



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA**



**AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.): EFEITOS SOBRE A MODULAÇÃO DO  
SISTEMA GLUTATIONA, DO PERFIL DE GENES DO ESTRESSE DO RETÍCULO  
ENDOPLASMÁTICO E DO METABOLISMO DE FASE I EM RATAS  
INTOXICADAS COM PARACETAMOL**

**ANA MARIA FERNANDES VIANA**

**Ouro Preto – MG**

**2019**

**ANA MARIA FERNANDES VIANA**

**AÇAI (*EUTERPE OLERACEA* MART.): EFEITOS SOBRE A MODULAÇÃO DO SISTEMA GLUTATIONA, O PERFIL DE GENES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E DO METABOLISMO DE FASE I EM RATAS INTOXICADAS COM PARACETAMOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientadora: Maria Lucia Pedrosa

**Ouro Preto – MG**

**2019**

V614a

Viana, Ana Maria Fernandes.

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) [manuscrito]: efeitos sobre a modulação do sistema glutatona, do perfil de genes do estresse do retículo endoplasmático e do metabolismo de fase I em ratas intoxicadas com paracetamol / Ana Maria Fernandes Viana. - 2019.

xviii, 89f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lucia Pedrosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Açaí . 2. Acetaminofen. 3. Stress oxidativo. I. Pedrosa, Maria Lucia. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.36



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE DOUTORADO**

Aos 31 dias do mês de maio do ano de 2019, às 09:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda **Ana Maria Fernandes Viana**, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Maria Lucia Pedrosa (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhaes (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Denia Antunes Saude Guimaraes (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Elizabethe Adriana Esteves (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Izabel Regina dos Santos C Maldonado (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Açaí (Euterpe Oleraceamart.): Efeitos Sobre a Modulação do Sistema Glutaciona, do Perfil de Genes do Estresse do Retículo Endoplasmático e do Metabolismo de Fase I em Ratas Intoxicadas com Paracetamol", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 6 (seis) meses à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 31 de maio de 2019.

Profa. Dra. Maria Lucia Pedrosa

Presidente

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito  
Magalhaes

Profa. Dra. Denia Antunes Saude  
Guimaraes

Profa. Dra. Elizabethe Adriana  
Esteves

Profa. Dra. Izabel Regina dos  
Santos C Maldonado

Doutoranda

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica e Laboratório de Nutrição Experimental** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Ouro Preto com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

Dedico esta tese aos meus pais por sempre acreditarem em  
minhas escolhas e pelo apoio incondicional!

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Maria Lucia Pedrosa** por me receber em seu laboratório há 6 anos e acreditar que eu poderia ser uma pesquisadora. Foram anos de aprendizado, confiança, desafios e crescimento que moldaram a pessoa que sou hoje. Obrigada Lucinha!

A **Marcelo Eustáquio Silva** pela oportunidade de fazer parte da equipe LBM/LABNEX. Obrigada pelos questionamentos, orientação e incentivos constantes!

Agradeço imensamente a **equipe LBM/LABNEX** pelos ensinamentos e ajuda, principalmente durante os dois últimos anos do doutorado. Muitas mãos contribuíram para a elaboração dessa tese e sem o apoio dessa equipe, em especial **Alice Helena** e **Mayara Carvalho**, eu não teria conseguido!

A **Alice Helena, Jonathas Oliveira, Josilene Oliveira, Joyce Guerra, Juliana Lopes, Luiz Antônio, Mariana Albuquerque, Mayara Carvalho, Miliane Fagundes, Nara Nunes, Rafael Ribeiro, Renata Rebeca** e **Victor Lavorato** pelo incentivo, convivência diária e momentos de descontração que tornaram esses 4 anos mais leves!

Ao professor **Wanderson Geraldo de Lima** pela disposição em ajudar com as análises histológicas e pela motivação.

Ao professor **Geraldo Célio Brandão** pela colaboração com as análises cromatográficas e disponibilidade na interpretação dos resultados.

Ao **Jair Pastor Mota** e **Clodoaldo Pereira dos Santos** por todo auxílio no manejo dos animais e agradável convívio.

Aos **amigos** que a vida acadêmica me presenteou durante os anos que morei em Ouro Preto.

A **Nívia Carolina de Paiva** e **André Luis Barros** pelo apoio técnico na execução das análises histológicas.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas** do **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas** pela minha formação e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Enfim, agradeço aos meus professores da **Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri** por conduzirem meus primeiros passos na pesquisa, essa experiência foi essencial para que eu iniciasse a pós-graduação na **Universidade Federal de Ouro Preto** e presenciasse o ensino público transformar vidas.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais e maiores exemplos de vida, **Antônia** e **Gilberto**, que sempre me incentivaram a estudar, persistir e ser uma pessoa melhor. Não tenho palavras para expressar meu amor e admiração por vocês!

As minhas irmãs, **Yvana** e **Mirza**, por toda paciência, palavras de incentivo e carinho durante esse período. Vocês são as melhores pessoas que eu poderia ter ao lado!

As famílias **Santana Fernandes** e **Barros Viana** por todas as orações e torcida!

Aos meus amigos de ontem, hoje e sempre (**Bela, Gabi, Dudu, Vanessa, Sancha, Mari, Lunna** e **VCT**) por seguirem ao meu lado com todo afeto que as verdadeiras amizades podem permitir.

A **Amanda** por compartilhar as alegrias e angústias da pós-graduação e da vida ouro-pretana durante esses anos de convivência diária.

A **Anelise** por sempre ter os conselhos mais inusitados e a gargalhada mais marcante da Escola de Nutrição!

“Afinal, nem toda lágrima é dor  
Nem toda graça é sorriso  
Nem toda curva da vida  
Tem uma placa de aviso  
E nem sempre o que você perde  
É de fato um prejuízo

O meu ou o seu caminho  
Não são muito diferentes  
Tem espinho, pedra, buraco  
Pra mode atrasar a gente

Mas não desanime por nada  
Pois até uma topada  
Empurra você pra frente

Tantas vezes parece que é o fim  
Mas no fundo, é só um recomeço  
Afinal, pra poder se levantar  
É preciso sofrer algum tropeço”

*(Bráulio Bessa)*

## RESUMO

O paracetamol é um antipirético e analgésico que em doses terapêuticas é metabolizado por enzimas de fase I e II, originando conjugados de glicuronídeo e de sulfato, com reduzida formação de NAPQI que é detoxificado pela glutathione e excretado. Em overdose de paracetamol ocorre produção aumentada de NAPQI que é responsável por danos celulares. O açai (*Euterpe oleracea* Mart.), reconhecido pelas suas características fitoquímicas e pelos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, pode apresentar efeito hepatoprotetor para overdose com paracetamol. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do pré-tratamento com açai sobre fatores envolvidos nos danos hepáticos desencadeados pelo paracetamol. Ratas *Fischer* (40) foram distribuídas nos grupos: controle (C), açai (A), paracetamol (P), paracetamol + açai (PA) e paracetamol + acetilcisteína (PNac). Água, açai filtrado (3 g de açai filtrado/Kg) e acetilcisteína (140 mg de acetilcisteína/Kg) foram administrados por gavagem durante 7 dias. No sétimo dia de experimento os grupos P, PA e PNac receberam 835 mg de paracetamol/Kg e os demais receberam água filtrada. Após a intoxicação, as ratas foram submetidas ao jejum por 12 h e eutanasiadas. O grupo P apresentou, além da degeneração hidrópica, aumento de esteatose microvesicular, número de células inflamatórias e danos oxidativos no fígado. Além disso, foram observadas redução da concentração de glutathione total, menor expressão gênica de CYP1A2 e CYP2E1, e aumento da expressão gênica de GADD34 e CHOP, genes envolvidos no estresse do retículo endoplasmático. O pré-tratamento com açai modulou o sistema glutathione e recuperou a concentração de glutathione total, aumentou a expressão de genes CYP1A2 e CYP2E1 envolvidos no metabolismo de paracetamol e diminuiu a expressão de GADD34 e CHOP, com aumento da expressão de eIF2 $\alpha$  e ATF4, genes que favorecem a resposta antioxidante, reduzem a tradução de novas proteínas e inibem a apoptose. O perfil histológico do grupo PA foi semelhante ao grupo P exceto por apresentar diminuição do número de células, indicando redução das células inflamatórias no fígado. Esses resultados indicam que o açai atua sobre diferentes mecanismos, sugerindo seu potencial terapêutico para amenizar os danos provocados pelo paracetamol.

**Palavras-chave:** Açai, paracetamol, sistema glutathione, estresse do retículo endoplasmático, CHOP.

## ABSTRACT

Paracetamol is an antipyretic and analgesic that at therapeutic doses is metabolized by phase I and II enzymes, giving conjugates of glucuronide and sulfate, with reduced formation of NAPQI that is detoxified by glutathione and excreted. In paracetamol overdose, there is an increased production of NAPQI, which is responsible for cell damage. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), known for its phytochemical characteristics and its anti-inflammatory and antioxidant effects, may present a hepatoprotective effect for overdose with paracetamol. This study aimed to evaluate the effect of pre-treatment with açai on factors involved in liver damage promoted by paracetamol. *Fischer* female rats (40) were distributed in the groups: control (C), açai (A), paracetamol (P), paracetamol + açai (PA) and paracetamol + acetylcysteine (PNac). Water, filtered açai (3 g of filtered açai/Kg) and acetylcysteine (140 mg acetylcysteine/Kg) were given by gavage for 7 days. On the seventh day of the experiment, the P, PA, and PNac groups received 835 mg of paracetamol/Kg, and the others received filtered water. After intoxication, the rats were fasted for 12 hours and euthanized. P group showed, besides the hydropic degeneration, an increase of microvesicular steatosis, hydropic degeneration, number of cells, and oxidative damage in the liver. In addition, we observed the lower total glutathione concentration and decreased gene expression of CYP1A2 and CYP2E1, and increased gene expression of GADD34 and CHOP, genes involved in endoplasmic reticulum stress. Açai pre-treatment modulated the glutathione system and recovered the total glutathione concentration, increased the expression of CYP1A2 and CYP2E1 genes involved in paracetamol metabolism, and decreased expression of GADD34 and CHOP, with increased expression of eIF2 $\alpha$  and ATF4 genes which favor the antioxidant response, reduce the translation of new proteins and inhibit apoptosis. The histological profile of the PA group was similar to the P group except for a decrease in the number of cells, indicating a reduction of the inflammatory cells in the liver. These results indicate that açai acts on different mechanisms, suggesting its therapeutic potential to ameliorate the damages caused by paracetamol.

**Keywords:** Açai, paracetamol, glutathione system, endoplasmic reticulum stress, CHOP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática do metabolismo do paracetamol pelas reações de fase I e de fase II .....	5
<b>Figura 2</b> - Ativação metabólica do paracetamol .....	6
<b>Figura 3</b> - Vias do estresse do retículo endoplasmático ativadas pelas proteínas desenoveladas .....	8
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática das enzimas envolvidas na geração e inativação de espécies reativas de oxigênio .....	12
<b>Figura 5</b> - Inativação do NAPQI via N-acetilcisteína .....	14
<b>Figura 6</b> - Imagens da palmeira, cacho com os frutos imaturos, cacho com os frutos maduros e açai pós-colheita .....	17
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática do delineamento experimental .....	28
<b>Figura 8</b> - Análise da integridade do RNA total em gel de agarose 1,2 % de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	39
<b>Figura 9</b> - Espectro de massas da polpa de açai obtido por UPLC-DAD-ESI-MS .	44
<b>Figura 10</b> - Estruturas moleculares das antocianinas identificadas na polpa de açai	45
<b>Figura 11</b> - Fotomicrografias representativas e análise semiquantitativa da esteatose microvesicular em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	48
<b>Figura 12</b> - Fotomicrografias representativas e análise semiquantitativa da degeneração hidrópica em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	49
<b>Figura 13</b> - Fotomicrografias representativas e análise quantitativa da necrose em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	50
<b>Figura 14</b> - Fotomicrografias representativas e análise quantitativa de células/campo microscópico em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	51
<b>Figura 15</b> - Concentrações de TBARS e proteínas carboniladas em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	52

<b>Figura 16</b> - Atividade hepática da superóxido dismutase, catalase, atividade sérica da paraoxonase arilesterásica e conteúdo de sulfidrilas totais de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	54
<b>Figura 17</b> - Representação de concentração de glutathiona total, reduzida e oxidada em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	55
<b>Figura 18</b> - Representação da atividade e expressão gênica do sistema glutathiona em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	56
<b>Figura 19</b> - Expressão relativa de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo do paracetamol em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	57
<b>Figura 20</b> - Expressão relativa de mRNA dos genes da via da PERK em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	59
<b>Figura 21</b> - Resumo dos principais efeitos do pré-tratamento com açai no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Gradiente de eluição empregado nas análises da polpa de açaí por UPLC-DAD-ESI-MS .....	27
<b>Tabela 2</b> - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de qRT-PCR .....	40
<b>Tabela 3</b> - Composição centesimal, conteúdo de polifenóis, antocianinas, flavonoides e capacidade antioxidante do açaí filtrado .....	43
<b>Tabela 4</b> - Antocianinas identificados na polpa de açaí obtidas por UPLC-DAD-ESI-MS .....	44
<b>Tabela 5</b> - Variáveis biométricas e metabólitos séricos em ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	46
<b>Tabela 6</b> - Atividade sérica da AST, ALT e relação AST/ALT em ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	do inglês, <i>ATP-binding cassette (A-G)</i>
<b>ACN</b>	acetonitrila
<b>ALT</b>	alanina aminotransferase
<b>ASK</b>	do inglês, <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
<b>AST</b>	aspartato aminotransferase
<b>ATF</b>	do inglês, <i>activating transcription factor</i>
<b>Bcl-2</b>	do inglês, <i>B cell lymphoma protein 2</i>
<b>BiP</b>	do inglês, <i>immunoglobulin heavy chain binding</i> (também conhecida como GRP78, <i>glucose-regulated protein 78</i> )
<b>CAT</b>	catalase
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
<b>CHOP</b>	do inglês, <i>CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein</i>
<b>CYP</b>	citocromo P450
<b>DILI</b>	do inglês, <i>drug-induced liver injury</i>
<b>DNPH</b>	2,4-dinitrofenil-hidrazina
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DTNB</b>	ácido 5,5´ditio-bis-[2-nitrobenzóico]
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	do inglês, <i>alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2</i>
<b>ERAD</b>	do inglês, <i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
<b>ERO</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>GADD34</b>	do inglês, <i>growth arrest and DNA damage 34</i>
<b>GAE</b>	equivalentes de ácido gálico
<b>GPx</b>	glutationa peroxidase
<b>GR</b>	glutationa redutase
<b>GSH</b>	glutationa reduzida
<b>GSSG</b>	glutationa oxidada
<b>GST</b>	glutationa S-transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>IRE1</b>	do inglês, <i>inositol requiring 1<math>\alpha</math></i>
<b>JNK</b>	quinase c-Jun N terminal
<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	relação massa/carga no modo positivo



<b>[M-M]<sup>-</sup></b>	relação massa/carga no modo negativo
<b>MS/MS</b>	massa segunda
<b>MTT</b>	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>NAFLD</b>	do inglês, <i>nonalcoholic fatty liver disease</i>
<b>NAPQI</b>	N-acetil-p-benzoquinona imina
<b>NFκB</b>	fator nuclear kappa B
<b>Nrf2</b>	fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	radical hidroxila
<b>PERK</b>	do inglês, <i>double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase</i>
<b>PON</b>	paraoxonase
<b>PP1</b>	proteína fosfatase 1
<b>S1P</b>	proteases de sítio 1
<b>S2P</b>	proteases de sítio 2
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>SULT</b>	sulfotransferase
<b>TBARS</b>	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<b>TEAC</b>	capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
<b>TNF</b>	fator de necrose tumoral
<b>TR</b>	tempo de retenção
<b>TRAF2</b>	do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 2</i>
<b>Trolox</b>	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
<b>UGT</b>	uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferase
<b>UPLC</b>	do inglês, <i>ultra performance liquid chromatography</i>
<b>UPR</b>	do inglês, <i>unfolded protein response</i>
<b>XBP1</b>	do inglês <i>X-box binding protein 1</i>
<b>γGCS</b>	gama glutamilmisteína sintetase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2. 1 Paracetamol: aspectos gerais e metabolismo .....	3
2. 2 Paracetamol e estresse do retículo endoplasmático .....	7
2. 3 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes no metabolismo do paracetamol .....	11
2. 4 Tratamento da hepatotoxicidade via paracetamol .....	13
2. 5 Açaí e suas propriedades funcionais .....	16
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	22
4. 1 Objetivo geral .....	22
4. 2 Objetivos específicos .....	22
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
5. 1 Aquisição e preparo da polpa de açaí .....	23
5. 2 Caracterização <i>in vitro</i> do açaí filtrado .....	23
5. 2. 1 Composição centesimal .....	23
5. 2. 2 Capacidade antioxidante .....	24
5. 2. 3 Conteúdo de flavonoides totais .....	24
5. 2. 4 Conteúdo de polifenóis totais .....	25
5. 2. 5 Quantificação das antocianinas monoméricas totais .....	25
5. 2. 6 Identificação de antocianinas na polpa de açaí por UPLC-DAD-ESI-MS .....	26
5. 3 Animais .....	27
5. 4 Delineamento experimental .....	27
5. 5 Dosagens bioquímicas séricas .....	29
5. 6 Análises histológicas do fígado .....	29
5. 7 Marcadores do estresse oxidativo hepático .....	30
5. 7. 1 Peroxidação lipídica .....	30
5. 7. 2 Carbonilação proteica .....	30
5. 7. 3 Determinação de proteínas totais .....	32
5. 8 Atividade de enzimas antioxidantes .....	33
5. 8. 1 Atividade sérica da enzima paraoxonase .....	33
5. 8. 2 Conteúdo sérico de sulfidrilas totais .....	34
5. 8. 3 Atividade da superóxido dismutase .....	34
5. 8. 4 Atividade da catalase .....	35
5. 9 Sistema glutationa .....	35
5. 9. 1 Concentração de glutationa total, oxidada e reduzida .....	35
5. 9. 2 Atividade de glutationa peroxidase .....	36
5. 9. 3 Atividade de glutationa redutase .....	37
5. 9. 4 Atividade de glutationa S-transferase .....	38
5. 10 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real .....	39
5. 10. 1 Extração de RNA .....	39
5. 10. 2 Síntese de cDNA .....	39
5. 10. 3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores .....	40
5. 10. 4 RT-PCR quantitativa em tempo real .....	41
5. 10. 5 Cálculo da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores .....	42
5. 11 Análise estatística .....	42

<b>6 RESULTADOS</b> .....	43
6. 1 Composição centesimal, concentração de polifenóis, capacidade antioxidante e antocianinas identificadas na polpa de açaí filtrada .....	43
6. 2 Parâmetros biométricos e metabólitos séricos indicadores da função hepática ..	45
6. 3 Atividade das aminotransaminases .....	46
6. 4 Análise histológica do fígado .....	47
6. 5 Marcadores de dano oxidativo hepático: peroxidação lipídica e carbonilação proteica .....	52
6. 6 Comportamento das enzimas antioxidantes hepáticas e séricas .....	53
6. 7 Sistema glutathiona .....	54
6. 8 Expressão de genes envolvidos no metabolismo do paracetamol .....	57
6. 9 Expressão de genes relacionados à resposta ao estresse do retículo endoplasmático .....	57
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71
<b>ANEXO</b> - Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais .....	89

## 1 INTRODUÇÃO

O paracetamol é um fármaco de efeito antipirético e analgésico utilizado em todo mundo e o seu uso foi difundido a partir da década de 1950. Por ser de livre comercialização e estar presente também associado a outros medicamentos, o paracetamol pode ser facilmente consumido em doses superiores à recomendação (SEBBEN et al., 2010; SHARMA; MEHTA, 2013).

O metabolismo do paracetamol acontece no fígado por mecanismos de fase I e II. Quando administrado em doses terapêuticas (até 4 g/dia para adultos e entre 50 e 75 mg/Kg/dia para crianças), cerca de 85 % do paracetamol é metabolizado pelas enzimas de fase II, a uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferase (UGT) e a sulfotransferase (SULT), e excretado via bile e urina. Nesta condição, aproximadamente 5 % é metabolizado via citocromo P450, produzindo N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) que se conjuga com a glutathione, sendo neutralizado e excretado. No entanto, em overdose de paracetamol a capacidade de metabolização pelas enzimas de fase II é ultrapassada, gerando uma quantidade de NAPQI superior à capacidade detoxificante do sistema glutathione. Sem glutathione suficiente para formação de adutos e, conseqüentemente, eliminação, o NAPQI reagirá com as proteínas celulares, provocando disfunção mitocondrial (LARSON, 2007; MAZALEUSKAYA et al., 2015).

Além da disfunção mitocondrial, a ligação do NAPQI com as proteínas e demais estruturas celulares pode desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), comprometendo o equilíbrio e integridade celular, o que ocasionará necrose tecidual (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016). O excesso de paracetamol também está relacionado com a indução do estresse do retículo endoplasmático e conseqüentemente com as vias de resposta a proteínas desenoveladas (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*) (NAGY et al., 2007; FLAMMENT et al., 2012). Entre os diversos mecanismos desencadeados pelas vias da UPR, a *up-regulation* da transcrição da *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) desempenha papel importante na morte celular. A ativação de CHOP está relacionada com a injúria hepática induzida por paracetamol, uma vez que promove a continuidade do estresse do retículo e induz a apoptose. UZI et al. (2013) demonstraram que a intoxicação com paracetamol ativa uma das vias de UPR, reiterando que a inibição da CHOP está relacionada com a minimização dos danos hepáticos.

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto nativo da região amazônica cujo perfil fitoquímico despertou interesse científico sobre os seus possíveis efeitos antioxidantes. Em sua composição, o açaí apresenta antocianinas, proantocianidinas e outros flavonoides com ação

antioxidante já reconhecida, o que contribuiu para relacionar o fruto como um alimento capaz de promover benefícios à saúde (SCHAUSS et al., 2006b; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008). Além das características antioxidantes dos seus constituinte, os estudos conduzidos em modelos experimentais apontaram efeito hipocolesterolemizante, antiaterogênico, anti-inflamatório e antioxidante do açaí (SOUZA et al., 2011).

Embora ainda não existam estudos associando o açaí com a overdose de paracetamol, os relatos da ação antioxidante e anti-inflamatória do fruto sugerem que a sua utilização possa ser capaz de atenuar os danos causados pelo paracetamol no fígado. Assim, nesse trabalho nós avaliamos o possível efeito hepatoprotetor do açaí com ênfase no balanço oxidante/antioxidante, no sistema glutaciona e no estresse do retículo endoplasmático.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1 Paracetamol: aspectos gerais e metabolismo

O fígado, por ser o principal órgão atuante no metabolismo dos nutrientes, drogas e bebidas alcoólicas, torna-se muito susceptível à ocorrência de danos (NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; GU; MANAUTOU, 2012). As lesões hepáticas induzidas por drogas (DILI, do inglês *Drug-Induced Liver Injury*) representam grande relevância para a saúde pública ocidental; estas lesões podem ser estimuladas tanto pela droga como pelos metabólitos produzidos a partir dessa droga, ou mesmo pela hipersensibilidade ao composto gerado. Diversas classes de medicamentos podem provocar DILI, dentre eles agentes imunossupressores, drogas quimioterápicas antitumorais, terapias hipoglicêmicas, drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e analgésicos antipiréticos (STINE; CHALASANI, 2015; WADDINGTON et al., 2017; YE et al., 2018).

Os sintomas clínicos desse tipo de lesão hepática são inespecíficos e dificilmente diferenciados de outros tipos de disfunções, manifestando-se como colestase, esteatose hepática, necrose hepatocelular, aumento das enzimas hepáticas, hepatite e cirrose (HASSAN; FONTANA, 2018). Embora se saiba que as doenças induzidas por drogas têm um importante impacto dentre os agravos que ocorrem no fígado, tem-se poucas informações sobre a real prevalência devido à dificuldade do diagnóstico, subnotificação dos casos e interrupção da queixa após a suspensão do uso do medicamento (AITHAL; DAY, 1999; LARREY, 2002).

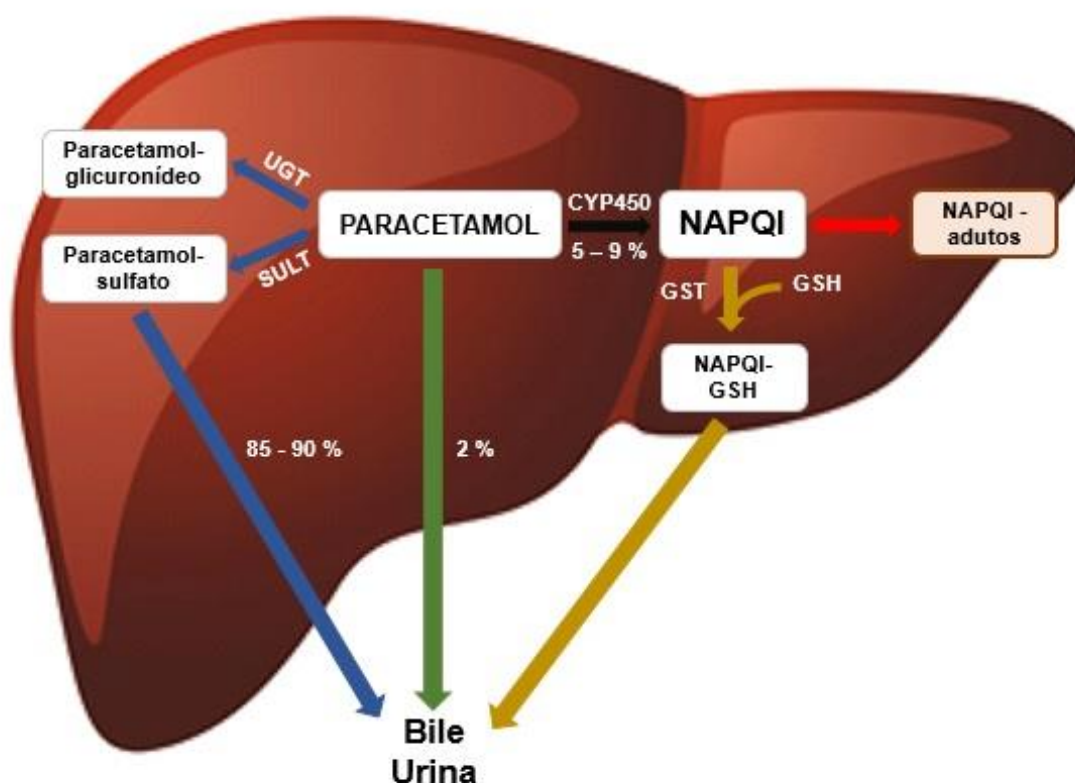
O paracetamol (também denominado acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol) é o fármaco mais comumente relacionado às DILI intrínsecas, sendo sua hepatotoxicidade dependente da dose empregada (LEISE; POTERUCHA; TALWALKAR, 2014). O seu uso foi primeiramente descrito em 1883 e desde então o paracetamol é utilizado em todo o mundo devido aos seus efeitos analgésicos e antipiréticos (SHARMA; MEHTA, 2013). Em 1966 foi relatado o primeiro caso de hepatotoxicidade pelo uso do paracetamol, porém somente 48 anos depois o *Food and Drug Administration* passou a recomendar que dosagens acima de 325 mg de paracetamol/comprimido não fossem utilizadas quando associado a outros fármacos (DAVIDSON; EASTHAM, 1966; TOSKA et al., 2014).

