manifestations of acute liver failure. **Neurochemistry international**, 2 nov 2011.

SHEEN, C. L.; DILLON, J. F.; BATEMAN, D. N. *et al.* Paracetamol toxicity: epidemiology, prevention and costs to the health-care system. **Quarterly Journal Of Medicine**, v. 95, p. 609-619, 2002.

SIMON, J. B. Acetaminophen liver injury. **Canadian family physician Médecin de famille canadien**, v. 31, p. 2155-8, nov 1985.

SIMPLICIO, FERNANDA IBANEZ. **Efeito dos s-nitrosotíóis no bloqueio da peroxidação lipídica**. [S.l.]: Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SINGH, R. J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18596-603, 2 ago 1996.

SOUZA, B. S. DE F.; NASCIMENTO, R. C.; OLIVEIRA, S. A. *et al.* Transplantation of bone marrow cells decreases tumor necrosis factor- α production and blood-brain barrier permeability and improves survival in a mouse model of acetaminophen-induced acute liver disease. **Cytotherapy**, v. 14, n. 8, p. 1011-1021, 2012.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J. *et al.* Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7674-7, 15 ago 1992.

STRAVITZ, R. T.; KRAMER, D. J. Management of acute liver failure. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 9, p. 542-53, set 2009.

SUN, X.; WASLEY, J. W. F.; QIU, J. *et al.* Discovery of S -Nitrosoglutathione Reductase Inhibitors: Potential Agents for the Treatment of Asthma and Other Inflammatory Diseases. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 5, p. 402-406, 12 maio 2011.

TAM, S. W.; SAHA, J. K.; GARVEY, D. S. *et al.* Nitrosothiol-based NO-donors inhibit the gastrointestinal mucosal damaging actions of NSAIDs. **Inflammopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 81-88, 2000.

TERNEUS, M. V.; BROWN, J. M.; CARPENTER, A. B.; VALENTOVIC, M. A. Comparison of S-Adenosyl-L-methionine (SAME) and N-Acetylcysteine (NAC) Protective Effects on Hepatic Damage when Administered After Acetaminophen Overdose. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 25-34, 2008.

THERUVATH, T. P.; ZHONG, Z.; CURRIN, R. T.; RAMSHESH, V. K.; LEMASTERS, J. J. Endothelial nitric oxide synthase protects transplanted mouse livers against storage/reperfusion injury: Role of vasodilatory and innate immunity pathways. **Transplantation proceedings**, v. 38, n. 10, p. 3351-7, dez 2006.

THUMBURU, K. K.; TANEJA, S.; VASISHTA, R. K.; DHIMAN, R. K. Neuropathology of acute liver failure. **Neurochemistry international**, 16 dez 2011.

TREWBY, P. N.; WARREN, R.; CROSBIE, W. A. *et al.* Incidence and pathophysiology of pulmonary edema in fulminant hepatic failure. **Gastroenterology**, v. 74, p. 859-865, 1978.

Tylenol Professional Product Information. McNeil Consumer Healthcare. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.tylenolprofessional.com/assets/TYL_PPI.pdf>. , 2010

VERCELINO, R.; CRESPO, I.; SOUZA, G. F. P. DE; *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 88, n. 4, p. 401-11, abr 2010.

WALLACE, C. I.; DARGAN, P. I.; JONES, A. L. Paracetamol overdose: an evidence based flowchart to guide management. **Emergency Medicine Journal**, v. 19, p. 202-205, 2002.

WATKINS, P. B.; KAPLOWITZ, NEIL; SLATTERY, J. T. *et al.* Aminotransferase Elevations in Healthy Adults Receiving 4 Grams of Acetaminophen Daily: A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 296, n. 1, p. 87-93, 2006.

WILLIAMS, ROGER. Changing clinical patterns in acute liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 4, p. 660-661, out 2003.

ZIMMERMAN, H. J.; MADDREY, W. C. Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 22, n. 3, p. 767-73, set 1995.