A ingestão de doses terapêuticas (até 4 g/dia para adultos e 50 a 75 mg/Kg/dia para crianças) não promovem efeitos adversos, no entanto doses entre 10 e 15 g de paracetamol são consideradas de risco, sendo o fígado e rins os órgãos mais lesados (MCJUNKIN et al., 1976; LARSON, 2007; HODGMAN; GARRARD, 2012). Entretanto na década de 1990,

WHITCOMB; BLOCK (1994) e SLATTERY; NELSON; THUMMEL (1996) descreveram que a administração do paracetamol mesmo em doses terapêuticas foi responsável por certo grau de toxicidade quando associado ao jejum ou consumo de álcool.

O Brasil não possui controle sobre a venda do paracetamol, tornando difícil a identificação dos casos de hepatotoxicidade, uma vez que esse fármaco é o terceiro mais consumido por indivíduos que se automedicam (SEBBEN et al., 2010). A ingestão excessiva de paracetamol, seja ela intencional ou não, promoveram danos no fígado, desde lesão hepática grave, podendo evoluir para insuficiência hepática e, em casos mais graves, a necessidade de transplante do órgão e até ao óbito (MICHNA et al., 2010; CLARK et al., 2012; BLIEDEN et al., 2014).

O fígado atua no metabolismo de drogas e xenobióticos por meio de dois mecanismos denominados reações de fase I e de fase II (GRANT, 1991). Após a administração do paracetamol em doses terapêuticas, a maior parte do fármaco (~85 %) é diretamente conjugada pelas enzimas da fase II, uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferase (UGT) e sulfotransferase (SULT), gerando conjugados de glicuronídeo e de sulfato (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; MAZALEUSKAYA et al., 2015). Aproximadamente 55 % do paracetamol é excretado como glicuronídeo, 30 % como sulfato e 4 % são excretados como produtos de metabolismo oxidativo, assim esses conjugados inativos não-tóxicos são excretados pela bile e pela urina (PRESCOTT, 1980) (FIGURA 1). A excreção dos conjugados como glicuronídeo e sulfato via bile envolve os transportadores ABCC2 e ABCG2, no entanto quando o transporte desses metabólitos ocorre pelo sangue é dependente dos transportadores ABCC3 e ABCC4 (BARNES et al., 2007; MCGILL; JAESCHKE, 2013).



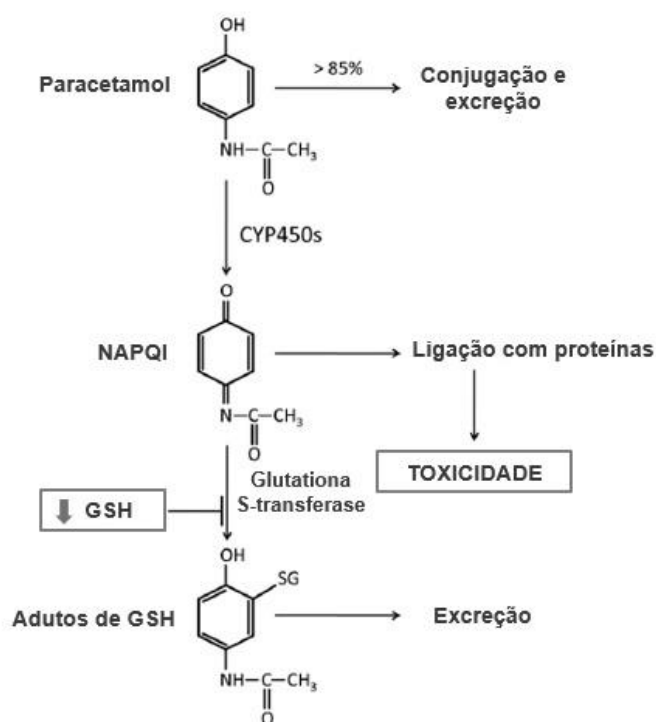
**Figura 1** - Representação esquemática do metabolismo do paracetamol pelas reações de fase I e de fase II (adaptada de YAN et al. (2018)). UGT: uridina 5'-difosfato-glucuronosiltransferase; SULT: sulfotransferase; CYP450: citocromo P450; NAPQI: N-acetil-p-benzoquinona imina; GST: glutationa S-transferase; GSH: glutationa reduzida.

Uma pequena parte do paracetamol que não é metabolizado via conjugação é metabolizado através do citocromo P450 (CYP), majoritariamente pelas isoformas CYP1A2 e CYP2E1, gerando o N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). Esse intermediário eletrofílico é um metabólito altamente reativo e tóxico que após a conjugação com o grupo sulfidrila da glutaciona forma adutos de glutaciona, é neutralizado e excretado pela urina como conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico (BESSEMS; VERMEULEN, 2001; LARSON, 2007). A formação dos adutos da glutaciona com o NAPQI pode ocorrer espontaneamente ou por meio da catálise via enzima glutaciona S-transferase (COLES et al., 1988) (FIGURA 2). Essa é uma enzima de fase II que também atua sobre o metabolismo de fármacos e é liberada pelos hepatócitos após a overdose de paracetamol, permanecendo com sua atividade elevada após 12 h da indução da hepatotoxicidade. A ação da glutaciona S-transferase é rápida, ao contrário das aminotransferases, cuja liberação ocorre mais lentamente (BECKETT et al., 1985).

Doses elevadas de paracetamol promovem a saturação das vias de sulfatação e glucoronidação, enquanto a quantidade de paracetamol excretado sem alteração é de



aproximadamente 10 %. Assim, o metabolismo do paracetamol pelo citocromo P450 se torna a principal via de metabolismo do fármaco, em que a oxidação do NAPQI é superior a 15 %. Concomitantemente à produção excessiva de NAPQI ocorre saturação da capacidade detoxificante via glutatona, promovendo a depleção dos estoques desse peptídeo no fígado e aumento da concentração de NAPQI que reage com alvos alternativos, como proteínas celulares (MITCHELL et al., 1973a; MAZALEUSKAYA et al., 2015) (FIGURA 2).



**Figura 2** - Ativação metabólica do paracetamol (adaptado de JAESCHKE et al. (2011))

JAESCHKE; KNIGHT; BAJT (2003) observaram que essa associação do NAPQI provoca modificações covalentes nas proteínas celulares, especialmente se ligando às proteínas mitocondriais. Essa associação desencadeia disfunção mitocondrial e perturbação da respiração normal dessa organela devido a interferência do NAPQI na funcionalidade da cadeia transportadora de elétrons. A ligação entre NAPQI e grupos sulfidrilas das proteínas celulares, especialmente as proteínas mitocondriais, acarreta o estresse oxidativo mitocondrial com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e necrose dos hepatócitos (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016; YAN et al., 2018). Nesse contexto, MITCHELL et al. (1973b) e JOLLOW et al. (1974) observaram que intervenções terapêuticas que impossibilitem essa ligação entre o NAPQI e demais moléculas ou reduzam a formação de NAPQI são efetivas na prevenção da morte celular.

A administração de altas doses de paracetamol levará a um grave processo inflamatório juntamente com a lesão hepática, caracterizando-se pelo intenso influxo celular e aumento da produção/liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, células inflamatórias, ERO e espécies reativas de nitrogênio), contribuindo para o aumento do dano hepático (MICHAEL et al., 2001; MARTIN-MURPHY; HOLT; JU, 2010; KIM et al., 2013).

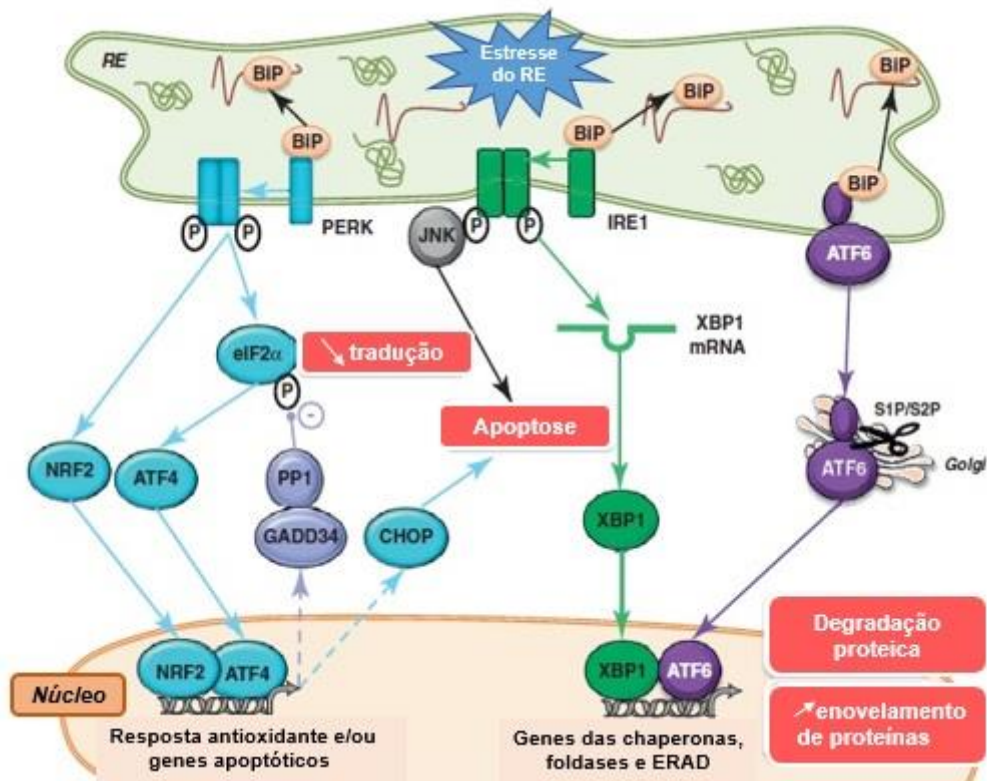
## 2. 2 Paracetamol e estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático é uma organela multifuncional que atua sobre a síntese de lipídios e esteróis, na manutenção do cálcio intracelular e é responsável por garantir a estrutura correta das proteínas (FAGONE; JACKOWSKI, 2009). O estresse do retículo endoplasmático é definido como o desequilíbrio entre o adequado enovelamento de proteínas e a capacidade do retículo endoplasmático atender essa demanda, culminando no acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo (WANG; KAUFMAN, 2014). O fígado é um órgão especialmente sensível ao estresse do retículo endoplasmático, uma vez que há grande quantidade de células encarregadas pela síntese de proteínas de membranas e secretoras (DARA; JI; KAPLOWITZ, 2011) e tem-se associado o estresse do retículo endoplasmático às altas doses de paracetamol (NAGY et al., 2007).

Para responder ao estresse do retículo, são estimuladas vias de sinalização, coletivamente denominadas de vias de resposta a proteínas desenoveladas (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*), as quais buscam restaurar as funções do retículo endoplasmático, estimulando a síntese de chaperonas envolvidas no dobramento das proteínas ou eliminando as proteínas mal formadas através da ubiquitinação e degradação mediada pelo proteassoma. Quando estas ações não são eficazes em reestabelecer a homeostase do retículo endoplasmático, é desencadeada a via de morte celular programada (HUSSAIN; RAMAIAH, 2007; FLAMMENT et al., 2012; ZHANG; WANG, 2012).

A resposta ao estresse do retículo é caracterizada pela ativação de três diferentes vias de sinalização: *inositol requiring 1 $\alpha$*  (IRE1), *double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) e *activating transcription factor 6* (ATF6) (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005). Normalmente há ligação da *immunoglobulin heavy chain binding* (BiP, também conhecida como GRP78, *glucose-regulated protein 78*) às três proteínas transmembranares mencionadas, mantendo-as em um estado inativo. Entretanto, mediante o acúmulo de proteínas desenoveladas, a ligação inibitória da BiP é desfeita e as vias IRE1 e PERK são ativadas por fosforilação, enquanto a via da ATF6 é ativada por processamento

proteolítico. Mesmo com esses mecanismos, se a capacidade do retículo endoplasmático não for restaurada ocorrerá ativação da caspase, extravasamento de cálcio do retículo endoplasmático e dano mitocondrial, culminando na morte celular (SZEGEZDI et al., 2006; KIM; XU; REED, 2008; FLAMMENT et al., 2012) (FIGURA 3).



**Figura 3** – Vias do estresse do retículo endoplasmático ativadas pelas proteínas desenoveladas (adaptado de FLAMMENT et al. (2012)). As vias desencadeadas pela PERK (a), IRE1 (b) e ATF6 (c) estão detalhadas no texto. RE: retículo endoplasmático; BiP: *immunoglobulin heavy chain binding*; PERK: *double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*; JNK: quinase c-Jun N terminal; IRE1: *inositol requiring 1α*; ATF6: *activating transcription factor 6*; eIF2α: *alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2*; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; PP1: proteína fosfatase 1; GADD34: *growth arrest and DNA damage 34*; CHOP: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*; XBP1: *X-box binding protein 1*; S1P/S2P: proteases do sítio 1/proteases do sítio 2.

As três vias da UPR serão sucintamente descritas a seguir. a) A PERK é uma proteína quinase presente no lúmen do retículo endoplasmático, em resposta ao estresse ela se dissocia da BiP e sofre autofosforilação dos seus domínios, enquanto a BiP atuará sobre as proteínas desenoveladas (BERTOLOTTI et al., 2000). A fosforilação da PERK induz também a fosforilação da *alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2* (eIF2α) no resíduo de serina 51, promovendo rápida diminuição da tradução de mRNA e da síntese de novas proteínas (HARDING; ZHANG; RON, 1999), estimulando ainda a expansão do retículo endoplasmático,

afim de possibilitar o dobramento das proteínas acumuladas e atenuar o estresse promovido pela carga de proteínas desenoveladas (MANDL et al., 2013) (FIGURA 3).

A fosforilação da eIF2 $\alpha$  promove uma indução seletiva do *activating transcription factor 4* (ATF4), ao qual poderá atuar na regulação da transcrição de genes relacionados com a resposta antioxidante, na síntese de transportadores de aminoácidos, na indução da transcrição da *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) e no controle da retroalimentação da sinalização da PERK (FLAMMENT et al., 2012). Nesta última atividade, a ação do ATF4 ocorre por meio da transcrição do *growth arrest and DNA damage 34* (GADD34), com alvo na proteína fosfatase 1 (PP1) para desfosforilação da eIF2 $\alpha$  e consequente inativação do ATF4. Uma vez que o ATF4 é translocado para o núcleo, poderá também induzir a transcrição da CHOP, um fator pro-apoptótico (HARDING; ZHANG; RON, 1999; SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005). Além da eIF2 $\alpha$ , a PERK promove fosforilação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), cuja ação desse fator de transcrição está relacionada à resposta antioxidante (CULLINAN; DIEHL, 2004) (FIGURA 3).

A CHOP é uma das principais moléculas responsáveis pela apoptose. Quando ativada, essa proteína transloca-se para o núcleo da célula e inibe a transcrição de genes antiapoptóticos, ativando, em contrapartida, a transcrição de genes pró-apoptóticos (MCCULLOUGH et al., 2001; PUTHALAKATH et al., 2007). A transcrição da CHOP não é regulada restritamente pelas vias da UPR, porém já é bem estabelecido que a CHOP atua como um fator que promove o dano hepático como resposta ao estresse (UZI et al., 2013). Dentre os fatores pró-apoptóticos, a CHOP é o fator de transcrição de especial interesse no quadro de estresse do retículo, sua transcrição pode ser ativada pela via ATF6, porém a maior relevância ocorre pelo estímulo do ATF4, na via da PERK (HUSSAIN; RAMAIAH, 2007; FLAMMENT et al., 2012). A CHOP atua em oposição à redução da síntese proteica em decorrência da aumentada expressão de GADD34, pois quando expressa, a CHOP incita a retomada da transcrição de proteínas, elevando a carga de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático. Como o estresse não foi minimizado, a sobrecarga de proteínas desenoveladas acarreta a geração de ERO (MARCINIAK et al., 2004; MALHOTRA et al., 2008; BACK et al., 2009).

Também atuante na cascata de reações provenientes do estresse do retículo endoplasmático, b) a IRE1 sofre fosforilação e dimerização após a interrupção da sua ligação com a BiP, dessa forma há estímulo da sua atividade de endoribonuclease (MALHI; KAUFMAN, 2011). Quando fosforilada, a IRE1 é ativada resultando na clivagem do mRNA de *X-box binding protein 1* (XBP1), promovendo a formação do fator de transcrição XBP1, cuja indução acarretará na regulação da transcrição de genes que expressam chaperonas e no

aumento da capacidade da *endoplasmic reticulum-associated degradation* (ERAD). Desse modo, ocorre a translocação das proteínas desenoveladas do retículo endoplasmático para o citoplasma, a fim de degradá-las via proteassoma (YOSHIDA et al., 2003; VEMBAR; BRODSKY, 2008). Ademais, outra ação promovida pela fosforilação da IRE1 consiste no recrutamento de *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2) e *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), e consequente ativação da quinase c-Jun N terminal (JNK), contribuindo assim para a instalação de um estado inflamatório por meio da JNK e fator nuclear kappa B (NFκB) com possível evolução para disfunção mitocondrial (NISHITOH et al., 1998; URANO et al., 2000). A expressão do mRNA da XBP1 sofre interferência da via da ATF6, pois essa via fornece substratos adicionais para que a XBP1 sofra heterodimerização e estimule a transcrição de ERAD (YOSHIDA et al., 2003).

Diferentemente da PERK e IRE1, c) o desligamento da BiP proporcionará a translocação da ATF6 para o complexo de Golgi, onde a ativação dessa via ocorrerá por meio de proteases de sítio 1 (S1P) e do sítio 2 (S2P). Essas proteases atuam clivando os domínios C (S1P) e N-terminal (S2P) assim, somente a porção N-terminal da ATF6 é liberada para o citosol e migra até o núcleo a fim de ativar a expressão gênica de chaperonas e ERAD (YE et al., 2000; SHEN et al., 2002; ASADA et al., 2011) (FIGURA 3).

A ativação desses três sensores da UPR busca reduzir o estresse do retículo, porém, concomitantemente, há a ativação de alguns mediadores de apoptose, da homeostase de cálcio e do estado redox. O recrutamento da TRAF2 é mediado pela IRE1α, com posterior ativação da ASK1 e JNK. Essa cascata possui um caráter pro-apoptótico, pois quando a JNK é fosforilada há inativação das proteínas antiapoptóticas *B cell lymphoma protein 2* (Bcl-2) e estímulo das proteínas pro-apoptóticas Bim (YAMAMOTO; ICHIJO; KORSMEYER, 1999; LEI; DAVIS, 2003). Nessa perspectiva de apoptose, a via da PERK exerce uma atividade singular quando a eIF2α é fosforilada, pois a redução da síntese de novas proteínas é um fator que contribui para minimizar a apoptose, protegendo contra o estresse do retículo endoplasmático (MALHI; KAUFMAN, 2011).

Diante do estresse do retículo endoplasmático, há aumento constante da liberação de cálcio pelo retículo, promovendo aumento da concentração de cálcio mitocondrial, o que altera a permeabilidade dessa organela e estimula a liberação de promotores de apoptose pelas mitocôndrias para o citosol (DENIAUD et al., 2008). As caspases são ativadas mediante a permeabilidade mitocondrial de células hepáticas, levando a apoptose mediada pelas Bax e Bak. Essas proteínas pró-apoptóticas monitoram a concentração de cálcio presente no retículo endoplasmático, de forma que também são sensibilizadas por estímulos apoptótico, como o

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (OAKES et al., 2003; PINTON; RIZZUTO, 2006). Em contrapartida, a Bcl-2 atua reduzindo o cálcio presente no lúmen do retículo, reduzindo o estímulo a morte celular. Assim, o comprometimento da homeostase do cálcio favorece a apoptose (FOYOUZI-YOUSSEFI et al., 2000; GREEN; KROEMER, 2004).

Considerando todos esses fatores, é possível relacionar o estresse do retículo endoplasmático com uma sequência de respostas inflamatórias. A UPR estimula a ativação de  $NF\kappa B$ , JNK, ERO, interleucina-6 e fator de necrose tumoral (TNF) como consequência do desbalanço redox que acontece no lúmen reticular. A fosforilação da IRE1 desencadeia uma cascata inflamatória via JNK e  $NF\kappa B$ , com ativação de macrófagos e produção de TNF e interleucina-6 (URANO et al., 2000; WU et al., 2004; HU et al., 2006).

Estudos evidenciaram que a intoxicação com paracetamol induz o estresse do retículo endoplasmático em modelo experimental com rato e camundongo. EL-BAKRY; EL-SHERIF; ROSTOM (2017) demonstraram que a administração de paracetamol (2 g/Kg de massa corporal) durante sete dias promoveu alterações bioquímicas e histopatológicas características da overdose de paracetamol em ratos, assim como observaram presença de apoptose dependente da caspase-3, marcador desencadeado pelas proteínas desenoveladas.

Outro estudo demonstrou que as três vias da UPR foram ativadas após a administração oral de paracetamol, evidenciando que a cascata de sinalização PERK-eIF2-CHOP está diretamente envolvida nos danos induzidos pelo paracetamol (UZI et al., 2013). Nesse estudo, os autores associaram que o estresse oxidativo é um dos responsáveis pela indução da UPR, pois ambos mecanismos são mutuamente regulados, convergindo para uma resposta integrada ao estresse. Dessa maneira, foi relatado que a CHOP inibiu vias protetoras de camundongos, impulsionando o estresse oxidativo, logo sua inibição é uma alternativa para tratamento de pacientes com dano hepático proveniente de overdose de paracetamol.

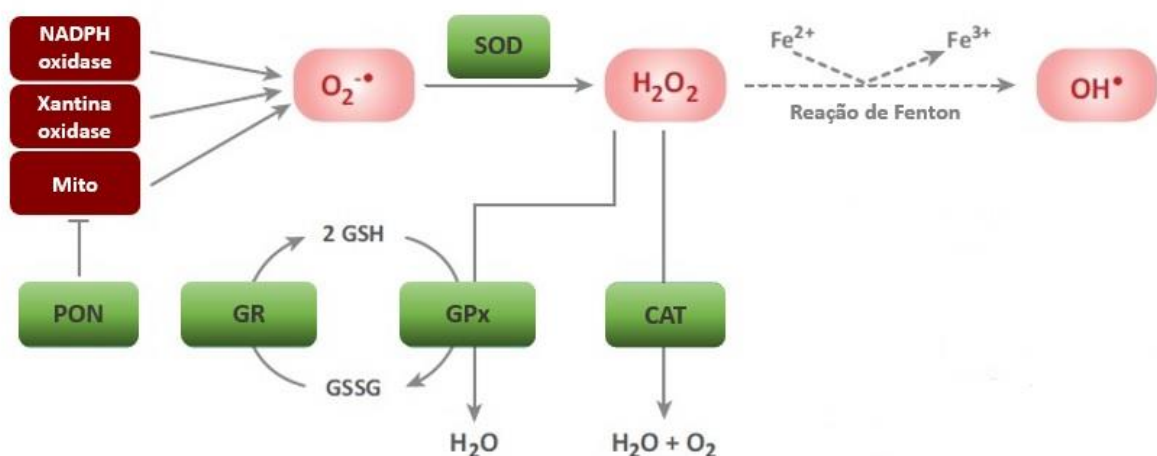
### **2. 3 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes no metabolismo do paracetamol**

Além do metabolismo do fármaco e do estresse do retículo endoplasmático, o estresse oxidativo é um fator importante na lesão provocada pelo paracetamol (YAN et al., 2018). Estresse oxidativo é uma condição relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças, sendo definido como um estado em que a formação de ERO excede a capacidade do sistema antioxidante de neutralizar esses compostos no organismo (YOSHIKAWA; NAITO, 2002). Neste contexto, o NAPQI, gerado através do citocromo P450, promove extravasamento de

elétrons da cadeia transportadora, devido a interação com os complexos I e II, favorecendo a formação de radicais superóxido (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016).

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável por iniciar a defesa contra os radicais superóxido, promovendo sua dismutação em  $H_2O_2$  e oxigênio. Os mamíferos possuem três isoformas dessa enzima: SOD-Cu/Zn citosólica (SOD1), SOD-Mn mitocondrial (SOD2) e SOD-extracelular (SOD3). Subsequente à dismutação pela superóxido dismutase, o  $H_2O_2$  pode ser metabolizado pela catalase e glutatona peroxidase (GPx). A enzima catalase está localizada nos peroxissomos celulares e, em menores proporções, no citosol. A ação dessa enzima consiste na decomposição do  $H_2O_2$ , com formação de água e oxigênio molecular ( $O_2$ ) e desempenha um relevante papel quando a glutatona é insuficiente na resposta antioxidante ao estresse oxidativo (VALKO et al., 2007; POWERS; JACKSON, 2008; RAHAL et al., 2014) (FIGURA 4).

Em reações que acontecem na mitocôndria, a glutatona peroxidase é responsável por catalisar a transformação do  $H_2O_2$  em água. Para que essa redução aconteça, o  $H_2O_2$  é reduzido através da conversão da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG), pela ação da glutatona peroxidase. Além disso a reciclagem da GSSG é catalisada pela glutatona redutase (GR), promovendo a conversão da GSSG a GSH (ZITKA et al., 2012; CHEN et al., 2013; ILKHANI; HOSSEINI; SAEDISOMEOLIA, 2016). Uma vez que na intoxicação com paracetamol, o aumento de NAPQI está relacionado com a depleção da glutatona, as enzimas do sistema glutatona (GPx e GR) podem ser consideradas os principais mecanismos de defesas (FIGURA 4).



**Figura 4** – Representação esquemática das enzimas envolvidas na geração e inativação de espécies reativas de oxigênio (adaptado de LI; HORKE; FÖRSTERMANN (2013)).  $O_2^{\bullet-}$ : ânion superóxido; SOD: superóxido dismutase;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio;  $OH^{\bullet}$ : radical hidroxila; CAT: catalase; GPx: glutatona peroxidase; GSSG: glutatona oxidada; GR: glutatona redutase; GSH: glutatona reduzida; PON: paraoxonase.

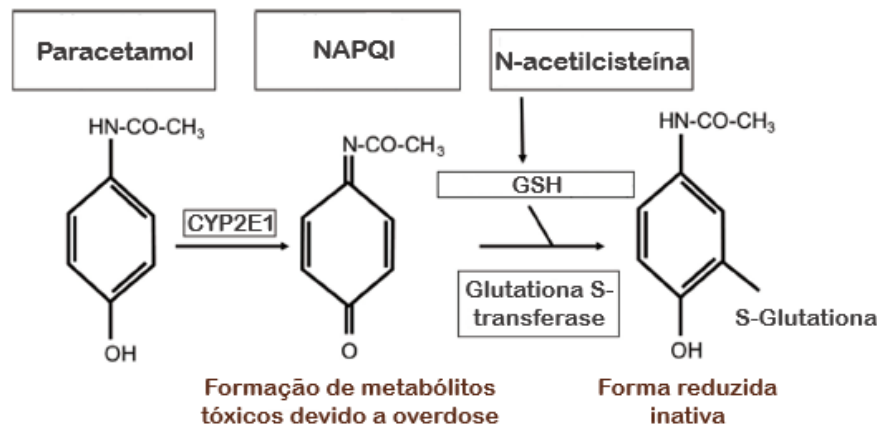
Além dessas enzimas, as paraoxonases possuem um importante papel antioxidante, sendo conhecidas as isoformas PON1, PON2 e PON3. As paraoxonases possuem propriedades anti-inflamatórias e estão envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo ao prevenir a geração de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial (AVIRAM; ROSENBLAT, 2004; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013) (FIGURA 4). KARADAS et al. (2014) observaram que a diminuição da atividade sérica da PON1 foi associada com o maior estresse oxidativo promovido pelo paracetamol e sugeriram que esse parâmetro pode ser utilizado para avaliar a progressão da toxicidade em pacientes.

O Nrf2 é um fator de transcrição que regula a expressão de enzimas antioxidantes, atuando na defesa celular contra o estresse oxidativo, e tem caráter crítico para as funções hepáticas. Dentre essas enzimas reguladas pelo Nrf2 destacam-se enzimas responsáveis pela síntese e conjugação da glutatona, cuja ação no metabolismo do paracetamol é de suma importância para a detoxificação do NAPQI. Um estudo demonstrou que camundongos deficientes em Nrf2 são mais sensíveis à hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol, assim pode-se considerar que o Nrf2 seja um importante marcador neste modelo (GOLDRING et al., 2004; LIU et al., 2013; YANG et al., 2013).

## **2. 4 Tratamento da hepatotoxicidade via paracetamol**

Atualmente a N-acetilcisteína é o medicamento utilizado contra a hepatotoxicidade via paracetamol, porém seu efeito é mais relevante nas primeiras horas (8 a 10 h) após a ingestão excessiva do fármaco. A N-acetilcisteína é descrita como um antioxidante, atuando como um precursor da glutatona no aumento da concentração de glutatona reduzida e favorecendo a formação de adutos com o NAPQI e consequente depuração hepatocítica desse metabólito. A N-acetilcisteína apresenta um elevado estado redox de tiol, sendo de grande importância na otimização da capacidade antioxidante da célula (LEE; LARSON; STRAVITZ, 2011; CHEN et al., 2013; KRENKEL; MOSSANEN; TACKE, 2014). O provimento de N-acetilcisteína no fígado também fornece substratos energéticos para o ciclo de Krebs, garantindo a manutenção dos níveis hepáticos de ATP, com melhora da função mitocondrial e ação sobre a sulfatação, favorecendo o metabolismo de fase II (PRESCOTT, 1983; SAITO; ZWINGMANN; JAESCHKE, 2010) (FIGURA 5).





**Figura 5** - Inativação do NAPQI via N-acetilcisteína (adaptado de KRENKEL; MOSSANEN; TACKE (2014)). CYP2E1: citocromo P450 2E1; NAPQI: N-acetil-p-benzoquinona imina; GSH: glutathione reduzida.

Devido aos mecanismos envolvidos nas lesões hepáticas desencadeados pelo paracetamol, produtos naturais bem como compostos bioativos têm sido apontados como possíveis agentes terapêuticos (JAESCHKE et al., 2011). Nesta perspectiva, YEN et al. (2008) demonstraram que ratos Wistar responderam a intoxicação com paracetamol (835 mg/Kg de massa corporal) apresentando aumento das aminotransferases séricas e da peroxidação lipídica hepática; em relação às enzimas antioxidantes houve diminuição da atividade enzimática da GPx, catalase e superóxido dismutase. Os ratos também apresentaram alterações histopatológicas no fígado com presença de necrose, deposição lipídica, degeneração e infiltração de linfócitos, demonstrando o quanto doses elevadas de paracetamol causam danos ao fígado e desequilíbrio redox. Neste trabalho, o pré-tratamento com extrato etanólico ou com nanopartículas da semente de *Cuscuta chinensis* tiveram efeito antioxidante e hepatoprotetor, revertendo as alterações provocadas pela intoxicação com paracetamol. Os autores ainda pontuaram que nanopartículas contendo menor dose de *Cuscuta chinensis* apresentaram resultados mais satisfatórios do que o extrato etanólico, possivelmente pela melhor absorção e solubilidade dos compostos.

Considerando também o papel do estresse oxidativo na evolução da intoxicação com paracetamol, o extrato hidroalcoólico da carqueja promoveu melhora no sistema de defesa antioxidante. Essa conclusão foi obtida a partir da observação da restauração das atividades enzimáticas da catalase e superóxido dismutase, bem como da expressão gênica de subunidades da NADPH oxidase e da enzima óxido nítrico sintase. Além de reestabelecer o balanço entre ERO e óxido nítrico, cujas respostas foram alteradas pela administração de paracetamol, o sistema glutathione foi restaurado no grupo que recebeu o extrato hidroalcoólico de carqueja

(PÁDUA et al., 2013; PÁDUA et al., 2014). Anteriormente foi demonstrado que em modelo *in vitro* e *in vivo* houve redução da produção de ERO nos neutrófilos mediante tratamento com a carqueja e quercetina (PÁDUA et al., 2010).

A administração prévia de resveratrol por três dias promoveu melhorias morfológicas, histopatológicas e bioquímicas nos camundongos intoxicados com 400 mg de paracetamol/Kg de massa corporal. Diferentes doses de resveratrol foram testadas sendo observada menores atividades de CYP1A2, CYP2E1, e CYP3A11, com posterior inibição da formação de NAPQI e da JNK. Tais resultados apontam que o resveratrol auxilia na regeneração hepática após a intoxicação mediada pelo paracetamol (WANG et al., 2015).

SABIR et al. (2017) administraram uma dose de 640 mg de paracetamol/Kg de massa corporal em camundongos e após 24 h observaram que os animais apresentaram as atividades das transaminases séricas aumentadas, assim como maior peroxidação lipídica no fígado. Por outro lado, houve redução da atividade da enzima catalase, da concentração de glutathiona e de ácido ascórbico após a intoxicação com paracetamol. Os camundongos que receberam administração do extrato aquoso de *Zanthoxylum alatum*, fruto típico do Paquistão, durante quatro dias antes da intoxicação com paracetamol apresentaram melhoria de todos os parâmetros avaliados. Assim, os autores salientaram o uso desse fruto como um alimento funcional responsável pelo efeito hepatoprotetor neste modelo experimental.

A administração de licopeno em camundongos promoveu efeito antioxidante, com diminuição das áreas necróticas e do dano oxidativo via carbonilação proteica. A avaliação da atividade *in vitro* demonstrou que esse composto também inibiu a produção de ERO em cultura de células. O pré-tratamento com licopeno por 14 dias foi eficaz em reduzir a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, aumentar a atividade da catalase e as concentrações de glutathiona reduzida e total, sugerindo melhoria do desequilíbrio redox. Juntamente a esses resultados, os autores encontraram menor atividade de metaloproteinase e expressão gênica da interleucina 1 $\beta$  quando os camundongos foram pré-tratados com o licopeno (BANDEIRA et al., 2017b; BANDEIRA et al., 2017a).

Visto os resultados com paracetamol, é notável que a administração desse fármaco promove um desbalanço no sistema antioxidante e a utilização de diversas espécies vegetais foram capazes de reverter os danos hepáticos, independentemente de serem administrados como extratos, compostos isolados ou formulações mais complexas.

## 2. 5 Açaí e suas propriedades funcionais

O açaí é o fruto da palmeira *Euterpe oleracea* Martius nativo da América do Sul e pertencente à família das Arecaceae. Essa palmeira é encontrada principalmente na região do estuário do rio Amazonas e o estado do Pará é seu principal centro de dispersão no Brasil. O nome açaí tem origem tupi (yá-çai) e significa “fruto que chora” (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000; NOGUEIRA; FIGUERÊDO; MULLER, 2006).

O açazeiro é característico por ser uma palmeira com altura entre 15 e 30 m, com produção de três a quatro cachos. Nestes cachos estão dispostos centenas de frutos tipo drupa, globosos, com peso médio de 1,5 g e diâmetro entre 1 e 2 cm, em que o período de safra ocorre entre os meses de julho e dezembro. Quando imaturos os frutos apresentam coloração verde-brilhante e após a completa maturação são identificados pela cor do púrpura ao quase preto (OLIVEIRA et al., 2002; DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). Embora a palmeira seja amplamente aproveitada, seja como planta ornamental, confecção de artesanato, extração de madeira, produção de celulose e ração animal, sua importância econômica, cultural e social é majoritariamente voltada para a extração do palmito e dos frutos. Na região norte do país, o açaí é considerado o alimento básico para as populações ribeirinhas das áreas de exploração extrativista e foi na forma de suco e polpa que foi difundido para todo o território nacional e em outros países devido ao seu valor nutritivo e energético (NOGUEIRA; FIGUERÊDO; MULLER, 2006; TONON; BRABET; HUBINGER, 2010) (FIGURA 6).

O processamento do açaí consiste em extração mecânica ou manual, cujo produto resultante é classificado de acordo com a quantidade de água utilizada na maceração e, conseqüentemente, o teor de sólidos totais, podendo ser fino (8 a 11 %), médio (11 a 14 %) e grosso (superior a 14 %). A comercialização é realizada de diversas maneiras, desde *in natura* nas regiões de produção, até nas formas congelada e pasteurizada, liofilizada, na fabricação de bebidas energéticas, produção de sorvetes, geleias e outros produtos derivados (BRASIL; ABASTECIMENTO, 2000; BRONDÍZIO; SAFAR; SIQUEIRA, 2002).

A expansão do comércio do açaí estimulou o desenvolvimento de pesquisas quanto a composição do fruto e seu potencial antioxidante. SCHAUSS et al. (2006b) analisaram a composição da polpa de açaí e observaram que o teor calórico foi de 533,9 Kcal/100 g, sendo constituído por 8,1 % de proteínas, 32,5 % de lipídios, 52,2 % de carboidratos, desse percentual de carboidrato 44,2 % foram equivalentes as fibras presentes no açaí e 1,3% de açúcares. Em relação aos ácidos graxos há predomínio dos insaturados, constituindo-se por 26,1 % de saturados, 60,6 % de monoinsaturados e 13,3 % de ácidos graxos poli-insaturados, destacando-

se respectivamente, o ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico. Dentre as análises realizadas, foi encontrado que o açaí é rico em cálcio e ferro, apresentando pequenas quantidades das vitaminas A e C.



**Figura 6** – Imagens da palmeira, cacho com os frutos imaturos, cacho com os frutos maduros e açaí pós-colheita.

Em relação aos compostos presentes no açaí, destacam-se alguns com conhecida função antioxidante. As antocianinas são compostos bioativos pertencentes ao grupo dos flavonoides, cuja pigmentação natural varia entre o vermelho e violeta. Estudos relataram que essa classe de flavonoides atua sob a prevenção de danos ao DNA, inibição enzimática, resposta anti-inflamatória e inibição da peroxidação lipídica (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; MURADOR et al., 2018).

Avaliações sobre a capacidade antioxidante do açaí também foram realizadas. Foi observado que o açaí liofilizado possui uma elevada capacidade de eliminar radical peroxila e superóxido em testes *in vitro*, com efeitos discretos sob peroxinitrito, radical hidroxila e óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeos. Houve ainda efeito inibidor sobre as ciclo-oxigenases 1 e 2. Desse modo os autores sugeriram que o açaí pode desempenhar um papel antioxidante, promovendo atividade anti-inflamatória (SCHAUSS et al., 2006a).

Sabe-se ainda que dentre os flavonoides, o açaí possui as antocianinas cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutenosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo, cianidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-arabinosil-arabinosídeo e peonidina-3-rutinosídeo. A capacidade antioxidante não pode ser atribuída exclusivamente a um componente, mas à composição do fruto como um todo, contribuindo para uma atuação sinérgica ou antagônica entre os componentes (BOBBIO; DRUZIAN; ABRAO, 2000; DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004; SCHAUSS et al., 2006a; GOUVÊA et al., 2012; MULABAGAL; KELLER; CALDERÓN, 2012; PAZ et al., 2015).

Visto suas características antioxidantes, nos últimos anos o açaí foi amplamente utilizado como objeto de estudo em diversos modelos experimentais, a fim de avaliar os efeitos terapêuticos do fruto. Os primeiros relatos de seu uso medicinal datam de 1984 e estão relacionados com a ação antidiarreica do óleo do açaí (PLOTKIN; BALICK, 1984). Pesquisas recentes têm demonstrado que o açaí promove benefícios em experimentos realizados em modelos de obesidade, hipertensão, aterosclerose (XIE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2018).

Entre os trabalhos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa, DE SOUZA et al. (2010) encontraram melhoria de biomarcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e redução de lipídios séricos em ratas alimentadas com uma dieta hipercolesterolêmica suplementada com 2 % de polpa de açaí. A suplementação com açaí promoveu redução da concentração de proteínas carboniladas e aumento da concentração dos grupos de sulfidrilas livres, totais e ligados a proteínas. Ainda foi encontrado efeito do açaí sobre as atividades enzimáticas da SOD e paraoxonase. Além do efeito da suplementação com açaí no metabolismo redox, foi observado que o colesterol total, o colesterol não-HDL e o índice aterogênico apresentaram redução em relação ao grupo hipercolesterolêmico sem suplementação. Mais adiante, DE SOUZA et al. (2012) exploraram esse modelo encontrando aumento da excreção fecal de colesterol acompanhada da maior expressão gênica dos transportadores ABCG5, ABCG8 e do receptor de LDL. Diante desses resultados os autores confirmaram o efeito hipocolesterolêmico do açaí e sugeriram possíveis mecanismos para esta ação.

O efeito do açaí também foi descrito em modelo experimental de diabetes. GUERRA et al. (2011) observaram que a suplementação com 2 % de polpa de açaí promoveu maior capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Após 30 dias, os animais diabéticos suplementados com polpa de açaí apresentaram conteúdo de glutatona total aumentado e menor concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Nos ratos sem diabetes, a suplementação com açaí ainda

promoveu maior expressão das enzimas antioxidantes gama glutamylcisteína sintetase ( $\gamma$ GCS) e GPx, com diminuição da produção de ERO por neutrófilos.

BONOMO et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante da polpa de açaí em modelo experimental de *Caenorhabditis elegans*. Os autores demonstraram que o açaí foi capaz de reduzir o estresse oxidativo por favorecer a translocação nuclear do fator de transcrição da FOXO, que é requerido para ativação da transcrição da catalase, superóxido dismutase, dentre outros.

De encontro com esses resultados, as propriedades antioxidantes do açaí despertaram interesse para os efeitos desse fruto em outros modelos experimentais. GUERRA et al. (2015) observaram que a administração de 3g/Kg de peso corporal de extrato aquoso de açaí em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica propiciou efeitos protetores no soro, fígado e tecido adiposo, evitando alterações deletérias provocadas pela doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD, do inglês, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*). O tratamento com o extrato mostrou-se eficiente em reestabelecer a concentração sérica e a expressão gênica da adiponectina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, ressaltando que esse resultado seja responsável pela melhoria da sensibilidade insulínica e modulação das vias relacionadas com o metabolismo lipídico no fígado.

PEREIRA et al. (2016) investigaram a ação do açaí sobre a paraoxonase no modelo de NAFLD em ratos. O açaí contribuiu para o aumento da expressão gênica e da atividade da paraoxonase 1 no grupo alimentado com dieta rica em lipídios, concomitantemente, foi observado aumento da expressão de apolipoproteína A-I e redução da expressão gênica do receptor *scavenger* classe B juntamente com redução do conteúdo lipídico e do grau de esteatose no fígado desses animais. Ademais, o tratamento com açaí ainda promoveu menor oxidação da LDL, possivelmente pela ação antioxidante da paraoxonase, melhorando a resposta ao estresse oxidativo desencadeada pela NAFLD.

Mais recentemente, CARVALHO et al. (2018) observaram que os efeitos protetores do açaí se estendem a outros modelos de indução da NAFLD. Enquanto DE SOUZA et al. (2012), GUERRA et al. (2015) e PEREIRA et al. (2016) estudaram os potenciais efeitos do açaí em dietas ricas em lipídios, neste trabalho os ratos foram alimentados com dieta contendo 60 % de frutose. A suplementação com 2 % de açaí liofilizado promoveu redução do grau de esteatose hepática e do número de células inflamatórias, com reestabelecimento da atividade sérica de alanina aminotransferase. Os autores encontraram aumento da atividade da catalase e da relação glutatona reduzida/glutatona oxidada, indicando que o açaí liofilizado atenuou o estresse oxidativo nesse modelo de indução da NAFLD.

Embora os trabalhos com humanos sejam limitados, os estudos publicados demonstram a atuação protetiva do açaí, extrapolando os modelos experimentais. Através de um estudo piloto, UDANI et al. (2011) acompanharam um grupo de 10 indivíduos com sobrepeso, que consumiram 200 g de polpa de açaí por 30 dias. Ao final desse período, os participantes obtiveram redução das concentrações de glicose, insulina e colesterol total, indicando que houve benefícios do consumo do açaí sobre a homeostase glicêmica e marcadores de risco metabólico. Outro estudo utilizando delineamento semelhante ao estudo de UDANI et al. (2011) (tempo e dose) foi realizado com mulheres jovens de 18 a 35 anos, sendo observado a melhora do *status* antioxidante sérico devido a redução da produção de ERO e da concentração de proteínas carboniladas. BARBOSA et al. (2016) encontraram também aumento da capacidade antioxidante total em células polimorfonucleares, da atividade enzimática da catalase e da concentração de sulfidrilas. O aumento da concentração de apolipoproteína A-I, da atividade da paraoxonase e da capacidade antioxidante total no soro, com diminuição da concentração sérica de ERO e da LDL oxidada (PALA et al., 2018) reforçam que os resultados obtidos em estudos com humanos corroboram os achados em modelos experimentais. Desse modo, o conjunto dos resultados encontrados apontam que o consumo de açaí atua em diversas vias metabólicas de modo favorável na manutenção da saúde ou no retardo da progressão das doenças induzidas por vias farmacológica ou alimentares.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista as características fitoquímicas do açaí e os efeitos observados em estudos *in vivo* em que foram ressaltados os benefícios do fruto no fígado, com destaque para o reestabelecimento da capacidade antioxidante e anti-inflamatória, a hipótese deste estudo é que o pré-tratamento com a polpa de açaí possa atenuar os efeitos deletérios da overdose de paracetamol no metabolismo pelo citocromo P450, por meio da atenuação do estresse oxidativo, do estresse do retículo e restauração do sistema glutaciona em ratas.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do pré-tratamento com polpa de açaí filtrada sobre fatores envolvidos nos danos hepáticos desencadeados pelo paracetamol em ratas *Fischer*.

### 4.2 Objetivos específicos

I – Caracterizar a polpa de açaí filtrada em relação a composição centesimal, a capacidade antioxidante e a composição fitoquímica.

II – Investigar os efeitos do pré-tratamento com polpa de açaí filtrada na intoxicação com paracetamol sobre:

- Os danos hepáticos pela análise histológica e marcadores bioquímicos séricos;
- O perfil de marcadores de danos oxidativos e defesas antioxidantes;
- O comportamento do sistema glutathiona;
- A expressão de genes do citocromo P450;
- O perfil da expressão de genes de resposta ao estresse do retículo endoplasmático.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Aquisição e preparo da polpa de açaí

Os ensaios foram realizados com a polpa de açaí médio pasteurizada da marca *Icefruit* Comércio de Alimentos LTDA® (São Paulo - BR). Foi utilizada a polpa de açaí com as seguintes designações: lote L09/16, fabricação 18/11/2016, validade 18/11/2018 e, de acordo com o fabricante, não há adição de conservantes no produto.

A polpa de açaí foi adquirida no comércio de Ouro Preto-MG e armazenada em *freezer* a -20 °C até a utilização. Para preparo da amostra, a polpa de açaí foi descongelada e filtrada em papel filtro. A polpa filtrada foi utilizada para administração aos animais e para caracterização centesimal, fitoquímica e antioxidante.

A utilização da polpa de açaí médio foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob cadastro nº AF455D1.

### 5.2 Caracterização *in vitro* do açaí filtrado

#### 5.2.1 Composição centesimal

A análise da composição centesimal da polpa de açaí filtrada foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Escola de Nutrição - Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e realizadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação da umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105 °C, até obtenção de peso constante. Os lipídios foram extraídos pelo método de *Bligh-Dyer* devido ao grande conteúdo de água na amostra, utilizando clorofórmio e metanol como solventes. As cinzas foram determinadas após incineração do material em mufla a 550-660 °C. A determinação de proteínas foi baseada no método de *Kjeldahl*, em que a quantidade de proteína foi calculada pelo produto da quantidade de nitrogênio total, considerando 6,25 como fator de conversão.

A metodologia utilizada para a determinação de fibra alimentar total foi realizada de acordo com a AOAC (1996) e consiste na precipitação da fibra alimentar a partir da utilização de  $\alpha$ -amilase, protease e amiloglucosidase com digestão de proteínas e amido. Os carboidratos foram determinados pela diferença em relação aos demais componentes quantificados. As

análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibras alimentar total foram realizadas em triplicata.

### **5. 2. 2 Capacidade antioxidante**

A determinação da capacidade antioxidante da polpa filtrada foi realizada utilizando 2,2-difenil-1picril-hidrazil (DPPH), o método tem como princípio a transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Em tubos de ensaio foram adicionados 3,9 mL de solução de DPPH 60 µmol/L dissolvidos em metanol 80 % e 0,1 mL da polpa de açaí, após homogeneização as misturas permaneceram em repouso durante 30 min na ausência de luz. O preparo do controle foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com a água destilada em substituição da amostra. Foi feita a leitura das absorvâncias a 515 nm em espectrofotômetro (Biospectro® - BR) e metanol 80 % foi utilizado como branco. Uma curva padrão foi construída utilizando o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich® - EUA) como antioxidante de referência em soluções com concentrações variando entre 100 a 800 µmol/L. A capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox (TEAC) foi expressa em µmol/L de TEAC/g de açaí. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **5. 2. 3 Conteúdo de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais da polpa filtrada foi determinado por método colorimétrico que é baseado na reação do cloreto de alumínio com os flavonoides, formando complexos estáveis (HOSSAIN; RAHMAN, 2011). Em tubo falcon foram misturados 0,5 mL de polpa de açaí, 0,1 mL de cloreto de alumínio 10 %, 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 4,3 mL de água destilada. O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com a água destilada em substituição da amostra. Após homogeneização, a mistura foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente e a absorvância foi determinada a 415 nm em espectrofotômetro (Biospectro® - BR). Uma curva padrão foi construída utilizando a quercetina como flavonoide de referência, em solução com concentrações entre 0 e 100 µg/mL. O conteúdo de flavonoides totais foi expresso como equivalente de quercetina/100 g de polpa de açaí. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5. 2. 4 Conteúdo de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por GEORGÉ et al. (2005). O método tem como base a redução do reagente de Folin-Ciocalteu, que é uma mistura dos ácidos fosfotungstíco ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), e oxidação dos compostos fenólicos produzindo então os óxidos tungstíco ( $W_8O_{23}$ ) e molibdenio ( $MoO_2$ ) de coloração azul que absorvem luz a 760 nm. Inicialmente 0,1 mL de polpa de açaí foram diluídos em 9,9 mL de água destilada. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich® - EUA) diluído em água destilada (1:10) e 0,5 mL da amostra, a mistura foi incubada durante 2 min em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5 % e após a homogeneização, a mistura foi incubada a 50 °C durante 15 min, seguida de banho de gelo. O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com a água destilada em substituição da amostra. As absorbâncias foram determinadas a 760 nm em espectrofotômetro (Biospectro® - BR). Uma curva padrão foi construída utilizando o ácido gálico como polifenol de referência, em solução com concentrações entre 5 e 50 mg/L. O conteúdo foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de polpa de açaí. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 5. 2. 5 Quantificação das antocianinas monoméricas totais

As antocianinas totais foram determinadas pela metodologia proposta por GIUSTI; WROLSTAD (2001) através do pH diferencial. Este método possibilita a quantificação das antocianinas monoméricas totais devido ao diferente comportamento espectral das antocianinas monoméricas em relação às poliméricas em condições distintas de pH. A análise consiste na ação de dois tampões com pH de 1,0 e 4,5 sobre a amostra, as absorbâncias dessas soluções são lidas em dois comprimentos de onda (700 nm e no comprimento de onda referente à antocianina presente em maior quantidade na amostra). De acordo com os comprimentos de onda utilizados, é possível eliminar a interferência de compostos de degradação no ensaio.

A polpa de açaí foi diluída em água destilada na proporção de 1:3. Em seguida, 500 µL da amostra diluída foram adicionados em dois balões volumétricos de 10 mL, sendo um deles ajustado com o tampão cloreto de potássio 0,025 mol/L (pH 1,0) e o outro com tampão acetato de sódio 0,4 mol/L (pH 4,5). As soluções foram homogeneizadas e permaneceram sob incubação na ausência de luz e temperatura ambiente durante 30 min. As leituras foram

realizadas nos comprimentos de onda de 510 e 700 nm em espectrofotômetro (Biospectro® - BR), sendo a água destilada utilizada como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A quantificação das antocianinas monoméricas totais foi expressa em mg de equivalentes de cianidina-3-rutinosídeo por 100 g de polpa de açaí, sendo calculado através da equação:

$$\text{Antocianinas totais} = \frac{(A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4,5} \times PM \times FD}{\epsilon \times l} \times 100$$

Em que:

$A_{510}$  e  $A_{700}$   $\text{pH}1,0$  = absorbâncias lidas da solução em pH 1,0 nos comprimentos de onda 510 e 700 nm, respectivamente

$A_{510}$  e  $A_{700}$   $\text{pH}4,5$  = absorbâncias lidas da solução em pH 4,5 nos comprimentos de onda 510 e 700 nm, respectivamente

PM = peso molecular da cianidina-3-rutinosídeo (630,98 g/mol)

FD = fator de diluição da amostra

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar da cianidina-3-rutinosídeo em solução tampão pH 1,0 a 510 nm ( $7.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

O valor resultante foi multiplicado por 100, expressando a quantidade antocianinas totais em mg presente em 100 g de amostra.

### 5. 2. 6 Identificação de antocianinas na polpa de açaí por UPLC-DAD-ESI-MS

Para preparo da amostra, a polpa de açaí filtrada foi seca a 40 °C em estufa com temperatura controlada, posteriormente 5 mg da polpa seca foi ressuspensa em 1 mL de metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich® - EUA) e filtrada em filtro difluoreto de polivinilideno 0,2  $\mu\text{m}$  (Chromafil® - GER). O perfil cromatográfico da polpa de açaí foi obtido através de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos (detecção UV 220 a 400 nm) e de espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (UPLC-DAD-ESI-MS). Utilizou-se o equipamento UPLC ACQUITY (Waters Corporation® - EUA), coluna CSH130 C18 (1,7  $\mu\text{m}$ ; 50 x 3 mm) em forno a 40 °C com fluxo de fase móvel de 0,3 mL/min e 4  $\mu\text{L}$  de amostra foram injetados. Foi empregado um gradiente de água 0,1 % ácido fórmico – acetonitrila (ACN) 0,1 % ácido fórmico, com um período de eluição gradiente linear (5 –

95 % de ACN, em 10 min), mantendo-se, a seguir, eluição isocrática (95 % de ACN, durante 1 min). Para retornar à condição inicial (95 % de água) foram necessários 2 min, totalizando 13 min de corrida (TABELA 1). Os espectros de massas foram obtidos nos modos positivo e negativo de ionização, com voltagem do capilar de 3,5 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Tabela 1** - Gradiente de eluição empregado nas análises da polpa de açaí por UPLC-DAD-ESI-MS

Tempo (minuto)	H <sub>2</sub> O (0,1 % ácido fórmico)	ACN (0,1 % ácido fórmico)
0	95	5
10	5	95
11	5	95
13	95	5

### 5.3 Animais

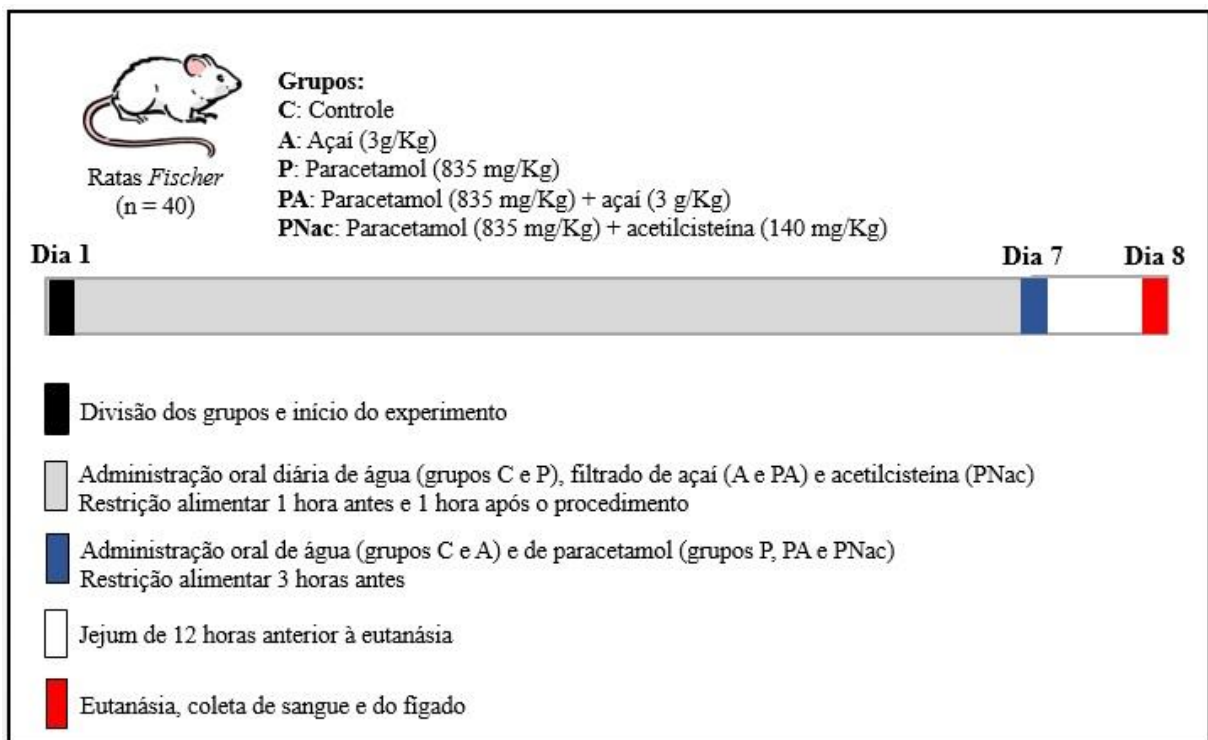
Foram utilizadas 40 ratas albinas fêmeas (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Fischer*, com peso médio de 170 g e aproximadamente 10 semanas de idade, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição - UFOP. As ratas foram alojadas individualmente em gaiolas metálicas, mantidas em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade, ventilação e receberam água e ração comercial Nuvilab® *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP, sob protocolo nº 2017/17 (ANEXO).

### 5.4 Delineamento experimental

As ratas foram distribuídas em cinco grupos experimentais: Controle (C), Açaí (A), Paracetamol (P), Paracetamol + Açaí (PA) e Paracetamol + Acetilcisteína (PNac), e todos os animais receberam seus respectivos pré-tratamentos via gavagem. Durante 7 dias os grupos C e P receberam água filtrada, os grupos A e PA receberam 3 g de açaí/Kg de massa corporal (GUERRA et al., 2015), e o grupo PNac recebeu 140 mg de acetilcisteína/Kg de massa corporal (KÜÇÜKARDALı et al., 2002) (EMS® - BR). No sétimo dia de experimento, os animais foram submetidos a jejum 3 h antes da administração da água filtrada (grupos C e A) ou do

paracetamol (grupos P, PA e PNac). A dose de paracetamol administrada para as ratas foi correspondente a 835 mg/Kg de massa corporal (YEN et al., 2008) (Janssen-Cilag® - BEL). A fim de garantir o esvaziamento gástrico e melhor absorção, os animais permaneceram em restrição alimentar 1 h antes e 1 h após a gavagem de acordo com o grupo experimental. Para melhor adequação das doses de açaí e de acetilcisteína, as ratas foram pesadas a cada dois dias (FIGURA 7).

Após a administração do paracetamol os animais ficaram em jejum durante 12 h, posteriormente foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi coletado por meio de incisão dos vasos sanguíneos adjacentes ao plexo braquial até sangria total, armazenados em tubos de polipropileno sem anticoagulante e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min para obtenção do soro. O fígado foi coletado, pesado, lavado em solução salina 0,9 % e foram retirados fragmentos para análise histológica (formol 10 %), expressão gênica (nitrogênio líquido) e o material restante foi armazenado em *freezer* à -80 °C juntamente com o soro.



**Figura 7** - Representação esquemática do delineamento experimental. Ratas fêmeas, da linhagem *Fischer* foram distribuídas em 5 grupos experimentais.

## 5. 5 Dosagens bioquímicas séricas

As dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A® - BR), sendo determinadas as concentrações de proteínas totais (referência: 99, lote: 7004), albumina (referência: 19, lote: 7007), atividade de alanina aminotransferase (ALT) (referência: 53, lote: 5002) e aspartato aminotransferase (AST) (referência: 52, lote: 5003) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de globulinas séricas foi calculada pela diferença entre a concentração das proteínas totais e da albumina. A relação AST/ALT foi obtida pela divisão das atividades da AST pela ALT.

## 5. 6 Análises histológicas do fígado

O processamento do fígado foi realizado no Laboratório de Morfopatologia e a captura das fotomicrografias no Laboratório Multiusuários de Microscopia de Campo Claro/Fotodocumentação e Morfometria, ambos da UFOP. Fragmentos de fígado foram fixados em formol 10 %, esses fragmentos foram cortados transversalmente, processados em série crescentes de álcoois e, posteriormente, incluídos em parafina. Secções parafinadas foram cortadas em micrótomo semiautomático com espessura aproximada de 4  $\mu\text{m}$ . As secções de tecido foram fixadas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, em seguida essas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. Foram fotografadas 40 imagens de cada lâmina, em microscópio Leica DM5000B (Leica Application Suite® - GER), acoplado à câmera digital MC170HD (Leica Application Suite® - GER), e fotografadas com aumento de 440 x.

As análises semiquantitativas da esteatose microvesicular e degeneração hidrópica foram realizadas a partir da contagem dos quadrantes em que houve presença desses tipos de lesões. A classificação para esses parâmetros foi realizada de acordo com a escala de BRUNT et al. (1999), onde a ausência de danos corresponde ao grau 0; até 33 % de danos: grau 1, de 34 a 66 %: grau 2 e acima de 66 % de prevalência de danos: grau 3. A análise quantitativa de necrose foi realizada a partir da área da lesão/ $\mu\text{m}^2$  pelo *software* ImageJ® (Maryland - EUA). A quantificação das células inflamatórias foi realizada a partir da contagem automática dos núcleos celulares totais presentes em cada imagem, sendo determinada as diferenças nos processos inflamatórios em relação ao número total de células na mesma área do fígado utilizando o *software* Leica Qwin v3.5.1 (Leica Application Suite® - GER). As células inflamatórias foram determinadas como a quantidade de células/campo microscópico.



## **5. 7 Marcadores do estresse oxidativo hepático**

### **5. 7. 1 Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi avaliada pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pelo método descrito por BUEGE; AUST (1978) e se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico em se ligar aos lipídios oxidados. Inicialmente, 100 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol/L (pH 7,4) e centrifugado durante 10 min a 10.000 g e 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. Para dosagem foram adicionados em tubo de polipropileno 250 µL de amostra, 125 µL de ácido tricloroacético 28 % diluído em HCl 0,25 mol/L, 125 µL de ácido tiobarbitúrico 1 % em ácido acético e 62,5 µL de butil-hidroxi-tolueno 5 mmol/L diluído em etanol. Após homogeneização, a mistura foi incubada durante 15 min a 95 °C e em seguida submetida a 5 min de banho de gelo. Desse homogenato foram coletados 200 µL e misturado com 200 µL de butanol, após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado por 10 min a 10.000 g e 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para leitura das absorbâncias a 535 nm (BioTek® – EUA). O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com a água destilada em substituição da amostra. A curva padrão foi construída utilizando de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0,391 a 500 µmol/L). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de 1,1,3,3-tetrametoxipropano/mg de proteínas, sendo a concentração de proteínas totais determinada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951).

### **5. 7. 2 Carbonilação proteica**

Duas metodologias foram utilizadas para a avaliação da carbonilação proteica: a quantificação espectrofotométrica e o imunoenensaio de Oxyblot, ambas utilizando o método de LEVINE (1994). A quantificação de proteínas carboniladas tem como princípio a reação de grupos carbonilados com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), gerando a hidrazona correspondente, que pode ser analisada por espectrofotometria a 370 nm. Inicialmente, 100 mg de fígado foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 50 mmol/L contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mmol/L (pH 6,7) e centrifugado durante 10 min a 10.000 g e 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. Para a dosagem, foram preparados dois tubos para cada amostra, sendo um tubo controle (C) e um tubo amostra (A). Em ambos os tubos foram colocados 150 µL de amostra e 150 µL de ácido tricloroacético 20 %, com

posterior centrifugação a 2.000 g e 4 °C durante 2 min. Em seguida o sobrenadante de ambos os tubos foi descartado e, nos tubos C foram adicionados 500 µL de HCl 2 mol/L e nos tubos A, 500 µL de DNPH 10 mmol/L (Sigma-Aldrich® - EUA); após homogeneização, a mistura foi incubada durante 15 min, protegida de luz. Foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 20 % em todos os tubos e em seguida as reações foram homogeneizadas e centrifugadas a 2.000 g e 4 °C durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram submetidos a duas lavagens com 1 mL da mistura de acetato de etila: etanol (1:1) e centrifugação por 10 min, 4 °C a 5.000 g, sempre descartando o sobrenadante. Por fim, o *pellet* restante foi dissolvido em 500 µL de solução de guanidina 6 mol/L (Sigma-Aldrich® - EUA) e após centrifugação (10 min, 4 °C a 5.000 g) o sobrenadante foi utilizado para leitura das absorbâncias a 370 nm (BioTek® – EUA) e a solução de guanidina foi utilizada como branco. A concentração de proteína carbonilada foi determinada segundo a lei de Lambert Beer, utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona.

$$\text{Concentração proteínas carboniladas} = \frac{\Delta \text{ abs}}{\epsilon \times b} \times \frac{1.000.000}{\text{volume da amostra (mL)}}$$

Em que:

$\Delta \text{ abs}$  = diferença entre a absorbância do tubo A pela absorbância do tubo C

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar da hidrazona (22.000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

$b$  = caminho óptico (1 cm)

O valor resultante foi corrigido pela concentração de proteínas totais do sobrenadante expresso em mg/mL (LOWRY et al., 1951), dessa forma as concentrações de proteínas carboniladas foram expressas em nmol/mg de proteína.

Complementarmente, a avaliação por imunoenensaio de carbonilação proteica foi realizada via ensaio de Oxyblot, através da detecção da densidade das proteínas oxidadas após a reação com DNPH. Inicialmente, 30 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de solução de lise contendo tampão de lise celular 2 x, coquetel de inibidor de protease,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mol/L e NaCl 5 mol/L, o homogenato foi incubado em gelo durante 15 min e centrifugado por 15 min a 10.000 g e 4 °C. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951).

As amostras de proteína foram derivatizadas em solução contendo DNPH 10 mmol/L (Sigma-Aldrich® - EUA) e ácido trifluoracético 10 % e incubadas durante 15 min na ausência de luz. Posteriormente foi adicionada a solução neutralizante (Tris 2 mol/L e glicerol 30 %) e as amostras foram submetidas a eletroforese unidimensional realizada em gel de SDS-poliacrilamida 10 % com 5 µg de proteína por canaleta, usando o sistema Mini-Protean® System Casting Stand (Bio-Rad Laboratories® - EUA) a 100 V durante 2,5 h, obtendo dois géis idênticos. Utilizou-se o padrão *Precision Plus Protein TM Dual Color Standards* (10-250 kDa) de peso molecular (Bio-Rad Laboratories® - EUA). Um gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich® - EUA) para analisar o padrão de proteínas da matriz; o outro gel foi transferido através de eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories® - EUA) a 220 mA durante 1,5 h e o bloqueio dessa membrana foi realizado por meio da incubação com leite desnatado *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, a membrana foi incubada em anticorpo primário anti-2,4-dinitrofenol de coelho (Sigma-Aldrich® - EUA) (1:2.000) por 3 h e posteriormente incubado com anticorpo secundário IgG anti-coelho acoplado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology® - EUA) (1:5.000) durante 1 h. A detecção das proteínas oxidadas foi visualizada por quimiluminescência usando o reagente *Luminata Classico Western HRP substrat* (Sigma-Aldrich® - EUA), de acordo com as instruções do fabricante e revelados em filmes de raio-x (Kodak Company® - EUA). A densitometria das proteínas foi realizada pelas imagens escaneadas provenientes das membranas e géis e posteriormente analisadas pelo *software Quantity One 4.6.6* (Bio-Rad Laboratories® - EUA). Os dados finais foram normalizados pelo gel de Coomassie.

### 5. 7. 3 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951). Primeiramente foram preparados quatro reagentes: reagente A: 0,25 g de sulfato de cobre e 0,5 g de citrato de sódio diluídos em 100 mL de água destilada; reagente B: 5 g de carbonato de cálcio e 1 g de hidróxido de sódio dissolvidos em 250 mL de água destilada; reagente C: 50 mL do reagente B e 1 mL do reagente A; reagente D: reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich® - EUA) e água destilada na proporção de 1:1.

Para a realização do ensaio, em tubos de polipropileno foram adicionados 100 µL da amostra (sobrenadante do homogenato do fígado), em seguida foram adicionados 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados e incubados durante 15 min na temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 100 µL do reagente D em todos os tubos e após homogeneização, foram

incubadas por 30 min sob ausência de luz. O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com a água destilada em substituição da amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Biospectro® - BR) a 660 nm. A curva padrão foi preparada utilizando solução de albumina bovina a 2 mg/mL em diferentes concentrações (0,05 e 1,00 mg/mL), assim as concentrações de proteínas totais no sobrenadante do homogenato do tecido foram expressas em mg/mL.

Essa análise foi realizada para correção das concentrações de TBARS e proteínas carboniladas, e das atividades enzimáticas da catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase e em seus respectivos sobrenadantes.

## 5. 8 Atividade de enzimas antioxidantes

### 5. 8. 1 Atividade sérica da enzima paraoxonase

A atividade da paraoxonase foi determinada conforme descrito por BELTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ (2002). Para determinação da atividade arilesterásica da enzima, o fenilacetato é utilizado como substrato e a reação é fundamentada na velocidade de hidrólise enzimática do fenilacetato com formação de fenol. Em tubo de polipropileno foram adicionados 5 µL do soro (diluição 1:3), 2 mL de tampão Tris-HCl a 9 mmol/L (pH 8,0) contendo 0,9 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> e o conteúdo foi homogeneizado. Após adicionar 500 µL de solução de fenilacetato (Sigma-Aldrich® - EUA), a absorbância da amostra foi lida exatamente 3 min depois a 270 nm. A mistura de tampão com solução de fenilacetato foi utilizada para zerar o espectrofotômetro (Shimadzu® - JPN). O resultado foi calculado utilizando-se o coeficiente de extinção molar do fenilacetato, segundo a lei de Lambert Beer. Os valores foram expressos em unidades por mL de soro (U/mL), em que uma unidade de paraoxonase é equivalente à hidrólise de 1 mmol de fenilacetato por min.

$$\text{Atividade arilesterásica} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \times b} \times \frac{1.000}{\text{tempo (min)} \times \text{volume do soro (mL)}}$$

Em que:

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar do fenilacetato (1.310 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

b = caminho óptico (1 cm)

### 5. 8. 2 Conteúdo sérico de sulfidrilas totais

A concentração dos grupos sulfidrilas totais em amostras biológicas foi determinada usando o reagente de Ellman, de acordo com o método de descrito por SEDLAK; LINDSAY (1968). Para cada reação foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de metanol, 150  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 30 mmol/L com EDTA 3 mmol/L (pH 8,2), 50  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5' dítio-bis-[2-nitrobenzóico] (DTNB) diluído em metanol e 40  $\mu\text{L}$  de amostra/série de padrões. Após centrifugação por 15 min, a 10.000 g em temperatura ambiente, as amostras foram lidas em leitor de microplaca (BioTek® - EUA) a 412 nm. A curva padrão foi preparada com glutationa estoque 20 mmol/L em diferentes concentrações (0 a 1000  $\mu\text{mol/L}$ ), em que o ponto com concentração de 0  $\mu\text{mol/L}$  foi utilizado para calibração. A concentração de sulfidrilas totais no soro foi expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .

### 5. 8. 3 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada através da adaptação do método de MARKLUND; MARKLUND (1974). O método tem como princípio a formação de hidroxibenzoquinona pela auto-oxidação do pirogalol e a inibição da redução do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT). A quantidade de enzima necessária para promover 50 % de inibição da auto-oxidação do pirogalol é considerada como uma unidade de atividade enzimática. 100 mg de fígado foram homogeneizadas com 1 mL de tampão fosfato 50 mmol/L (pH 7,0), em seguida foi centrifugado a 10.000 g, 4 °C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado como amostra. Para o ensaio foram pipetados em microplaca de 96 poços: 30  $\mu\text{L}$  de amostra/tampão fosfato (padrão), 99  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, 6  $\mu\text{L}$  de MTT 1,25 mmol/L e 15  $\mu\text{L}$  de pirogalol 100  $\mu\text{mol/L}$ . O poço com o branco da reação continha apenas 144  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 6  $\mu\text{L}$  de MTT. A placa foi incubada em estufa a 37 °C durante 10 min e em seguida foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido em todos os poços da placa. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca (BioTek® - EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Para cálculo da atividade de superóxido dismutase, subtrai-se o resultado obtido da amostra pelo valor encontrado do branco e, a seguir, divide-se esse valor pelo encontrado na diferença do padrão pelo branco. A partir da correção pela concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY et al., 1951), a atividade da superóxido dismutase foi expressa em U/mg de proteína.

#### 5. 8. 4 Atividade da catalase

A atividade enzimática da catalase foi determinada conforme descrito por AEBI (1984) e se baseia na decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase observada durante 3 minutos. Em suma, 100 mg de fígado foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 50 mmol/L (pH 7,0) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 min à 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. Em um tubo foi colocado 995 µL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol/L e esta foi mantida a 25 °C por 2 min, em seguida foram adicionados 5 µL da amostra. As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante 3 min a 240 nm no espectrofotômetro (Shimadzu® - JPN) previamente calibrado com tampão fosfato. O resultado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio, segundo a lei de Lambert Beer, onde uma unidade de catalase é equivalente a decomposição de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min.

$$\text{Atividade da catalase} = \frac{\Delta \text{ abs/min}}{\varepsilon \times b} \times \frac{1.000}{\text{volume do amostra (mL)}}$$

Em que:

$\Delta \text{ abs/min} = (\text{absorbância inicial} - \text{absorbância final}) / 2$

$\varepsilon = \text{coeficiente de extinção molar do H}_2\text{O}_2 \text{ (39,4 L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}\text{)}$

$b = \text{caminho óptico (1 cm)}$

Posteriormente foi realizada a correção pela concentração de proteínas totais do sobrenadante (LOWRY et al., 1951), os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### 5. 9 Sistema glutathiona

##### 5. 9. 1 Concentração de glutathiona total, oxidada e reduzida

O conteúdo de glutathiona total foi determinado utilizando o método de reciclagem com o DTNB proposto por GRIFFITH (1980). O ensaio consiste em um método cinético em que o DTNB é reduzido a ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. Para a determinação da concentração da glutathiona total e glutathiona oxidada (GSSG), 100 mg de fígado foram homogeneizados com 1 mL de ácido sulfosalicílico 5 %, e em seguida centrifugado por 10 min, 10.000 g à 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como amostra.

A glutationa total foi determinada em uma microplaca de 96 poços, adicionando 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 150  $\mu\text{L}$  da mistura de trabalho (tampão fosfato de potássio 100 mmol/L com 1 mmol/L de EDTA, pH 7,0; 1,5 mg/mL de DTNB; glutationa redutase a 6 U/mL), em seguida essa mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,16 mg/mL (Sigma-Aldrich® - EUA) foram adicionados às amostras e foram realizadas leituras sucessivas a cada minuto, durante 5 min em leitor de microplaca (BioTek® - EUA) à 412 nm. O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com o ácido sulfosalicílico em substituição da amostra. A curva padrão da glutationa total foi construída por meio da diluição seriada da solução de glutationa reduzida (Sigma-Aldrich® - EUA), sendo a concentração da amostra expressa em nmol/mL.

A concentração de GSSG foi determinada através da derivatização da GSH presente na amostra com 2-vinilpiridina. Para dosagem, foram adicionados em tubo de polipropileno 100  $\mu\text{L}$  de amostra, 2  $\mu\text{L}$  de vinilpiridina e o pH foi ajustado entre 6 e 7 com 4  $\mu\text{L}$  de trietanolamina. As amostras derivatizadas foram incubadas durante 1 h e a dosagem procedeu da mesma maneira que o ensaio de glutationa total. A curva padrão da GSSG foi construída por meio da diluição seriada da solução de glutationa reduzida (Sigma-Aldrich® - EUA), sendo a concentração da amostra expressa em nmol/mL. A concentração de glutationa reduzida foi obtida pela diferença entre a glutationa total e a glutationa oxidada.

### **5. 9. 2 Atividade de glutationa peroxidase**

A atividade da glutationa peroxidase (GPx) foi determinada com base no método proposto por PAGLIA; VALENTINE (1967) com alterações. O método se baseia na oxidação da glutationa reduzida, catalisada pela glutationa peroxidase, acoplada à reciclagem da glutationa oxidada através da reação catalisada pela enzima glutationa redutase, utilizando o NADPH como cofator. A atividade é mensurada através do decréscimo na absorvância a 340 nm durante a oxidação do NADPH, indicando a atividade da GPx. 100 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,0) contendo 1 mmol/L de EDTA, em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000 g, 4 °C durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado como amostra. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionadas 5  $\mu\text{L}$  de amostra, 75  $\mu\text{L}$  de tampão, 20  $\mu\text{L}$  de GSH 42 mmol/L e 50  $\mu\text{L}$  do mix composto por NADPH 2 mM, glutationa redutase 4 U/mL e azida sódica 40 mmol/L. Após 3 min foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 1 mmol/L, iniciando a reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em um leitor de microplaca (BioTek® - EUA) a 340 nm através da

realização de seis leituras, com intervalo de 10 s entre elas. A atividade da GPx foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Atividade da glutathiona peroxidase} = \frac{\Delta \text{ abs/min}}{\varepsilon} \times \frac{\text{volume da reação (mL)}}{\text{volume do amostra (mL)}}$$

Em que:

$\Delta \text{ abs/min}$  = diferença entre a absorbância inicial e final

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6,22 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ajustado para microplaca de 0,6 cm ( $3,73 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Cada unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima que promove a oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a 25 °C. Posteriormente foi realizada a correção pela concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY et al., 1951) e a atividade da GPx foi expressa em U/mg de proteína.

### 5. 9. 3 Atividade de glutathiona redutase

A determinação da atividade enzimática da glutathiona redutase (GR) foi baseada no método proposto por CARLBERG; MANNERVIK (1985). O ensaio consiste na redução da glutathiona oxidada pelo NADPH mediante a presença de glutathiona redutase. Resumidamente, 100 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol/L contendo 1 mmol/L de EDTA (pH 7,5), após centrifugação durante 10 min, 10.000 g à 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, adicionando em cada poço 60  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio, 100  $\mu\text{L}$  de GSSG 2 mmol/L e 10  $\mu\text{L}$  de amostra. Após a adição da solução de NADPH 2 mmol/L (Sigma-Aldrich® - EUA) a reação foi iniciada. A atividade da GR foi aferida através da redução da absorbância proveniente da oxidação do NADPH a 340 nm em leitor de microplaca (BioTek® - EUA). Foram realizadas 6 leituras em intervalos de 10 s e a atividade da enzima foi calculada pela equação abaixo:

$$\text{Atividade da glutathiona redutase} = \frac{\Delta \text{ abs/min}}{\varepsilon} \times \frac{\text{volume da reação (mL)}}{\text{volume do amostra (mL)}}$$



Em que:

$\Delta \text{ abs/min}$  = diferença entre a absorbância inicial e final

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar do NADPH ( $6,22 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ajustado para microplaca de  $0,6 \text{ cm}$  ( $3,73 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Os resultados foram expressos em unidade por mg de proteína (U/mg), onde uma unidade de glutathiona redutase é equivalente a decomposição de  $1 \mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente foi realizada a correção pela concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY et al., 1951).

#### 5. 9. 4 Atividade de glutathiona S-transferase

A determinação da atividade enzimática da glutathiona S-transferase fundamenta-se na mensuração da conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida, em que o aumento da absorbância é proporcional a quantidade de glutathiona S-transferase da amostra (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). Foram homogeneizados  $100 \text{ mg}$  de fígado em  $1 \text{ mL}$  de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol/L}$  com EDTA  $2 \text{ mmol/L}$  (pH  $7,0$ ), após centrifugação durante  $10 \text{ min}$ ,  $10.000 \text{ g}$  à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. Para dosagem, foram adicionados em um poço da microplaca  $150 \mu\text{L}$  de tampão fosfato  $100 \text{ mmol/L}$  contendo Triton X-100  $0,1 \%$  (pH  $6,5$ ),  $20 \mu\text{L}$  de glutathiona reduzida  $20 \text{ mmol/L}$  (Sigma-Aldrich® - EUA) em água destilada e  $20 \mu\text{L}$  de sobrenadante diluído. A reação foi iniciada com a adição de  $10 \mu\text{L}$  de CDNB (Sigma-Aldrich® - EUA)  $20 \text{ mmol/L}$  em etanol  $95 \%$ . O preparo do branco foi realizado seguindo os mesmos procedimentos com o tampão de ensaio em substituição da amostra. As absorbâncias foram lidas em leitor de microplaca (BioTek® - EUA) a  $340 \text{ nm}$ , a cada min durante  $5 \text{ min}$ . Para cálculo da atividade enzimática, utilizou-se o delta de absorbância por minuto na equação que se segue:

$$\text{Atividade da glutathiona S-transferase} = \frac{\Delta \text{ abs/min}}{\epsilon} \times \frac{\text{volume da reação (mL)}}{\text{volume do amostra (mL)}}$$

Em que:

$\Delta \text{ abs/min}$  = diferença entre a absorbância inicial e final

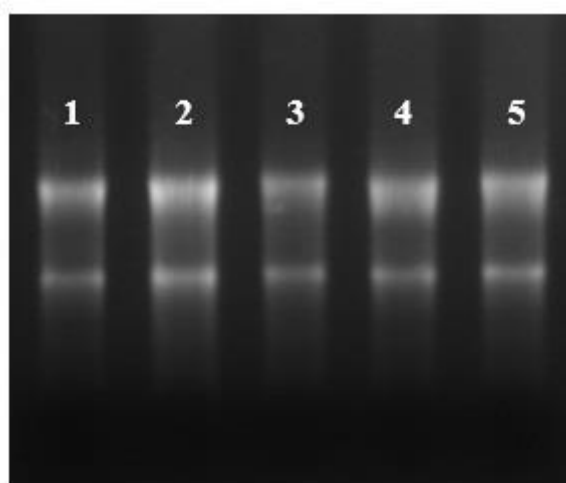
$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar do CDNB ( $0,0096 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ajustado para microplaca de  $0,6 \text{ cm}$  ( $0,00576 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Os resultados foram expressos em unidade por mg de proteína (U/mg), onde uma unidade de glutathiona S-transferase é equivalente conjugação de 1 nmol de CDNB com glutathiona reduzida por minuto a 25 °C. Posteriormente foi realizada a correção pela concentração de proteínas totais no sobrenadante (LOWRY et al., 1951).

## 5. 10 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real

### 5. 10. 1 Extração de RNA

O RNA total do fígado foi extraído utilizando o *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation® - EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração, pureza (razão 260/280) e contaminação (razão 260/230) do RNA total foram verificadas em espectrofotômetro *Nano Vue* (GE Healthcare® - UK), seguido de análise do RNA em gel de agarose a 1,2 % (FIGURA 8). As amostras com razão superior a 1,9 foram consideradas adequadas e utilizadas para síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).



**Figura 8** - Análise da integridade do RNA total em gel de agarose 1,2 % de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. O RNA total foi obtido a partir do fígado dos grupos Controle (1), Paracetamol (2), Açaí (3), Paracetamol + Açaí (4) e Paracetamol + Acetilcisteína (5).

### 5. 10. 2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems® - EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 µL de tampão 10 x, 0,8 µL da mistura de

desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 25 x (100 mmol/L), 2 µL de *primers* randômicos 10 x, 1 µL da enzima transcriptase reversa *MultiScribe* (50 U/µL) e 4,2 µL de água DEPC. A reação foi realizada nas condições de 10 min a 25°C, seguido de 2 h a 37 °C e 5 min a 85 °C no termociclador *Biocycler*® modelo MJ96+ e ao final da reação o cDNA apresentou a concentração igual a 50 ng/µL.

### 5. 10. 3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de mRNA de *Rattus norvegicus* depositadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o programa Primer-BLAST. O gene de referência endógeno utilizado foi o 18S e todas as sequências de oligonucleotídeos estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de qRT-PCR.

Genes	Sequências	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
rRNA 18S	GTAAGTGCGGGTCATAAG	CCATCCAATCGGTAGTAGC
GPx	CAGTTCGGACATCAGGAGAAT	AGAGCGGGTGAGCCTTCT
γGSC	ATCTGGATGATGCCAACGAGTC	CCTCCATTGGTCGGAACCTACT
CYP1A2	GACAAGACCCTGAGTGAGAAG	GAGGATGGCTAAGAAGAGGAAG
CYP2E1	GACCTTCCCTCTTCCCATCCTTG	GTAGCACCTCCTTGACAGCCTTG
BiP	ACCGTCGTATGTGGCCTTCACT	CATTCCAAGTGCCTCCGATGAGG
eIF2α	CACTTCAGAATGCCGGGTCT	AACAAGCTGACATAGGCCCC
GADD34	CACCTGCAAGGGGCAGATAA	ATAAGCCAGCTCGGACACAC
ATF4	GCAGTGTTGCTGTAACGGACA	TCGCTGTTTCAGGAAGCTCATC
CHOP	ATGGCAGCTGAGTCATTGCCTTTC	AGAAGCAGGGTCAAGAGTGGTGAA
Nrf2	CCCAGCACATCCAGACAGACA	GGCTGGGAATATCCAGGGCAA

rRNA 18S: ácido ribonucleico ribossomal 18S; GPx: glutationa peroxidase; γGCS: gama glutamilcisteína sintetase; CYP1A2: citocromo P450 1A2; CYP2E1: citocromo P450 2E1; BiP: *immunoglobulin heavy chain binding*; eIF2α: *alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2*; GADD34: *growth arrest and DNA damage 34*; ATF4: *activating transcription factor 4*; CHOP: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2.

#### 5. 10. 4 RT-PCR quantitativa em tempo real

Para a análise da expressão dos genes estudados foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems® - LTU). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, com volume final de reação de 12 µL, foram pipetados 1 µL de cDNA (50 ng), 0,48 µL de cada oligonucleotídeo iniciador de uso (*forward* e *reverse*, 10 µM), 6 µL de *SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems® - EUA) e 4,52 µL de água livre de DNase. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems® - EUA). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7500 Software* (Applied Biosystems® - EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica ( $C_T$  comparativo ou  $\Delta\Delta C_T$ ), permitindo a quantificação de diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência rRNA 18S e o grupo controle foi utilizado como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de  $C_T$  (*threshold cycle*), que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial do PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o  $\Delta C_T$  de cada amostra, de acordo com a equação, na qual o valor do  $C_T$  do gene controle endógeno foi subtraído do  $C_T$  do gene alvo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ do gene alvo} - C_T \text{ do gene de referência}$$

Em seguida, foram calculados os valores de  $\Delta\Delta C_T$ , onde o valor do  $\Delta C_T$  da amostra calibradora (grupo controle) foi subtraído do  $\Delta C_T$  das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ da amostra teste} - \Delta C_T \text{ da amostra controle}$$

Os valores do  $\Delta\Delta C_T$  obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . O método do  $C_T$  comparativo só deve ser utilizado quando a eficiência de amplificação do gene de referência e dos genes alvo são aproximadamente iguais. Este critério foi confirmado através da curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores.

### 5. 10. 5 Cálculo da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes alvo e do gene de controle endógeno, foram construídas curvas padrões para cada *amplicon*, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise da regressão linear dos valores de  $C_{Ts}$  em função do logaritmo da respectiva diluição determinou o coeficiente angular da reta ( $a$ , em  $y = ax + b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos oligonucleotídeos iniciadores, utilizando a equação.

$$Ef = (10^{-1/\text{coeficiente angular}} - 1) \times 100$$

### 5. 11 Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Posteriormente, os dados com distribuição paramétrica foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, e os resultados foram representados pela mediana e intervalo interquartil. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism®* versão 5.00 para *Windows* (San Diego, Califórnia - EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6. 1 Composição centesimal, concentração de polifenóis, capacidade antioxidante e antocianinas identificadas na polpa de açaí filtrada

Na Tabela 3 estão representadas a composição centesimal, fitoquímica e a capacidade antioxidante do açaí.

**Tabela 3** - Composição centesimal, conteúdo de polifenóis, antocianinas, flavonoides e capacidade antioxidante do açaí filtrado.

Nutrientes	Composição (g/100 g)
Umidade	98,45 ± 0,01
Lipídios	1,98 ± 0,41
Cinzas	0,17 ± 0,02
Proteínas	0,10 ± 0,01
Fibra alimentar total	ns
Carboidratos	ns
Valor calórico total (Kcal)	18,22
Compostos	Concentração
Capacidade antioxidante (µmol TEAC/g)	9,50 ± 0,28
Flavonoides totais (mg/100g)	7,41 ± 0,03
Polifenóis totais (mg GAE/100g)	344,00 ± 3,64
Antocianinas totais (mg/100g)	9,62 ± 0,48

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média

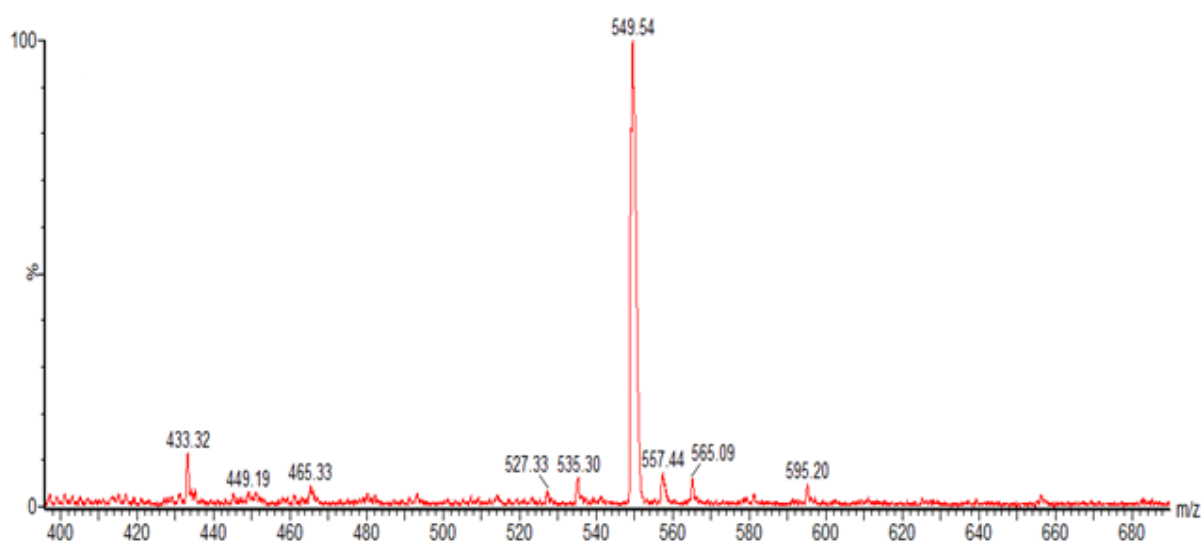
ns = valores não significativos

TEAC: capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox

GAE: equivalentes de ácido gálico

O resultado mostrado na Figura 9 corresponde ao espectro de massas da polpa de açaí (*FullScan*). A partir da cromatografia líquida de ultra eficiência foram detectados picos, os quais foram identificados a partir da relação massa/carga das substâncias e dos espectros de absorção UV. Os espectros de massas e de UV foram comparados com dados inseridos no banco de dados PubChem e essas substâncias foram identificadas como antocianinas, sendo compatíveis com as estruturas moleculares para as cianidinas (cianidina-3,2-hexose pentose e

cianidina-3-rutinosídeo), delphinidinas (delphinidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-ramnosídeo e delphinidina-3-pentose) e peonidina-3,6-malonil-glicosídeo (TABELA 4 e FIGURA 10). Nesse tipo de análise, a formação de picos corresponde com a presença de grupos ionizáveis, e não com a quantidade da substância na amostra.

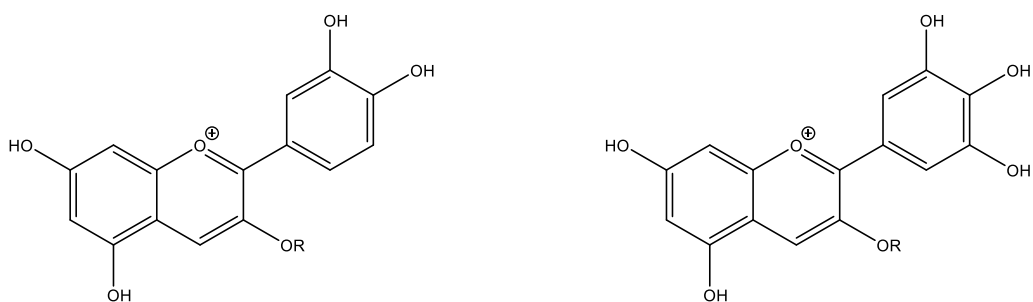
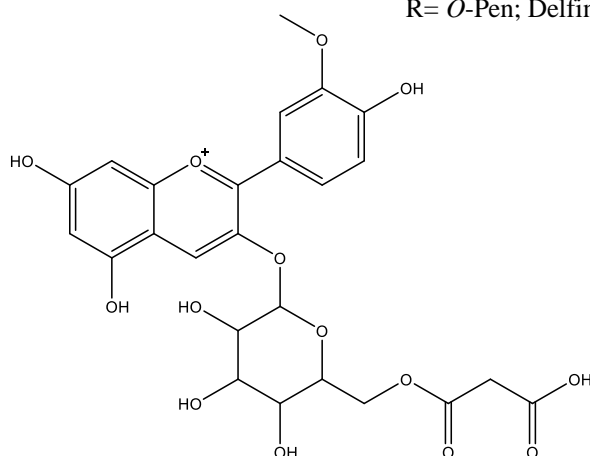


**Figura 9** - Espectro de massas da polpa de açai obtido por UPLC-DAD-ESI-MS.

**Tabela 4** – Antocianinas identificados na polpa de açai obtidas por UPLC-DAD-ESI-MS.

Substância	TR (min)	UV (nm)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS/MS
Cianidina-3,2-hexose pentose	2,53	279	563,23	565,09	287,0; 246,3
Cianidina-3-rutinosídeo	2,68	280	593,44	595,20	287,3
Delphinidina-3-glicosídeo	2,78	280	463,17	465,33	303,0; 262,4
Delphinidina-3-ramnosídeo	2,83	281	447,36	449,19	303,1; 261,4; 184,3
Delphinidina-3-pentose	3,35	279	431,23	433,32	303,3; 261,1
Peonidina-3,6-malonil-glicosídeo	2,85	280	549,54	547,25	449,4; 301,9; 261,4; 168,4

TR: tempo de retenção; [M+H]<sup>+</sup>: relação massa/carga no modo positivo; [M-H]<sup>-</sup>: relação massa/carga no modo negativo; MS/MS: massa segunda.

*Cianidina*R= *O*-Gli-Pen; Cianidina-3,2-hexose pentoseR= *O*-Gli-Ram; Cianidina-3-rutinosídeo*Delphinidina*R= *O*-Gli; Delphinidina-3-glicosídeoR= *O*-Ram; Delphinidina-3-ramnosídeoR= *O*-Pen; Delphinidina-3-pentose*Peonidina-3,6-malonil-glicosídeo***Figura 10** – Estruturas moleculares das antocianinas identificadas na polpa de açaí.**6. 2 Parâmetros biométricos e metabólitos séricos indicadores da função hepática**

Em relação a massa corporal inicial e massa final, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos durante o período experimental. A intoxicação com paracetamol promoveu aumento da massa do fígado comparados ao grupo C e os pré-tratamentos com o açaí e a acetilcisteína não alteraram esse perfil (TABELA 5).

Quanto aos metabólitos avaliados, o pré-tratamento com acetilcisteína promoveu aumento da concentração de albumina quando comparado ao grupo P. Ao determinar as globulinas, observamos que houve aumento das concentrações dessa proteína no grupo PA em relação ao grupo P. A concentração de proteínas totais não apresentou diferença entre os grupos.



**Tabela 5** – Variáveis biométricas e metabólitos séricos em ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol.

Variáveis	Grupos experimentais				
	C	A	P	PA	PNac
Massa corporal inicial (g)	174,30 ± 2,64	174,10 ± 2,54	173,50 ± 3,17	169,70 ± 1,20	174,0 ± 2,734
Massa corporal final (g)	163,90 ± 3,08	159,90 ± 1,60	163,50 ± 2,46	159,00 ± 2,25	164,50 ± 2,52
Massa do fígado (g)	5,18 ± 0,13 <sup>b</sup>	5,69 ± 0,21 <sup>ab</sup>	5,78 ± 0,07 <sup>ab</sup>	6,09 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,19 ± 0,17 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g/dL)	6,55 ± 0,12	6,63 ± 0,14	6,38 ± 0,18	6,96 ± 0,15	6,84 ± 0,17
Albumina (g/dL)	2,21 (2,16/2,38) <sup>b</sup>	2,37 (2,07/2,73) <sup>ab</sup>	2,34 (2,24/2,49) <sup>b</sup>	2,52 (2,39/2,54) <sup>ab</sup>	2,78 (2,61/2,83) <sup>a</sup>
Globulinas (g/dL)	4,20 ± 0,11 <sup>ab</sup>	4,39 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,14 <sup>b</sup>	4,38 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,19 ± 0,17 <sup>ab</sup>

Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Dados são apresentados como média ± erro padrão da média e como mediana e intervalo interquartil (n = 8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### 6. 3 Atividade das aminotransaminases

As atividades séricas de ALT e AST são usadas como indicadores séricos de dano hepático provocado pela intoxicação com paracetamol, assim determinamos as atividades das enzimas e a relação entre elas nos cinco grupos. O grupo P apresentou maior atividade de ALT, quando comparados ao grupo C; e os pré-tratamentos com açaí e com acetilcisteína não promoveram quaisquer alterações da atividade dessa enzima comparado ao grupo P. Ao avaliar a atividade da AST observamos que não houve alteração dessa variável no grupo P, em contrapartida, a sua atividade apresentou aumento de 41 % no grupo PA. Observamos ainda que, diferentemente do perfil da enzima ALT, o grupo PNac apresentou atividade da AST similar ao grupo C. Para a relação AST/ALT não houve diferenças significativas entre os grupos (TABELA 6).

**Tabela 6** – Atividade sérica da AST, ALT e relação AST/ALT em ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol.

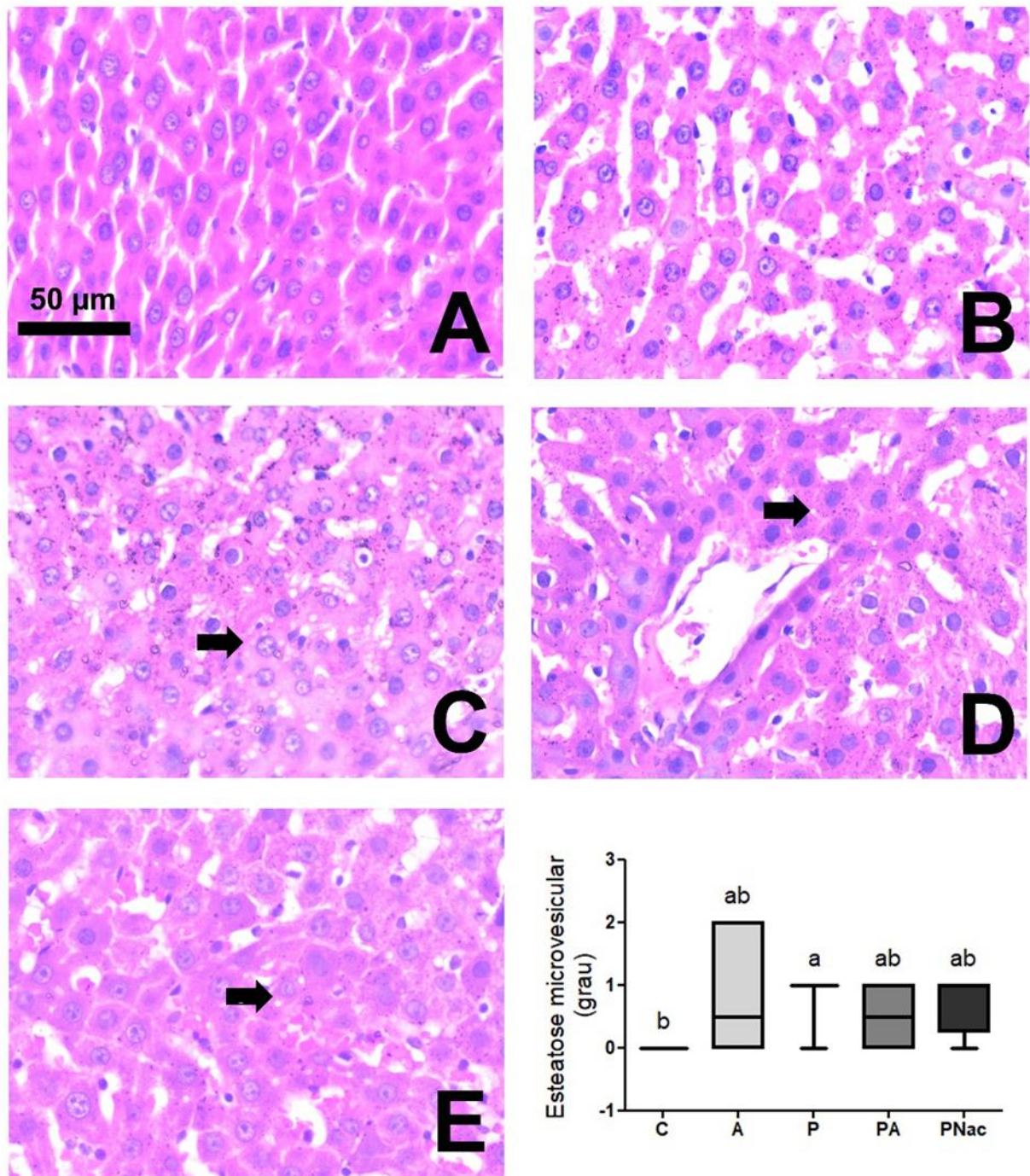
Variáveis	Grupos experimentais				
	C	A	P	PA	PNac
AST (U/mL)	87,59 ± 2,56 <sup>b</sup>	110,40 ± 8,40 <sup>b</sup>	100,50 ± 5,77 <sup>b</sup>	142,40 ± 6,32 <sup>a</sup>	101,30 ± 4,33 <sup>b</sup>
ALT (U/mL)	39,82 ± 2,58 <sup>c</sup>	41,27 ± 2,22 <sup>bc</sup>	50,08 ± 3,38 <sup>ab</sup>	59,35 ± 2,44 <sup>a</sup>	51,54 ± 2,56 <sup>ab</sup>
Relação AST/ALT	2,19 ± 0,07	2,00 ± 0,18	2,22 ± 0,12	2,35 ± 0,09	1,98 ± 0,11

Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média ± erro padrão da média (n = 8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

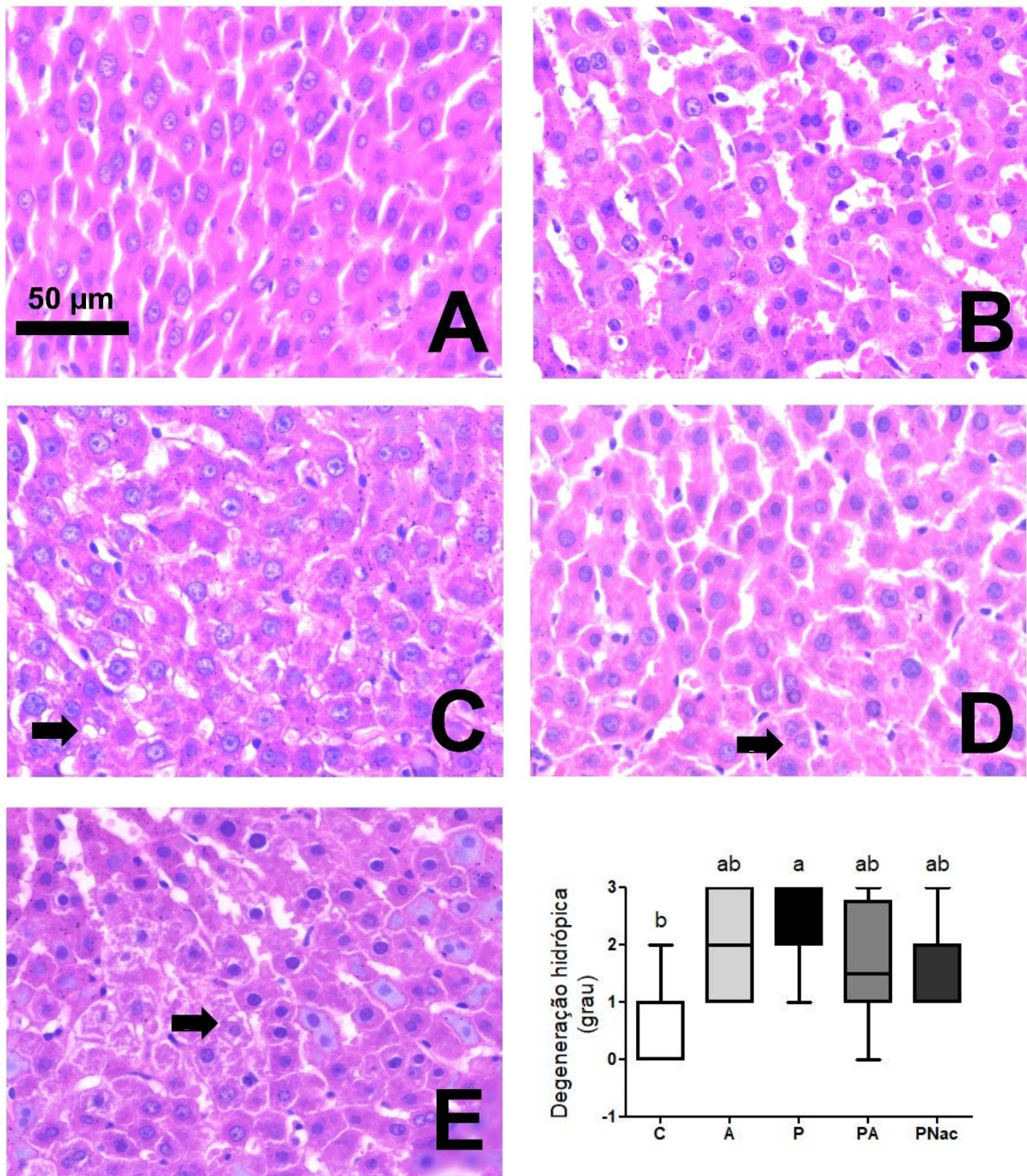
#### 6. 4 Análise histológica do fígado

Os efeitos bioquímicos da intoxicação com paracetamol devem ser confirmados por análises histológicas, assim avaliamos a presença de esteatose microvesicular e degeneração hidrópica, área de necrose e contagem de células inflamatórias no fígado. Como pode ser observado na Figura 11, o grupo paracetamol apresentou esteatose microvesicular, fato que não ocorreu no grupo controle. Os grupos A, PA e PNac apresentaram *scores* intermediários entre ausência de esteatose e grau 1. Quanto a classificação de degeneração hidrópica, observamos a mesma relação descrita para esteatose microvesicular (FIGURA 12).

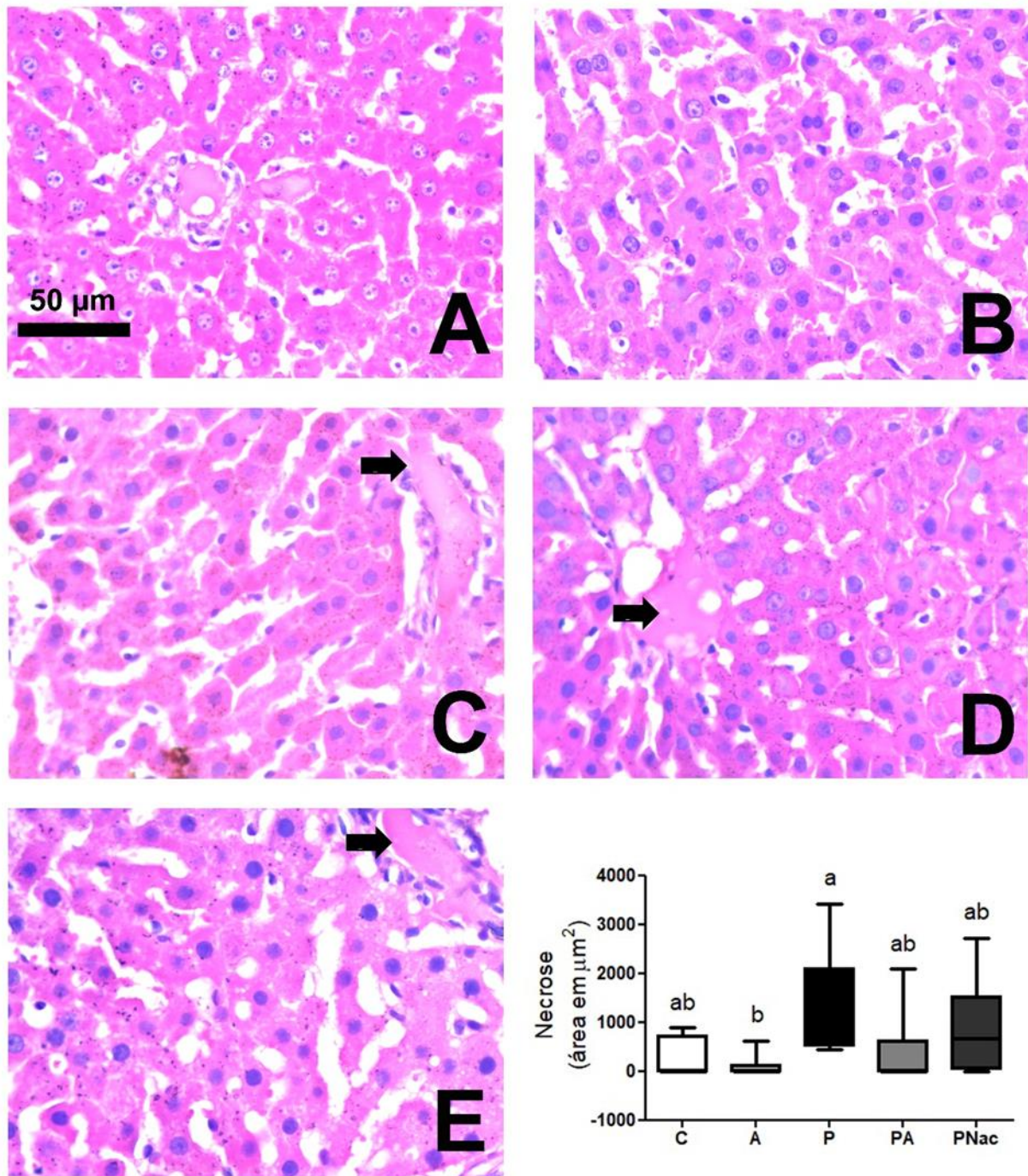
A determinação da área de necrose demonstra que a extensão do dano tecidual foi semelhante nos grupos avaliados, no entanto o pré-tratamento com polpa de açaí parece ser um fator protetor, garantindo assim que o grupo A apresente menor área de necrose comparado ao grupo P (FIGURA 13). Observamos ainda que a quantificação de células inflamatórias foi superior no grupo P comparado aos grupos C e A. O pré-tratamento com açaí também promoveu menor influência desse processo inflamatório do grupo PA, assemelhando-se ao grupo controle. A administração prévia de acetilcisteína não promoveu diferenças estatísticas entre o grupo P, C e PNac (FIGURA 14).



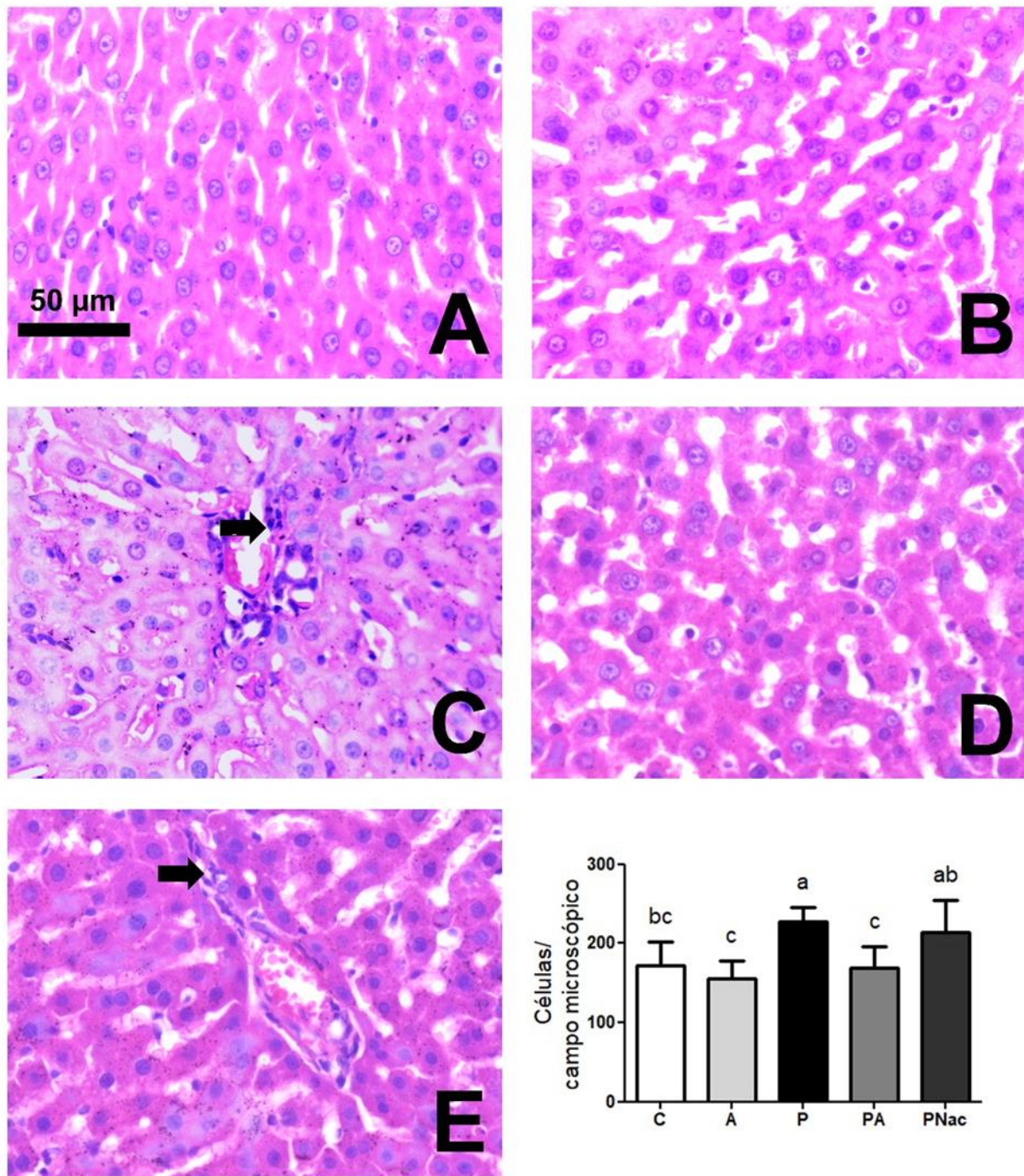
**Figura 11** - Fotomicrografias representativas e análise semiquantitativa da esteatose microvesicular em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Painel A - grupo Controle; painel B - grupo Açaí; painel C - grupo Paracetamol; painel D - grupo Paracetamol + Açaí; painel E - grupo Paracetamol + Acetilcisteína. Barra = 50 µm. Aumento = 440 x. Setas pretas indicam esteatose microvesicular. Foram realizados os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (n = 8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12** - Fotomicrografias representativas e análise semiquantitativa da degeneração hidrópica em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Painel A - grupo Controle; painel B - grupo Açai; painel C - grupo Paracetamol; painel D - grupo Paracetamol + Açai; painel E - grupo Paracetamol + Acetilcisteína. Barra = 50  $\mu$ m. Aumento = 440 x. Setas pretas indicam degeneração hidrópica. Foram realizados os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13** - Fotomicrografias representativas e análise quantitativa da necrose em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Painel A - grupo Controle; painel B - grupo Açai; painel C - grupo Paracetamol; painel D - grupo Paracetamol + Açai; painel E - grupo Paracetamol + Acetilcisteína. Barra = 50 µm. Aumento = 440 x. Setas pretas indicam necrose. Foram realizados os testes de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (n = 8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

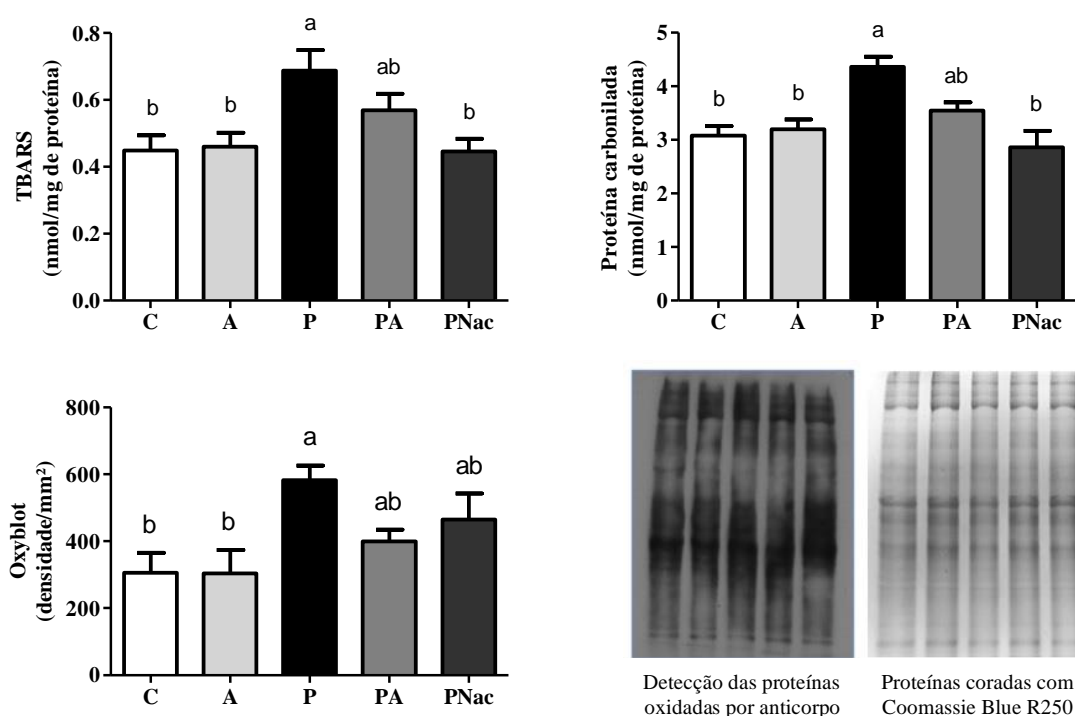


**Figura 14** - Fotomicrografias representativas e análise quantitativa de células/campo microscópico em cortes histológicos do fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Painel A - grupo Controle; painel B - grupo Açai; painel C - grupo Paracetamol; painel D - grupo Paracetamol + Açai; painel E - grupo Paracetamol + Acetilcisteína. Barra = 50 µm. Aumento = 440 x. Setas pretas indicam células inflamatórias. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey (n = 8). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6. 5 Marcadores de dano oxidativo hepático: peroxidação lipídica e carbonilação proteica

Uma vez que as análises histológicas demonstraram o efeito do paracetamol sobre a arquitetura celular e sabendo que essa desarmonização tem relação com o desequilíbrio redox promovido pelo estresse oxidativo, os marcadores de danos proteicos e lipídicos foram avaliados.

A intoxicação com o paracetamol promoveu aumento do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de proteínas carboniladas. O pré-tratamento com polpa de açaí possibilitou que o grupo PA apresentasse similaridade com comportamento dos grupos Controle e Paracetamol, sugerindo que o açaí está associado ao paracetamol promove uma tendência em minimizar o dano hepático promovido pelo fármaco. Em contraste com a peroxidação lipídica e proteínas carboniladas, que indicaram que a acetilcisteína foi capaz de impedir os danos hepáticos, o ensaio de Oxyblot demonstrou que o grupo PNac apresentou capacidade oxidativa semelhante ao grupo P (FIGURA 15).



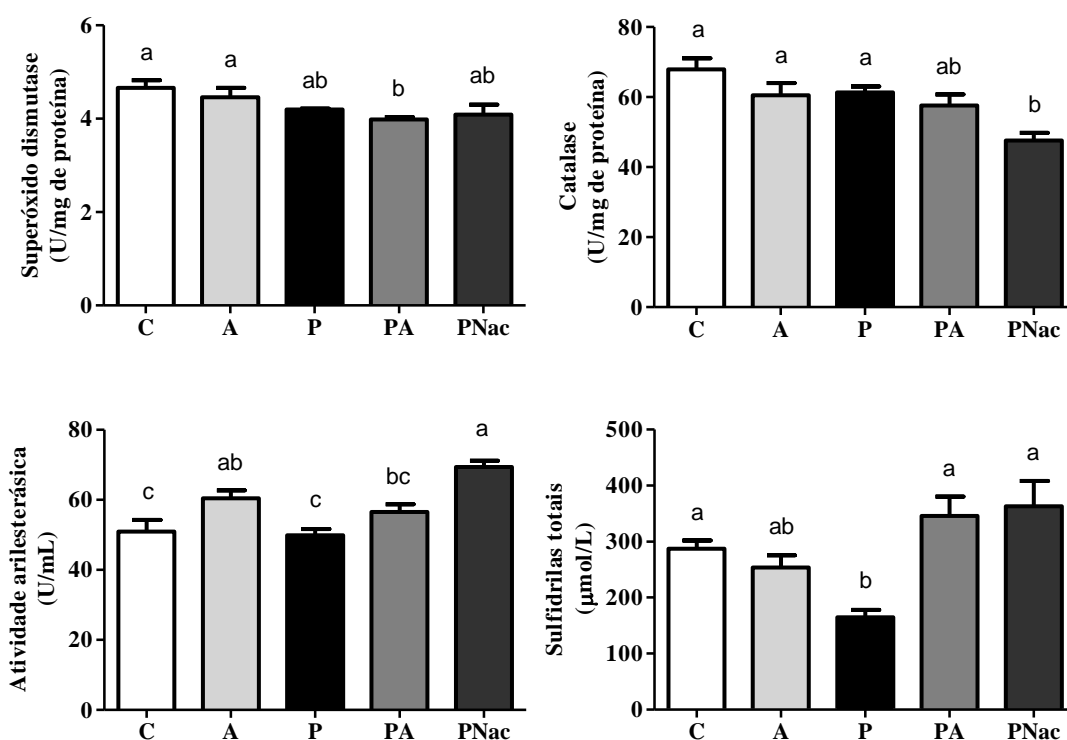
**Figura 15** - Concentrações de TBARS e proteínas carboniladas em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6. 6 Comportamento das enzimas antioxidantes hepáticas e séricas

Visto os resultados sobre o dano oxidativo, nosso próximo passo foi investigar se enzimas e compostos antioxidantes poderiam ser responsáveis por estas alterações. A intoxicação com paracetamol não promoveu diferenças na atividade enzimática da SOD comparada ao grupo controle e aos demais grupos, sendo apenas observada redução na atividade dessa enzima quando comparamos os grupos C e PA. A redução da atividade enzimática da catalase foi observada no grupo pré-tratado com acetilcisteína em relação aos grupos C e P (FIGURA 16).

A atividade antioxidante foi avaliada também pela atividade sérica da enzima paraoxonase. A atividade arilesterásica da PON foi mensurada através do substrato fenilacetato e encontramos aumento no grupo A comparado ao grupo C e também maior atividade no grupo PNaC comparado aos grupos P e PA. Considerando as concentrações de sulfidrilas totais no soro observamos redução no grupo P, mediante os pré-tratamentos com açai e acetilcisteína o conteúdo dos grupos tióis foram aumentados, apresentando similaridade com o grupo controle.

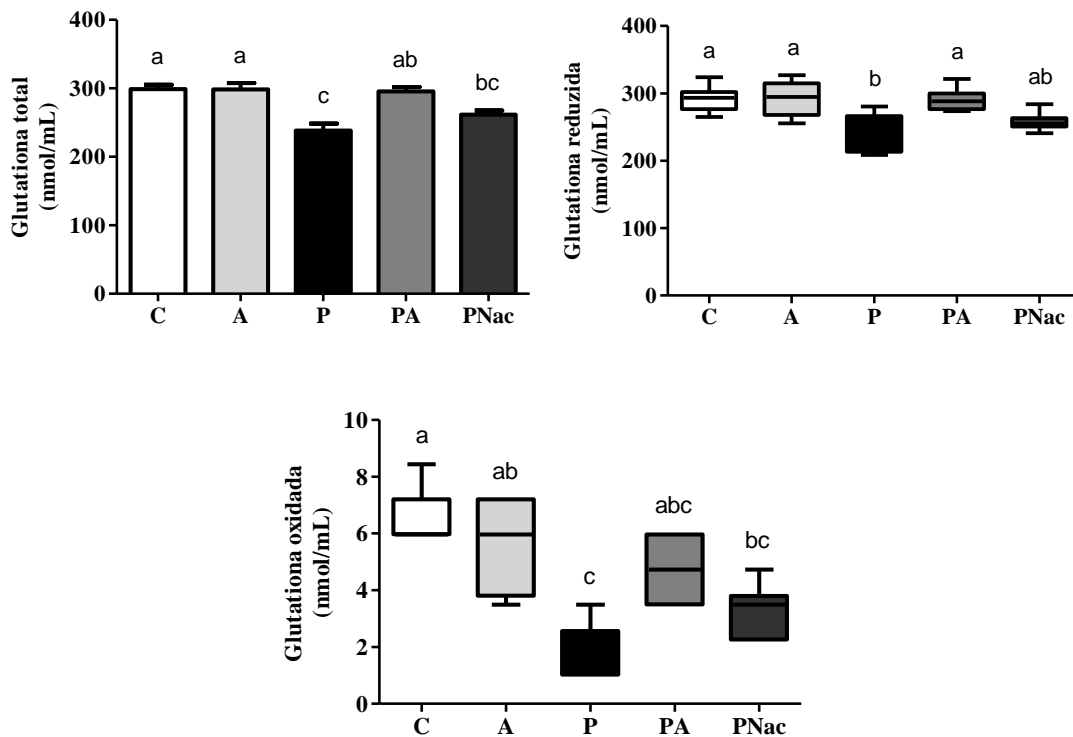




**Figura 16** – Atividade hepática da superóxido dismutase, catalase, atividade sérica da paraoxonase arilesterásica e conteúdo de sulfidrila totais de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6.7 Sistema glutathiona

A redução de grupos tióis pode ocorrer em decorrência do estresse oxidativo e esses grupos são também encontrados na glutathiona. Além disso, sabendo que a glutathiona exerce um importante papel na depuração do NAPQI formado pelo metabolismo de fase I, avaliamos se a polpa de açaí poderia promover alguma alteração no sistema glutathiona mediante a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol. Na Figura 17 é possível observar que as concentrações de glutathiona total, GSSG e GSH apresentaram diminuição quando as ratas foram intoxicadas com o paracetamol e o pré-tratamento com polpa de açaí promoveu restauração da glutathiona total e de sua fração reduzida.



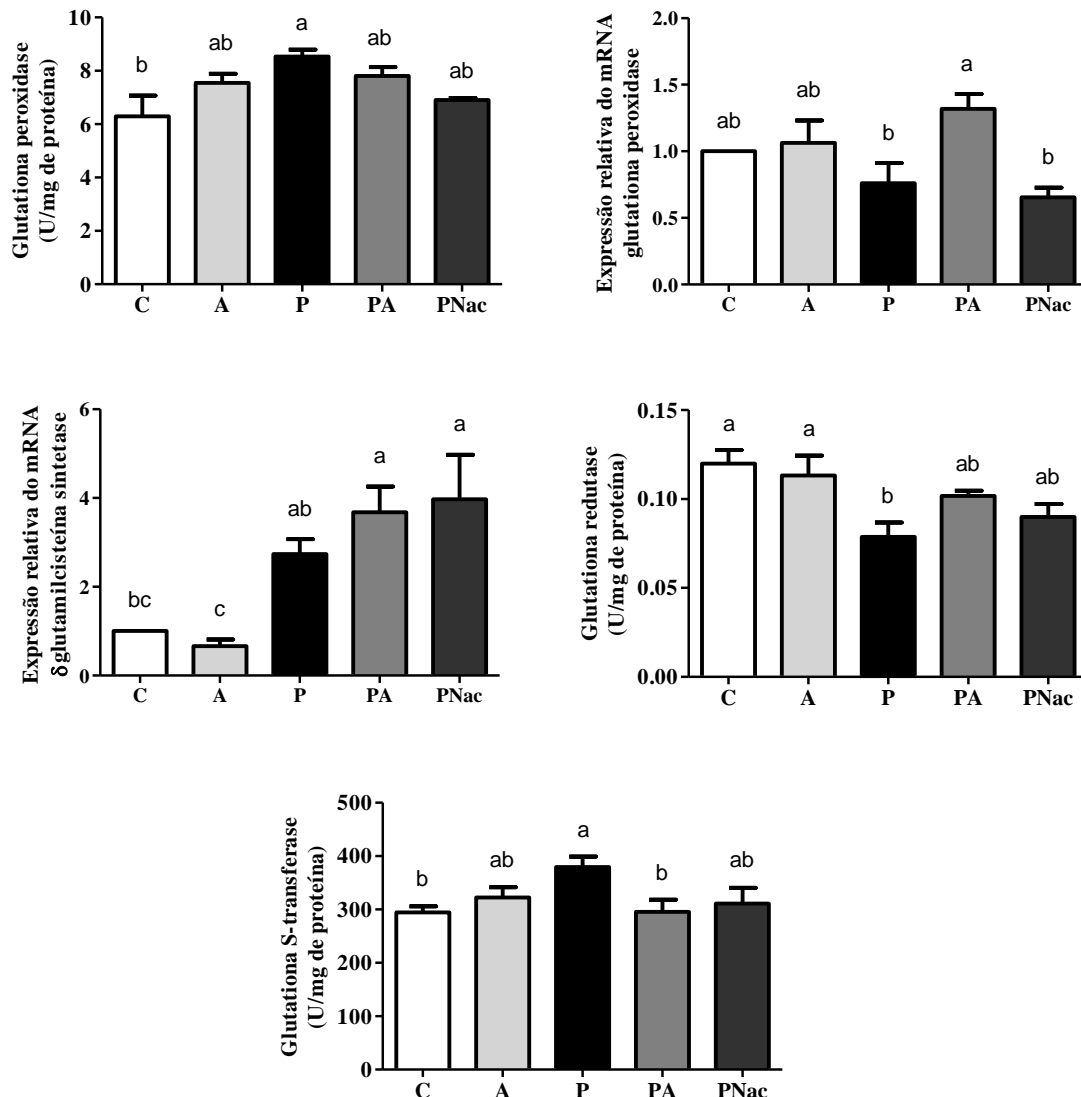
**Figura 17** – Representação de concentração de glutathione total, reduzida e oxidada em fígado de ratos submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e como mediana e intervalo interquartil ( $n = 8$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Avaliando as atividades de algumas enzimas do sistema glutathione (FIGURA 18), observamos o aumento da atividade da glutathione peroxidase no grupo P e a similaridade que os grupos PA e PNac obtiveram com o grupo C e o grupo P. Diante dos achados relacionados com as glutathiones, nós questionamos se essas variações ocorreram devido as alterações na expressão gênica de GPx e  $\gamma$ GCS no fígado.

Quanto a expressão do mRNA da GPx, não foi observada diferença entre os grupos C e P, no entanto o tratamento prévio com açaí promoveu um aumento de 1,7 vezes nos níveis de expressão de glutathione peroxidase no grupo PA. O pré-tratamento com acetilcisteína não foi capaz de alterar a expressão desse gene comparado ao grupo P. Ainda em relação à glutathione peroxidase observamos que o grupo P apresentou aumento da sua atividade, sem que os demais grupos apresentassem diferenças.

Não houve diferenças entre os grupos P, PA e PNac, demonstrando que a expressão gênica da  $\gamma$ GCS manteve-se constante independente de ter ou não tratamento prévio à

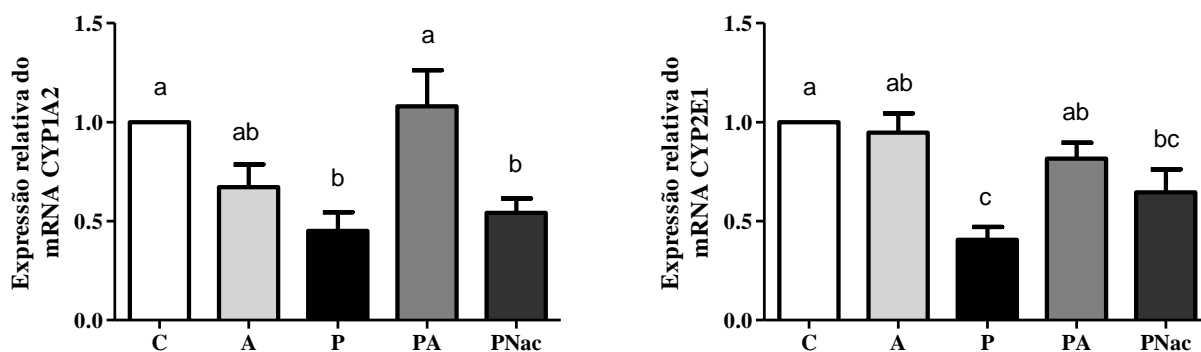
intoxicação com paracetamol. A atividade da GR apresentou redução de 34 % no grupo P comparado ao grupo C, não sendo encontradas diferenças entre o grupo P e os grupos previamente tratados com açaí e acetilcisteína. A glutathione S-transferase apresentou maior atividade enzimática no grupo P e diminuição de 25 % no grupo PA. A determinação das glutathione redutase e S-transferase mostraram que o grupo PNac obtiveram atividade enzimática similar aos grupos C e P.



**Figura 18** – Representação da atividade e expressão gênica do sistema glutathione em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$  para análise da expressão gênica e  $n = 8$  para as demais dosagens). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## 6. 8 Expressão de genes envolvidos no metabolismo do paracetamol

Os genes CYP1A2 e CYP2E1 estão relacionados com o metabolismo do paracetamol, uma vez que diante do excesso do fármaco há estímulo da ativação do metabolismo de fase I através do citocromo P450. A CYP1A2 apresentou redução da sua expressão nas ratas do grupo P, em contrapartida, o pré-tratamento com açaí possibilitou maior expressão desse gene. A administração prévia de acetilcisteína não promoveu alteração da expressão gênica da CYP1A2 quando comparado ao grupo P. A administração de paracetamol promoveu redução na expressão da CYP2E1, cuja redução não foi observada quando o açaí foi administrado anteriormente. O grupo PNaC não apresentou diferença em relação aos grupos P e PA (FIGURA 19).



**Figura 19** – Expressão relativa de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo do paracetamol em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNaC - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). CYP1A2: citocromo P450 1A2; CYP2E1: citocromo P450 2E1.

## 6. 9 Expressão de genes relacionados à resposta ao estresse do retículo endoplasmático

Uma vez verificada que a associação entre açaí e paracetamol promoveu modulação da glutathiona tanto em sua concentração, atividade e expressão de genes, e sabendo que a intoxicação com paracetamol induz estresse do retículo endoplasmático, sendo que dentre as três vias da UPR há envolvimento principalmente na cascata de sinalização mediada pela PERK (UZI et al., 2013), decidimos investigar a expressão dos genes desta via (FIGURA 20).

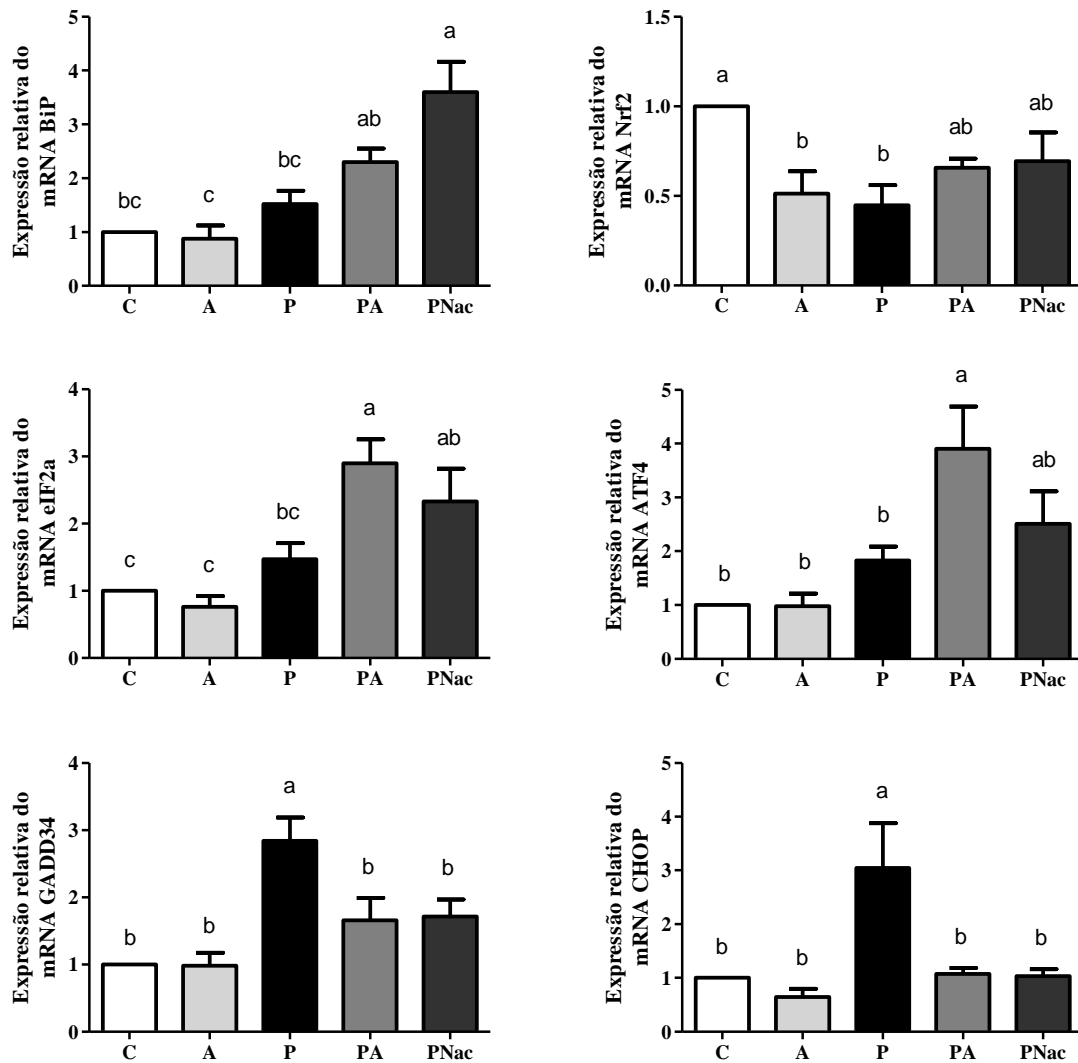
A PERK é dissociada da BiP, desencadeando outros estímulos na via. A expressão gênica da BiP não foi alterada pela intoxicação com o paracetamol, observamos efeito da

acetilcisteína no aumento da expressão desse gene em relação ao grupo P. Outro gene da via da PERK estudado foi o eIF2 $\alpha$ , conforme pode ser observado, as ratas pré-tratadas com o açáí e posteriormente intoxicadas com paracetamol apresentaram um aumento aproximado de 1,9 vezes na expressão do mRNA de eIF2 $\alpha$  quando comparado ao grupo P. Perfil semelhante a este foi verificado também para ATF4, no entanto a expressão desse gene no grupo PA foi 2,1 vezes superior ao grupo paracetamol.

Tanto na expressão gênica de eIF2 $\alpha$  como de ATF4, o grupo PNaC apresentou expressão de mRNA intermediária aos grupos P e PA. O paracetamol promoveu maior expressão da GADD34, podendo observar que os pré-tratamentos com açáí e com acetilcisteína foram similares ao grupo controle.

Devido ao seu potencial apoptótico, a CHOP é considerada um dos principais reguladores do estresse do retículo no modelo de intoxicação com paracetamol, uma vez que foi relatada que sua *up-regulation* compromete a sobrevivência do hepatócito por diversos mecanismos, dentre eles reduzindo a regeneração após o dano hepático (UZI et al., 2013). Nesse trabalho, verificamos que a intoxicação com paracetamol promoveu aumento de 3 vezes na expressão gênica da CHOP em relação ao controle, e os grupos PA e PNaC obtiveram expressão semelhante ao grupo C.

A dissociação entre BiP e PERK estimula a ação do Nrf2 e sua expressão gênica está envolvida na resposta antioxidante. De acordo com nossos resultados, a expressão de mRNA da Nrf2 foi diminuída nos grupos A e P em relação ao grupo controle. Os grupos PA e PNaC apresentaram expressões gênicas similares aos grupos C e P.



**Figura 20** – Expressão relativa de mRNA dos genes da via da PERK em fígado de ratas submetidas a diferentes pré-tratamentos e intoxicadas ou não com paracetamol. Grupos: C - Controle; A - Açaí; P - Paracetamol; PA - Paracetamol + Açaí; PNac - Paracetamol + Acetilcisteína. Foram realizados os testes ANOVA *one-way* seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). BiP: *immunoglobulin heavy chain binding*; eIF2 $\alpha$ : *alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2*; GADD34: *growth arrest and DNA damage 34*; ATF4: *activating transcription factor 4*; CHOP: *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein*; Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2.

## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que o açaí administrado anteriormente à indução da hepatotoxicidade via paracetamol reduziu o número de células inflamatórias, restaurou o sistema glutatona e minimizou o estresse do retículo endoplasmático, em especial com menor expressão gênica da CHOP. Além disso, foi observado que o metabolismo de fase I de detoxificação manteve-se preservado.

A adição do grupo P<sub>N</sub>ac neste trabalho não teve como objetivo discutir as diferenças entre as vias envolvidas no pré-tratamento com o fruto ou com a acetilcisteína, a intenção para tal consistiu na observação sobre o comportamento desse fármaco quando administrado nas mesmas condições que o nosso objeto de estudo: o açaí. Desse modo, a discussão não foi conduzida analisando os efeitos da administração de acetilcisteína, pois diversos estudos já elucidaram seus efeitos no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.

A polpa de açaí foi utilizada após filtração e possui 98 % de água em sua composição centesimal. Embora GUERRA et al. (2015) e PEREIRA et al. (2016) já tenham descrito anteriormente, uma nova análise do perfil fitoquímico foi realizada considerando as variações que podem ocorrer. A época de colheita, grau de maturação, processamento e armazenamento são fatores responsáveis por essa variação, principalmente quando são considerados os compostos fitoquímicos que apresentam grande sensibilidade conforme apontado por ODENDAAL; SCHAUSS (2014).

O teor de polifenóis totais da amostra utilizada foi de 344 mg GAE/100g, este resultado se assemelha ao encontrado por SILVA et al. (2017) que encontraram 346,14 mg GAE/100g de polifenóis totais na polpa de açaí. Em relação às antocianinas e flavonoides totais, encontramos em nossa amostra o equivalente a 9,62 mg/100g e 7,41 mg/100g, respectivamente, trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram valores aproximados dessas substâncias utilizando a polpa de açaí da mesma marca (GUERRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Com relação à capacidade antioxidante, nossa amostra apresentou 9,50  $\mu$ mol/L TEAC/g enquanto o açaí liofilizado apresentou 104,80  $\mu$ mol/L TEAC/g (CARVALHO et al., 2018), essa diferença pode ser explicada pelos teores de água dos produtos.

Estudos prévios identificaram as antocianinas aqui descritas, que ao serem quantificadas, foi demonstrado que a cianidina-3-rutinosídeo predomina dentre as demais antocianinas (DE ROSSO et al., 2008; GOUVÊA et al., 2012; GUERRA et al., 2015). Em relação às classes de delphinidinas e peonidinas não foram encontrados estudos quantitativos, porém FIBIGR; ŠATÍNSKÝ; SOLICH (2017) identificaram delphinidina-3-galactosídeo,

delfinidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-rutinosídeo e peonidin-3-glicosídeo em amostras de extrato de açaí.

A utilização de compostos derivados de plantas, extratos vegetais e componentes fitoquímicos como estratégias terapêuticas já é conhecida há algum tempo (SUBRAMANYA et al., 2018). O estudo com antocianinas isoladas de *Hibiscus sabdariffa* mostrou através da histologia hepática e de marcadores bioquímicos que os danos induzidos pelo paracetamol foram amenizados (ALI; MOUSA; EL-MOUGY, 2003). Sendo assim, o conteúdo de antocianinas e outros componentes indicam que a polpa de açaí possa atenuar os danos causados pelo paracetamol.

O metabolismo do paracetamol pode ser considerado o ponto inicial para o estudo de possíveis efeitos de compostos sobre a hepatotoxicidade. Nesse sentido, nós examinamos a expressão gênica de CYP1A2 e CYP2E1, componentes do citocromo P450 que estão envolvidos na conversão de paracetamol em NAPQI, conhecido pelo seu papel na toxicidade hepática. Os resultados mostram que houve menor expressão de CYP1A2 e CYP2E1 mediante a administração de dose única de paracetamol e observamos que o pré-tratamento com açaí possibilitou que as expressões desses genes não fossem alteradas em relação ao grupo C.

Estudos demonstraram que a expressão gênica, o conteúdo proteico e a atividade da CYP2E1 foram aumentadas nos grupos que receberam paracetamol em relação aos grupos controle. É válido ressaltar que nesses estudos os animais (ratos Wistar e camundongos C57BL6/J) foram eutanasiados em diferentes tempos pós-indução da hepatotoxicidade via paracetamol (24 e 40 h) (KIM et al., 2013; BAALI et al., 2016).

GILL et al. (2017) realizaram uma avaliação temporal do comportamento da expressão de mRNA de isoformas da CYP de células HepaRG (linhagem celular derivada de um carcinoma hepatocelular humano) e observaram a *down-regulation* da expressão gênica das CYP1A2 e CYP2E1 mediante o tratamento com 20 mmol/L de paracetamol, o que não ocorreu com a concentração de 5 mmol/L. Segundo os autores, microRNAs promovem uma resposta regulatória na toxicidade do paracetamol, uma vez que o aumento dos miRNA-122-5p e miRNA-378a-5p que acompanha a maior formação de adutos de NAPQI, estão relacionados com a redução da atividade da ALT e expressão das CYP1A2 e CYP2E1, buscando amenizar o dano hepático.

Embora a expressão de genes não tenha uma relação direta com o conteúdo de proteínas sintetizadas, e ainda com seu efeito biológico, o aumento da expressão gênica de CYP1A2 e CYP2E1 encontrada no grupo PA pode sugerir que a via de fase I esteja preservada, possivelmente devido à redução da concentração de adutos de NAPQI (não determinadas nesse



estudo) podendo ter associação com a maior eficiência das enzimas da fase II SULT e UGT em neutralizar o fármaco (não determinadas nesse estudo) ou com a maior capacidade do sistema glutationa em neutralizar e excretar os conjugados.

O desequilíbrio entre a diminuição das defesas antioxidantes e o aumento da produção de ERO geradas por condições biológicas e por atores exógenos caracterizam o estresse oxidativo (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014). Durante o metabolismo de paracetamol as ERO são geradas pelo citocromo P450 resultando em maciça peroxidação lipídica. A formação excessiva de NAPQI promove a depleção da GSH, formação de adutos de proteína mitocondriais induzindo sua disfunção, e consequente interferência na funcionalidade da cadeia transportadora de elétrons, intensificando o estresse oxidativo inicial. Dessa forma, os antioxidantes podem ser agentes terapêuticos viáveis contra hepatotoxicidade induzida por overdose de APAP (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteínas carboniladas são produtos do estresse oxidativo considerados marcadores indiretos de injúria oxidativa no fígado (BEAL, 2002). Em relação a peroxidação lipídica, as espécies reativas reagem com os ácidos graxos poli-insaturados, podendo resultar na lise das membranas celulares e formação dos produtos malondialdeído e 4-hidroxinonenal, cuja reação com o ácido tiobarbitúrico é utilizada para sua quantificação (POLI; BIASI; LEONARDUZZI, 2008).

Assim como em outros estudos foi observado o aumento de TBARS no grupo P, em adição, o tratamento prévio com o açaí não alterou esse comportamento. Segundo estudos, a eficácia na recuperação após a intoxicação com paracetamol depende de fatores como a dose da substância terapêutica ofertada e o tempo de indução da hepatotoxicidade. O pré-tratamento com *Morinda lucida*, *Garcinia mangostana*, *Schisandra chinensis* e betaína foram eficazes em reduzir as concentrações de TBARS, sendo observado que maiores doses resultavam em mais similaridade com os respectivos grupos controles (FOGHA et al., 2015; FU et al., 2018; KHODAYAR et al., 2018; YAN-ZI et al., 2018). No entanto, EL-BAKRY; EL-SHERIF; ROSTOM (2017) demonstraram que a continuidade da indução da hepatotoxicidade, mesmo mediante um período de pré-tratamento mais extenso, além de não promover melhora nesse marcador de dano oxidativo, atuou aumentando o dano hepático avaliado pelas transaminases séricas ALT e AST.

A carbonilação proteica pode acontecer a partir da reação entre proteínas e radicais livres gerados pelo estresse oxidativo. Essas modificações ocorrem por reações de oxidação catalisadas por metais ou quando as proteínas são modificadas por moléculas geradas pela oxidação de outras moléculas. Um exemplo importante é a modificação covalente de proteínas

pelo 4-hidroxi-nonenal produzido pela oxidação de lipídios (LEVINE, 1994). A determinação de proteínas carboniladas pelo ensaio espectrofotométrico permite sua quantificação embora possa ocorrer interferência dos ácidos nucleicos e outros compostos como mioglobina, hemoglobina e retinoide que também absorvem luz no comprimento utilizado, desse modo o método de detecção imunológico semiquantitativo é mais sensível e específico quanto aos danos proteicos (WEBER; DAVIES; GRUNE, 2015).

No modelo de intoxicação via paracetamol tem-se observado aumento da concentração de proteínas carboniladas (KUMARI; KAKKAR, 2012; PÁDUA et al., 2014; SONG et al., 2014). Nós observamos também que houve maior concentração de proteínas carboniladas no grupo P, não sendo encontradas diferenças entre os grupos P e PA. Esse mesmo perfil foi obtido pela detecção da carbonilação proteica por imunoenensaio.

O estudo de PÁDUA et al. (2014) mostrou que o tratamento com o extrato de carqueja, rico em antioxidantes, foi eficaz em reduzir as concentrações de TBARS e proteínas carboniladas. BANDEIRA et al. (2017b) observaram esse mesmo comportamento com uma dose de 100 mg de licopeno/Kg, resultado não encontrado quando a dose de 10 mg/Kg foi utilizada. Esses achados nos levam a supor que se trata de um efeito dose-dependente. Assinalamos também que diferenças podem ser encontradas com tratamentos realizados em diferentes tempos, possivelmente porque a ação dos antioxidantes pode ser direta ou indireta. Os grupos P e PA apresentaram resultado interessante, pois promoveram um perfil semelhante de comportamento da peroxidação lipídica e da carbonilação proteica. Embora o grupo PA não tenha apresentado diferença estatística entre o grupo P, sua similaridade com o grupo Controle sugere que o açaí possa ter um efeito indireto sobre essas variáveis.

Danos hepáticos podem ser detectados pelas atividades das transaminases séricas e diversos autores reconhecem esses marcadores como indicativos iniciais do dano hepático após altas doses de paracetamol (FOGHA et al., 2015; BANDEIRA et al., 2017b; LAKSHMI et al., 2018; LIANG et al., 2018). Considerando a toxicidade em ratos *Fischer*, PÁDUA et al. (2010) observaram que após 6 h a atividade da ALT apresentou-se aumentada, mantendo elevada por até 72 h. Em relação à AST, a maior atividade foi observada a partir das 18 h após administração do paracetamol com picos de atividade entre 24 e 48 h. No tempo utilizado no presente estudo (12 h) foi encontrada maior atividade da ALT, mas não na atividade da AST, no grupo P quando comparado ao grupo C. Embora essa diferença tenha sido significativa, ela não foi tão expressiva como relatado em outros estudos.

A baixa responsividade das atividades enzimáticas em nosso modelo pode ser explicada por DU et al. (2014) que apontaram a diferença entre os gêneros. De acordo com a avaliação

durante 24 h os autores observaram que a partir da 4<sup>a</sup> h pós intoxicação ambos os gêneros apresentam aumento da atividade da ALT em relação aos seus controles, porém nos tempos 6 e 24 h é possível verificar que ocorre maior atividade dessa transaminase nos camundongos machos. Esse resultado é corroborado pela avaliação histológica demonstrando maiores áreas de necrose e de formação de peroxinitrito nos camundongos machos nesses mesmos tempos, em contrapartida foi demonstrando que as fêmeas possuem maior capacidade de recuperação do conteúdo de glutathione total. Reforçando esses resultados, KANNO et al. (2017) demonstraram um aumento de 3 a 4 vezes nas atividades das transaminases em camundongos fêmeas intoxicados com paracetamol, enquanto o aumento da atividade de ALT e AST em machos varia de 10 a 31 vezes. É importante reforçar que a menor susceptibilidade do modelo experimental com ratos fêmeas não inviabiliza os achados nesse estudo, na verdade complementa os conhecimentos já estabelecidos e contribui para compreensão das diversas respostas que um mesmo protocolo experimental pode apresentar entre diferentes gêneros/espécies/linhagens.

A avaliação histopatológica do fígado mostrou maior presença de esteatose microvesicular, degeneração hidrópica e células inflamatórias no grupo Paracetamol. Esse grupo ainda apresentou maciças áreas de necrose, porém sem que tenhamos encontrado diferença com o grupo C. Essas alterações estão relacionadas a danos desencadeados por ERO às membranas celulares e mitocondriais.

Em linhas gerais, a degeneração hidrópica e esteatose microvesicular são manifestações reversíveis caracterizadas pela tumefação celular. A degeneração hidrópica é decorrente do desequilíbrio osmótico e iônico da membrana celular, com comprometimento da geração de ATP. Em relação a esteatose microvesicular, embora pouco se saiba a respeito dos mecanismos envolvidos na sua patogênese, sabe-se que algumas drogas podem afetar a cadeia transportadora de elétrons e a  $\beta$ -oxidação favorecendo o acúmulo de gotícula de lipídios no hepatócito. Em adição, o processo necrótico está envolvido com perda da integridade da membrana celular permitindo o extravasamento de enzimas lisossomais que degradam estruturas celulares, dando início ao processo de inflamação com objetivo de eliminar células mortas (FONTANA, 2008; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Dessa forma, os antioxidantes presentes no açaí podem contribuir para atenuar os danos histológicos, preservando o tecido de maiores injúrias provocadas pelo paracetamol. Embora as mensurações de esteatose microvesicular, degeneração hidrópica e necrose não possam ser consideradas significativas entre os grupos P e PA, observamos maior preservação da estrutura dos hepatócitos do grupo pré-tratado com açaí. A administração prévia de açaí promoveu

redução das células inflamatórias o que pode ter ocorrido como consequência da leve atenuação da área de necrose no grupo PA.

No modelo experimental de NAFLD o açaí também apresentou efeito sobre a inflamação, com diminuição da concentração de TNF sérico e expressão gênica de CD36 (SILVA, 2017). Na overdose com paracetamol, estudos com extrato de *Bauhinia purpurea* e licopeno, agentes com perfil antioxidante, promoveram redução da inflamação, área de necrose e hemorragia (YAHYA et al., 2013; BANDEIRA et al., 2017a).

O esgotamento da glutathione tem papel importante na disfunção mitocondrial, na peroxidação lipídica e no dano hepático (RIBAS; GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2014). Nossos resultados confirmam dados da literatura mostrando que o paracetamol afeta o sistema glutathione, uma vez que houve menor concentração hepática de glutathione total, glutathione reduzida e das sulfidrilas totais determinadas no soro. Por outro lado, encontramos ainda que a glutathione oxidada foi diminuída. Esse último resultado, embora não seja comumente relatado nos estudos, sugere que a manutenção do sistema também seja comprometida pois os conjugados formados pela glutathione reduzida com o NAPQI são excretados via bile e urina. Sugerimos que o açaí tenha efeito benéfico na restauração do sistema glutathione ao observar que as concentrações de sulfidrilas totais, glutathione total e reduzida são reestabelecidas. Ainda que a glutathione oxidada não seja totalmente restaurada, a similaridade com o grupo C parece reforçar que o açaí possibilite a manutenção do ciclo ao restaurar essas defesas antioxidantes no soro e fígado.

As sulfidrilas totais representam a porção onde ocorre a ligação do NAPQI com a glutathione no processo de detoxificação desse metabólito (HODGMAN; GARRARD, 2012). De modo semelhante, VERMA et al. (2013) observaram esse efeito com o extrato de *Ageratum conyzoides* e atribuíram o resultado aos compostos fenólicos presentes no extrato, uma vez que eles podem modular o sistema antioxidante a fim de possibilitar a eliminação do NAPQI.

Além da redução de sua eliminação, a manutenção das concentrações normais da glutathione envolve a atividade das enzimas  $\gamma$ GCS, GPx e GR. A  $\gamma$ GCS é uma enzima limitante da síntese de GSH, catalisa a ligação entre a cisteína e o glutamato, e uma vez formado, o  $\gamma$ -glutamilcisteína se liga com a glicina, catalisada pela glutathione sintetase, sintetizando então a glutathione (RIBAS; GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2014). A expressão gênica de  $\gamma$ GCS não apresentou diferença entre os grupos C e P, no entanto o grupo PA apresentou expressão aumentada em relação ao grupo C, sugerindo um aumento da síntese da enzima pelo tratamento com açaí. Este fato pode ter contribuído para manutenção da concentração da

glutathiona total observada nesse grupo, caso exista uma relação direta entre a transcrição e a síntese da enzima.

O grupo paracetamol apresentou maior atividade da glutathiona peroxidase, e essa mesma tendência foi observada pelo pré-tratamento com açaí. Esse resultado corrobora o estudo de RAŠKOVIĆ et al. (2019), em que a intoxicação com paracetamol promoveu uma regulação positiva da GPx como resposta adaptativa a maior formação de ERO. A menor atividade da glutathiona redutase juntamente com a menor concentração da glutathiona reduzida podem explicar o maior estresse oxidativo observado no grupo P, mesma observação feita por RAŠKOVIĆ et al. (2017) e RAŠKOVIĆ et al. (2019). O tratamento com açaí fez com que atividade desta enzima apresentasse valores intermediários entre os grupos P e C, esse resultado juntamente com a concentração da GSH indica que o tratamento como açaí contribuiu para manutenção do sistema glutathiona.

No entanto, os resultados encontrados por ACHARYA; LAU-CAM (2010) foram similares aos achados em nosso estudo, em que observamos a concentração de glutathiona oxidada diminuída no grupo intoxicado com paracetamol, de acordo com os autores os dados sugerem que esse resultado pode ter ocorrido devido à conjugação da glutathiona reduzida com o NAPQI e sua excreção via bile ou urina, impossibilitando a reciclagem e manutenção do sistema glutathiona. O pré-tratamento com açaí manteve essa fração semelhante aos grupos P e C, no entanto tomados em conjunto, os resultados sugerem que o açaí contribuiu para que houvesse manutenção das defesas antioxidantes. GUERRA et al. (2011) demonstraram que a adição do açaí na dieta ativou a expressão gênica de glutathiona peroxidase e de  $\gamma$ GCS no fígado de ratas *Fischer*, melhorando o *status* antioxidante no modelo experimental de diabetes. Também em estudo com extrato de açaí, BONOMO et al. (2014) observaram a ativação da  $\gamma$ GCS em *C. elegans*, propondo que esse resultado resulte da atuação de um mecanismo indireto sobre o *status* antioxidante.

A glutathiona S-transferase é uma enzima de fase II responsável pela conjugação do NAPQI com a glutathiona reduzida, desempenhando um papel importante na desintoxicação desse metabólito gerado pela reação de fase I. O aumento da atividade da glutathiona S-transferase no grupo P corrobora com uma demanda aumentada de conjugação do NAPQI com a glutathiona reduzida, favorecendo a eliminação do conjugado e redução da concentração de glutathiona. A minimização de danos pelo tratamento com açaí, pode ser devido à sua ação sobre o sistema glutathiona, uma vez que foram encontradas menores atividade da glutathiona S-transferase e restauração das concentrações de glutathiona reduzida e total.

As demais enzimas de defesa antioxidante foram avaliadas, porém não observamos diferenças entre as atividades enzimáticas de SOD, catalase e paraoxonase em nosso modelo experimental. Em geral, essas enzimas tem atividade reduzida mediante administração do fármaco, mostrando que o desbalanço antioxidante ocorre em um amplo espectro (FOGHA et al., 2015; ACKERMAN et al., 2018; FU et al., 2018; NING et al., 2018). AGARWAL et al. (2011) observaram que a atividade da enzima SOD sofreu modulação temporal, sendo sua atividade restaurada 6 h após a administração do paracetamol em camundongos. Observando esses achados, podemos supor que em nosso modelo experimental o sistema glutathiona tenha papel mais importante, enquanto a ação de outras enzimas antioxidantes permanece inalterada.

O Nrf2 é um fator de transcrição importante na prevenção da toxicidade pelo paracetamol. Estes efeitos protetores são atribuídos à indução de enzimas de fase II do metabolismo/desintoxicação de fármacos e enzimas antioxidantes (SHEN; KONG, 2009; GUM; CHO, 2013). Com relação aos efeitos do paracetamol e agentes antioxidantes sobre Nrf2, PANG et al. (2015) observaram que camundongos intoxicados com paracetamol apresentaram menor expressão desse gene e o pré-tratamento com ácido clorogênico foi associado com a maior expressão do Nrf2 e estímulo de enzimas antioxidantes. SOARES et al. (2017) observaram que o extrato de semente de açaí, rico em compostos fenólicos, promoveu maior expressão proteica de Nrf2 e de enzimas antioxidantes, revertendo o estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células endoteliais humanas. Esses e outros estudos levam à compreensão que compostos fenólicos agem como antioxidantes diretos, quelando íons de metais de transição e/ou inibindo a produção de radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio, e também como antioxidantes indiretos, atuando na ativação do Nrf2 (PETRUK et al., 2018).

Os resultados com relação ao paracetamol corroboram com dados da literatura, pois observamos menor expressão do gene Nrf2, entretanto não verificamos efeitos expressivos do açaí. No entanto os resultados encontrados nas defesas antioxidantes sugerem que este sutil efeito possa ter promovido a recuperação do sistema glutathiona. Além disso, seria importante verificar se ocorre translocação do Nrf2 para o núcleo, onde ele exerce sua função.

NAGY et al. (2007), NAGY et al. (2010) e UZI et al. (2013) relataram que o estresse do retículo endoplasmático também está envolvido na toxicidade do paracetamol. Insultos ao retículo endoplasmático impactam o enovelamento de proteínas, resultando no acúmulo de proteínas desenoveladas. Essa perturbação impulsiona o estresse do retículo e desencadeia o processo adaptativo da UPR através da ativação de três vias pelos sensores PERK, IRE1 e ATF6, cujo objetivo é aliviar o estresse através do aumento da capacidade de dobrar proteínas

e da inibição da tradução, reestabelecendo a homeostasia, caso contrário a UPR iniciará o processo de morte celular (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005; ZHANG; WANG, 2012).

No presente trabalho observamos que o paracetamol promoveu o aumento da expressão dos genes GADD34 e CHOP, sem efeito expressivo sobre as expressões de BiP, eIF2 $\alpha$  e ATF4. Quando ativada, o gene da CHOP transloca-se para o núcleo da célula, inibindo a transcrição de genes antiapoptóticos e ativando genes pró-apoptóticos, sendo um importante fator responsável pela apoptose. A CHOP ainda regula a expressão da GADD34, que promove a desfosforilação da eIF2 $\alpha$ , com aumento da tradução de proteínas, provocando um *feedback* negativo e consequente aumento do estresse do retículo (MARCINIAK et al., 2004; MALHI; KAUFMAN, 2011). Embora a expressão gênica nem sempre esteja diretamente relacionada com a síntese de proteínas, esses resultados sugerem, como já relatado por outros estudos (UZI et al., 2013; KUSAMA et al., 2017; LIANG et al., 2018), que o estresse do retículo está envolvido nos danos provocados por altas doses de paracetamol.

Ao avaliar os efeitos do açaí observamos menor expressão gênica de CHOP e GADD34, possivelmente decorrente da atenuação do estresse do retículo, e ainda aumento da expressão gênica de eIF2 $\alpha$  e ATF4. Em conjunto, os dados sugerem que o açaí promoveu uma modulação dos genes da via PERK, pois a redução da expressão de genes relacionados ao processo apoptótico, juntamente com a menor tradução proteica podem abrandar o estresse ocasionado pelo paracetamol. Embora o ATF4 possa promover a regulação de genes antioxidantes, induzir a transcrição de CHOP e controlar a ação da GADD34 (FLAMMENT et al., 2012), os demais resultados nos permitem sugerir que o aumento da expressão desse gene atue favorecendo efeitos antioxidantes em detrimento dos impactos deletérios do estresse do retículo.

O estudo com camundongos nocaute foi de grande relevância para a compreensão dessa via por UZI et al. (2013), inclusive ao destacar que a via da PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP é intimamente relacionada com a intoxicação com paracetamol ao demonstrar que a ativação da CHOP ocorre concomitante à supressão da fosforilação da eIF2 $\alpha$ . Dois aspectos destacaram-se neste estudo, uma delas consiste na existência de uma proteção intrínseca contra toxicidade nos hepatócitos dos camundongos nocaute, e a outra relaciona-se com a menor geração de metabólitos tóxicos, desse modo os camundongos nocaute tem menor dano hepático após a administração do paracetamol. Nos camundongos selvagens, a recuperação pós intoxicação ocorre mais lentamente, com alta taxa de mortalidade entre os animais, aumento gradativo da expressão gênica da CHOP nas primeiras 12 h após a intoxicação e maior área necrótica.

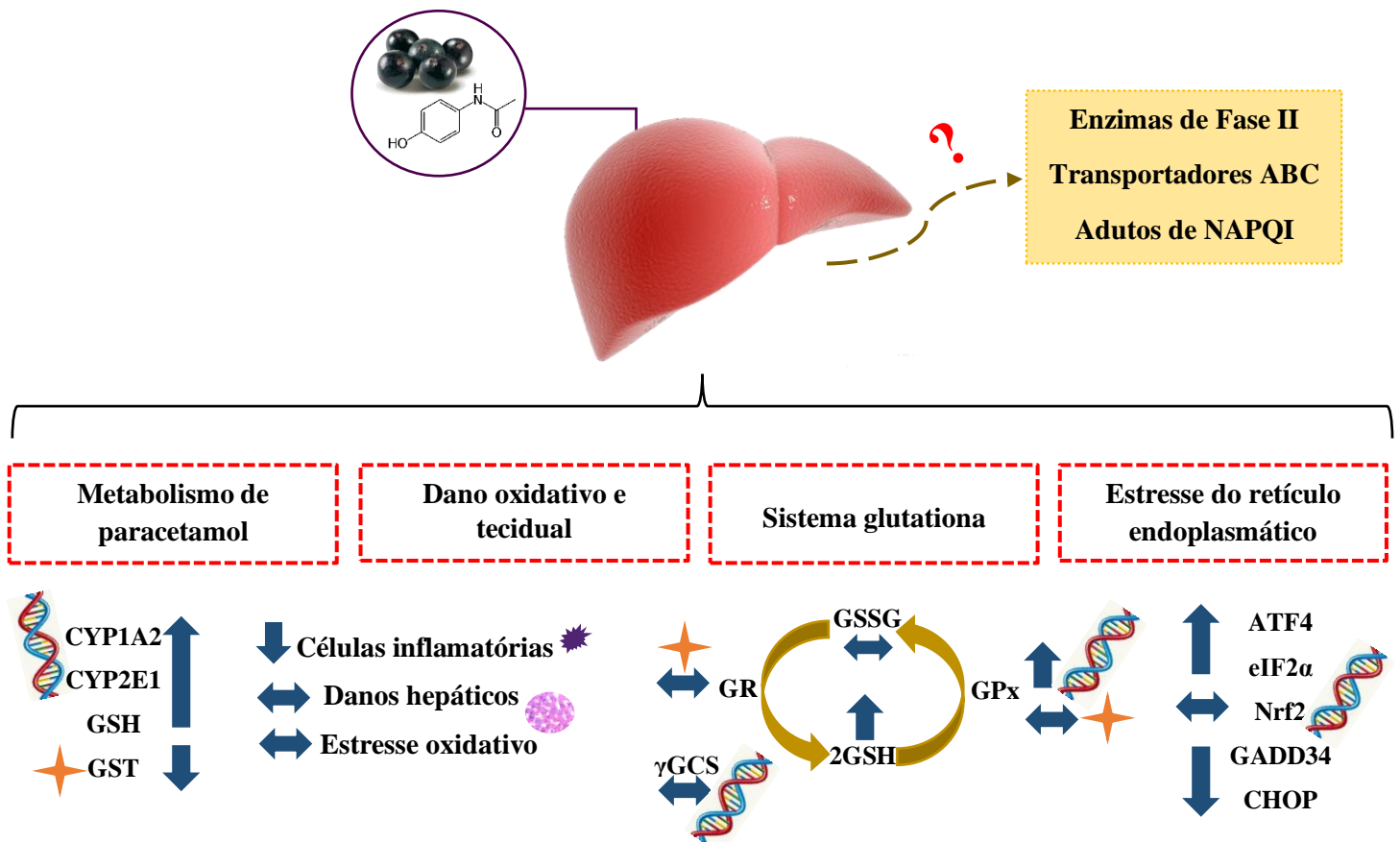
O pré-tratamento com polpa de açaí recuperou parâmetros responsáveis por pontos chave do estresse promovido pelo paracetamol. Em relação ao grupo pré-tratado com

acetilcisteína, observamos que sua ação também foi direcionada para a atenuação da hepatotoxicidade promovida pelo estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático. No entanto o dano tecidual avaliado pela esteatose microvesicular, necrose, degeneração hepática e de células inflamatórias apresentou perfil semelhante ao grupo P. Assim, o açáí se apresenta como uma abordagem terapêutica que possibilita a restauração da homeostase hepática, minimizando os danos promovidos pela intoxicação com paracetamol ao atuar sobre diferentes mecanismos. Nesse contexto, nosso estudo abre perspectivas para testar a interação paracetamol *versus* açáí em outros cenários, tais como diferentes doses e tempos de indução à hepatotoxicidade e de tratamento.



## 8 CONCLUSÃO

Nossos achados mostraram que, nesse modelo experimental, o paracetamol causou alterações histológicas, estresse oxidativo, depleção do sistema glutatona e aumento da expressão de genes da via da PERK, indicando estresse do retículo endoplasmático. O pré-tratamento com açaí pode amenizar danos hepáticos, pois o sistema glutatona foi preservado e a expressão gênica da CHOP, componente crítico da apoptose, foi reduzido. Assim, nossos resultados indicaram que o açaí atuou sobre diferentes mecanismos, sugerindo seu potencial terapêutico para amenizar os danos provocados pelo paracetamol (FIGURA 21).



**Figura 21** - Resumo dos principais efeitos do pré-tratamento com açaí no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M.; LAU-CAM, C. A. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of biomedical science**, v. 17, n. 1, p. S35, 2010.
- ACKERMAN, Z.; SKARZINSKI, G.; LINK, G.; GLAZER, M.; PAPPO, O.; GROZOVSKI, M. The effects of chronic iron overload in rats with acute acetaminophen overdose. **Toxicologic pathology**, v. 46, n. 5, p. 597-607, 2018.
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1984. v.105, p.121-126.
- AGARWAL, R.; MACMILLAN-CROW, L. A.; RAFFERTY, T. M.; SABA, H.; ROBERTS, D. W.; FIFER, E. K.; JAMES, L. P.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 110-118, 2011.
- AITHAL, P.; DAY, C. The natural history of histologically proved drug induced liver disease. **Gut**, v. 44, n. 5, p. 731-735, 1999.
- ALI, B.; MOUSA, H.; EL-MOUGY, S. The effect of a water extract and anthocyanins of hibiscus sabdariffa L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 1, p. 56-59, 2003.
- ASADA, R.; KANEMOTO, S.; KONDO, S.; SAITO, A.; IMAIZUMI, K. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. **The Journal of Biochemistry**, v. 149, n. 5, p. 507-518, 2011.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1304-1316, 2004.
- BAALI, N.; BELLOUM, Z.; BAALI, S.; CHABI, B.; PESSEMESSE, L.; FOURET, G.; AMEDDAH, S.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S.; FEILLET-COUDRAY, C. Protective activity of total polyphenols from genista quadriflora munby and teucrium polium geyrii maire in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 193, 2016.
- BACK, S. H.; SCHEUNER, D.; HAN, J.; SONG, B.; RIBICK, M.; WANG, J.; GILDERSLEEVE, R. D.; PENNATHUR, S.; KAUFMAN, R. J. Translation attenuation through eIF2 $\alpha$  phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in  $\beta$  cells. **Cell metabolism**, v. 10, n. 1, p. 13-26, 2009.

BANDEIRA, A. C. B.; DA SILVA, T. P.; DE ARAUJO, G. R.; ARAUJO, C. M.; DA SILVA, R. C.; LIMA, W. G.; BEZERRA, F. S.; COSTA, D. C. Lycopene inhibits reactive oxygen species production in SK-Hep-1 cells and attenuates acetaminophen-induced liver injury in C57BL/6 mice. **Chemico-biological interactions**, v. 263, n., p. 7-17, 2017a.

BANDEIRA, A. C. B.; DA SILVA, R. C.; JÚNIOR, J. V. R.; FIGUEIREDO, V. P.; TALVANI, A.; CANGUSSÚ, S. D.; BEZERRA, F. S.; COSTA, D. C. Lycopene pretreatment improves hepatotoxicity induced by acetaminophen in C57BL/6 mice. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1057-1065, 2017b.

BARBOSA, P. O.; PALA, D.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; DO AMARAL, J. F.; VIEIRA, R. A. L.; DE FREITAS FOLLY, G. A.; VOLP, A. C. P.; DE FREITAS, R. N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674-680, 2016.

BARNES, S. N.; ALEKSUNES, L. M.; AUGUSTINE, L.; SCHEFFER, G. L.; GOEDKEN, M. J.; JAKOWSKI, A. B.; PRUIMBOOM-BREES, I. M.; CHERRINGTON, N. J.; MANAUTOU, J. E. Induction of hepatobiliary efflux transporters in acetaminophen-induced acute liver failure cases. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 10, p. 1963-1969, 2007.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 797-803, 2002.

BECKETT, G.; CHAPMAN, B.; DYSON, E.; HAYES, J. Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. **Gut**, v. 26, n. 1, p. 26-31, 1985.

BEŁTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ, A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. **Polish journal of pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 661-671, 2002.

BERTOLOTI, A.; ZHANG, Y.; HENDERSHOT, L. M.; HARDING, H. P.; RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature cell biology**, v. 2, n. 6, p. 326, 2000.

BESSEMS, J. G.; VERMEULEN, N. P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. **Critical reviews in toxicology**, v. 31, n. 1, p. 55-138, 2001.

BLIEDEN, M.; PARAMORE, L. C.; SHAH, D.; BEN-JOSEPH, R. A perspective on the epidemiology of acetaminophen exposure and toxicity in the United States. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 341-348, 2014.

BOBBIO, F.; DRUZIAN, J.; ABRAO, P. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro. **Euterpe oleracea**, v., n., p., 2000.

BONOMO, L. D. F.; SILVA, D. N.; BOASQUIVIS, P. F.; PAIVA, F. A.; GUERRA, J. F. D. C.; MARTINS, T. A. F.; TORRES, Á. G. D. J.; DE PAULA, I. T. B. R.; CANESCHI, W. L.; JACOLOT, P. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) modulates oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by direct and indirect mechanisms. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e89933, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL; ABASTECIMENTO, D. D. A. E. **Aprova o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta (Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000)**: secondary title: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2000.

BRONDÍZIO, E. S.; SAFAR, C. A.; SIQUEIRA, A. D. The urban market of açaí fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) and rural land use change: ethnographic insights into the role of price and land tenure constraining agricultural choices in the Amazon estuary. **Urban ecosystems**, v. 6, n. 1-2, p. 67-97, 2002.

BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BACON, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American journal of gastroenterology**, v. 94, n. 9, p. 2467, 1999.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1978. v.52, p.302-310.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. In: (Ed.). **Methods in enzymology**: Elsevier, 1985. v.113, p.484-490.

CARVALHO, M. M. D. F.; REIS, L. L. T.; LOPES, J. M. M.; LAGE, N. N.; GUERRA, J. F. D. C.; ZAGO, H. P.; BONOMO, L. D. F.; PEREIRA, R. R.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E. Açaí improves non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced by fructose. **Nutricion hospitalaria**, v., n., p. 318-325, 2018.

CASTANEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, M.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CHEN, Y.; DONG, H.; THOMPSON, D.; SHERTZER, H.; NEBERT, D.; VASILIOU, V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food and chemical toxicology**, v. 60, n., p. 38-44, 2013.

CLARK, R.; FISHER, J. E.; SKETRIS, I. S.; JOHNSTON, G. M. Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study. **BMC clinical pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 11, 2012.

COLES, B.; WILSON, I.; WARDMAN, P.; HINSON, J.; NELSON, S.; KETTERER, B. The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 264, n. 1, p. 253-260, 1988.

CULLINAN, S. B.; DIEHL, J. A. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following ER stress. **Journal of Biological Chemistry**, v., n., p., 2004.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC International**: Association of Official Analytical Chemists., 1996

DARA, L.; JI, C.; KAPLOWITZ, N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. **Hepatology**, v. 53, n. 5, p. 1752-1763, 2011.

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

DE ROSSO, V. V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E. C.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291-299, 2008.

DE SOUZA, M. O.; SILVA, M.; SILVA, M. E.; DE PAULA OLIVEIRA, R.; PEDROSA, M. L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7-8, p. 804-810, 2010.

DE SOUZA, M. O.; E SILVA, L. S.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L.; DE FIGUEIREDO, B. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. **Nutrition research**, v. 32, n. 12, p. 976-984, 2012.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

DENIAUD, A.; MAILLIER, E.; PONCET, D.; KROEMER, G.; LEMAIRE, C.; BRENNER, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 3, p. 285, 2008.

DU, K.; WILLIAMS, C. D.; MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Lower susceptibility of female mice to acetaminophen hepatotoxicity: Role of mitochondrial glutathione, oxidant stress and c-jun N-terminal kinase. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 281, n. 1, p. 58-66, 2014.

DU, K.; RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. **Redox biology**, v. 10, n., p. 148-156, 2016.

EL-BAKRY, H. A.; EL-SHERIF, G.; ROSTOM, R. M. Therapeutic dose of green tea extract provokes liver damage and exacerbates paracetamol-induced hepatotoxicity in rats through oxidative stress and caspase 3-dependent apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n., p. 798-811, 2017.

FAGONE, P.; JACKOWSKI, S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S311-S316, 2009.

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass spectrometry reviews**, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014.

FIBIGR, J.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 143, n., p. 204-213, 2017.

FLAMMENT, M.; HAJDUCH, E.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 8, p. 381-390, 2012.

FOGHA, V. J.; TCHAMGOUE, A. D.; DOMEKOUO, U. L.; TARKANG, P. A.; AGBOR, G. A. Morinda lucida Stem Bark Protects Paracetamol Induced Liver Damage. v., n., p., 2015.

FONTANA, R. J. Acute liver failure including acetaminophen overdose. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 4, p. 761-794, 2008.

FOYOUZI-YOUSSEFI, R.; ARNAUDEAU, S.; BORNER, C.; KELLEY, W. L.; TSCHOPP, J.; LEW, D. P.; DEMAUREX, N.; KRAUSE, K.-H. Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5723-5728, 2000.

FU, T.; WANG, S.; LIU, J.; CAI, E.; LI, H.; LI, P.; ZHAO, Y. Protective effects of  $\alpha$ -mangostin against acetaminophen-induced acute liver injury in mice. **European journal of pharmacology**, v. 827, n., p. 173-180, 2018.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GILL, P.; BHATTACHARYYA, S.; MCCULLOUGH, S.; LETZIG, L.; MISHRA, P. J.; LUO, C.; DWEEP, H.; JAMES, L. MicroRNA regulation of CYP 1A2, CYP3A4 and CYP2E1 expression in acetaminophen toxicity. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12331, 2017.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v., n., p., 2001.

GOLDRING, C. E.; KITTERINGHAM, N. R.; ELSBY, R.; RANDLE, L. E.; CLEMENT, Y. N.; WILLIAMS, D. P.; MCMAHON, M.; HAYES, J. D.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M. Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. **Hepatology**, v. 39, n. 5, p. 1267-1276, 2004.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P. D.; SCHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. D. O.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae Mart.) by HPLC. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 43-46, 2012.

GRANT, D. Detoxification pathways in the liver. In: (Ed.). **Journal of inherited metabolic disease**: Springer, 1991, p.421-430.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-629, 2004.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207-212, 1980.

GU, X.; MANAUTOU, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 14, n., p., 2012.

GUERRA, J. F. D. C.; MAGALHÃES, C. L. D. B.; COSTA, D. C.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 49, n. 3, p. 188-194, 2011.

GUERRA, J. F. D. C.; MACIEL, P. S.; DE ABREU, I. C. M. E.; PEREIRA, R. R.; SILVA, M.; DE MORAIS CARDOSO, L.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; DE LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Dietary açai attenuates hepatic steatosis via adiponectin-mediated effects on lipid metabolism in high-fat diet mice. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n., p. 192-202, 2015.

GUM, S. I.; CHO, M. K. Recent updates on acetaminophen hepatotoxicity: the role of nrf2 in hepatoprotection. **Toxicological research**, v. 29, n. 3, p. 165, 2013.

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

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. **Nature**, v. 397, n. 6716, p. 271, 1999.

HASSAN, A.; FONTANA, R. J. The diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. **Liver International**, v., n., p., 2018.

HODGMAN, M. J.; GARRARD, A. R. A review of acetaminophen poisoning. **Critical care clinics**, v. 28, n. 4, p. 499-516, 2012.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 672-676, 2011.

HU, P.; HAN, Z.; COUVILLON, A. D.; KAUFMAN, R. J.; EXTON, J. H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 8, p. 3071-3084, 2006.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. **Current science**, v., n., p. 1684-1696, 2007.

ILKHANI, F.; HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A. Niacin and oxidative stress: a mini review. **Journal of Nutritional Medicine and Diet Care**, v. 2, n. 1, p. 2-14, 2016.

JAESCHKE, H.; KNIGHT, T. R.; BAJT, M. L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology letters**, v. 144, n. 3, p. 279-288, 2003.

JAESCHKE, H.; MCGILL, M. R.; WILLIAMS, C. D.; RAMACHANDRAN, A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. **Life sciences**, v. 88, n. 17-18, p. 737-745, 2011.

JOLLOW, D. J.; MITCHELL, J.; POTTER, W. Z.; DAVIS, D.; GILLETTE, J.; BRODIE, B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. In: *Pharmacology* (Basel, 1974) Citeseer, p.



KANNO, S.-I.; TOMIZAWA, A.; YOMOGIDA, S.; HARA, A. Glutathione peroxidase 3 is a protective factor against acetaminophen-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. **International journal of molecular medicine**, v. 40, n. 3, p. 748-754, 2017.

KARADAS, S.; ASLAN, M.; GONULLU, H.; KATI, C.; DURAN, L.; OLMEZ, S.; KUCUKOGLU, M.; DEMIR, H. Acetaminophen intoxication is associated with decreased serum paraoxonase and arylesterase activities and increased lipid hydroperoxide levels. **Human & experimental toxicology**, v. 33, n. 11, p. 1134-1140, 2014.

KHODAYAR, M. J.; KALANTARI, H.; KHORSANDI, L.; RASHNO, M.; ZEIDOONI, L. Betaine protects mice against acetaminophen hepatotoxicity possibly via mitochondrial complex II and glutathione availability. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, n., p. 1436-1445, 2018.

KIM; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 12, p. 1013, 2008.

KIM; LEE, N. J.; BAN, J. O.; YOO, H. S.; LEE, Y. M.; YOON, Y. P.; EUM, S. Y.; JEONG, H. S.; YOON, D.-Y.; HAN, S. B. Curative effects of thiocremonone against acetaminophen-induced acute hepatic failure via inhibition of proinflammatory cytokines production and infiltration of cytotoxic immune cells and Kupffer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n., p., 2013.

KRENKEL, O.; MOSSANEN, J. C.; TACKE, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 3, n. 6, p. 331, 2014.

KÜÇÜKARDALI, Y.; CINAN, U.; ACAR, H.; ÖZKAN, S.; TOP, C.; NALBANT, S.; CERMIK, H.; ÇANKIR, Z.; DANACI, M. Comparison of the therapeutic efficacy of 4-methylpyrazole and N-acetylcysteine on acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity in rats. **Current medical research and opinion**, v. 18, n. 2, p. 78-81, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-bases patológicas das doenças**: Elsevier Brasil, 2015

KUMARI, A.; KAKKAR, P. Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. **Life sciences**, v. 90, n. 15-16, p. 561-570, 2012.

KUSAMA, H.; KON, K.; IKEJIMA, K.; ARAI, K.; AOYAMA, T.; UCHIYAMA, A.; YAMASHINA, S.; WATANABE, S. Sodium 4-phenylbutyric acid prevents murine acetaminophen hepatotoxicity by minimizing endoplasmic reticulum stress. **Journal of gastroenterology**, v. 52, n. 5, p. 611-622, 2017.

LAKSHMI, T.; RENUKADEVI, B. S.; SENTHILKUMAR, S.; HARIBALAN, P.; PARAMESHWARI, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; RAJESHKUMAR, S. Seed and bark extracts of *Acacia catechu* protects liver from acetaminophen induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress, antioxidant enzymes and liver function enzymes in Wistar rat model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, n., p. 838-844, 2018.

LARREY, D. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. In: *Seminars in liver disease*, 2002 Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, p. 145-156.

LARSON, A. M. Acetaminophen hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, v. 11, n. 3, p. 525-548, 2007.

LEE, W. M.; LARSON, A. M.; STRAVITZ, R. T. AASLD position paper: the management of acute liver failure: update 2011. **AASLD September**, v., n., p., 2011.

LEI, K.; DAVIS, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2432-2437, 2003.

LEISE, M. D.; POTERUCHA, J. J.; TALWALKAR, J. A. Drug-induced liver injury. In: *Mayo clinic proceedings*, 2014 Elsevier, p. 95-106.

LEVINE, R. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. **Methods. Enzymol.**, v. 233, n., p. 246-257, 1994.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 6, p. 313-319, 2013.

LIANG, H.; FENG, Y.; CUI, R.; QIU, M.; ZHANG, J.; LIU, C. Simvastatin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, n., p. 916-924, 2018.

LIU, J.; WU, K. C.; LU, Y.-F.; EKVASE, E.; KLAASSEN, C. D. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, n., p., 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUTZ, I. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: procedimentos e determinações gerais. **Capítulo IV**, v., n., p., 2008.

MALHI, H.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. **Journal of hepatology**, v. 54, n. 4, p. 795-809, 2011.

MALHOTRA, J. D.; MIAO, H.; ZHANG, K.; WOLFSON, A.; PENNATHUR, S.; PIPE, S. W.; KAUFMAN, R. J. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18525-18530, 2008.

MANDL, J.; MÉSZÁROS, T.; BÁNHEGYI, G.; CSALA, M. Minireview: endoplasmic reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 3, p. 384-393, 2013.

MARCINIAK, S. J.; YUN, C. Y.; OYADOMARI, S.; NOVOA, I.; ZHANG, Y.; JUNGREIS, R.; NAGATA, K.; HARDING, H. P.; RON, D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. **Genes & development**, v. 18, n. 24, p. 3066-3077, 2004.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MARTIN-MURPHY, B. V.; HOLT, M. P.; JU, C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. **Toxicology letters**, v. 192, n. 3, p. 387-394, 2010.

MAZALEUSKAYA, L. L.; SANGKUHL, K.; THORN, C. F.; FITZGERALD, G. A.; ALTMAN, R. B.; KLEIN, T. E. PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 25, n. 8, p. 416, 2015.

MCCULLOUGH, K. D.; MARTINDALE, J. L.; KLOTZ, L.-O.; AW, T.-Y.; HOLBROOK, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 4, p. 1249-1259, 2001.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 9, p. 2174-2187, 2013.

MCJUNKIN, B.; BARWICK, K. W.; LITTLE, W. C.; WINFIELD, J. B. Fatal massive hepatic necrosis following acetaminophen overdose. **Jama**, v. 236, n. 16, p. 1874-1875, 1976.

MICHAEL, S. L.; MAYEUX, P. R.; BUCCI, T. J.; WARBRITTON, A. R.; IRWIN, L. K.; PUMFORD, N. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 5, p. 432-441, 2001.

MICHNA, E.; DUH, M. S.; KORVES, C.; DAHL, J. L. Removal of opioid/acetaminophen combination prescription pain medications: assessing the evidence for hepatotoxicity and consequences of removal of these medications. **Pain medicine**, v. 11, n. 3, p. 369-378, 2010.

MITCHELL, J.; JOLLOW, D.; POTTER, W.; GILLETTE, J.; BRODIE, B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 211-217, 1973a.

MITCHELL, J.; JOLLOW, D.; POTTER, W.; DAVIS, D.; GILLETTE, J.; BRODIE, B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 185-194, 1973b.

MULABAGAL, V.; KELLER, W. J.; CALDERÓN, A. I. Quantitative analysis of anthocyanins in *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials and capsules by Q-TOF liquid chromatography/mass spectrometry. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 10, p. 1289-1296, 2012.

MURADOR, D.; BRAGA, A. R.; DA CUNHA, D.; DE ROSSO, V. Alterations in phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking technique effects: A meta-analytic investigation. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 2, p. 169-177, 2018.

NAGY, G.; KARDON, T.; WUNDERLICH, L.; SZARKA, A.; KISS, A.; SCHAFF, Z.; BÁNHEGYI, G.; MANDL, J. Acetaminophen induces ER dependent signaling in mouse liver. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 459, n. 2, p. 273-279, 2007.

NAGY, G.; SZARKA, A.; LOTZ, G.; DÓCZI, J.; WUNDERLICH, L.; KISS, A.; JEMNITZ, K.; VERES, Z.; BÁNHEGYI, G.; SCHAFF, Z. BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 1, p. 96-103, 2010.

NEMETH, E.; BAIRD, A. W.; O'FARRELLY, C. Microanatomy of the liver immune system. In: *Seminars in immunopathology*, 2009Springer, p. 333.

NING, C.; GAO, X.; WANG, C.; KONG, Y.; LIU, Z.; SUN, H.; SUN, P.; HUO, X.; MA, X.; MENG, Q. Ginsenoside Rg1 protects against acetaminophen-induced liver injury via activating Nrf2 signaling pathway in vivo and in vitro. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, n., p. 58-68, 2018.

NISHITOH, H.; SAITOH, M.; MOCHIDA, Y.; TAKEDA, K.; NAKANO, H.; ROTHE, M.; MIYAZONO, K.; ICHIJO, H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. **Molecular cell**, v. 2, n. 3, p. 389-395, 1998.

NOGUEIRA, O.; FIGUERÊDO, F.; MULLER, A. Sistema de produção do Açaí. **Introdução e importância econômica. EMBRAPA. Versión electrónica. Recuperado el**, v. 25, n., p., 2006.

OAKES, S. A.; OPFERMAN, J. T.; POZZAN, T.; KORSMEYER, S. J.; SCORRANO, L. Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1335-1340, 2003.

ODENDAAL, A. Y.; SCHAUSS, A. G. Potent antioxidant and anti-inflammatory flavonoids in the nutrient-rich Amazonian palm fruit, açai (*Euterpe spp.*). In: (Ed.). **Polyphenols in human health and disease**: Elsevier, 2014, p.219-239.

OLIVEIRA; CARVALHO, J. E. U. D.; NASCIMENTO, W. M. O. D. **Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**: Funep, 2000

OLIVEIRA; DE CARVALHO, J. E. U.; DO NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C. H. Cultivo do açazeiro para produção de frutos. **Embrapa Amazônia Oriental. Circular técnica**, v., n., p., 2002.

OLIVEIRA; COSTA, C. A. D.; GRAZIELE, F.; CORDEIRO, V. S.; SANTOS, I. B.; CARVALHO, L. C. D.; CONCEIÇÃO, E. P. S. D.; LISBOA, P. C.; OGNIBENE, D. T.; SOUSA, P. J. C. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols protect mice from diet-induced obesity and fatty liver by regulating hepatic lipogenesis and cholesterol excretion. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4631-4636, 2008.

PÁDUA; SILVA, L. D.; JÚNIOR, J. V. R.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 381-386, 2010.

PÁDUA; ROSSONI JUNIOR, J. V.; MAGALHAES, C. L. D. B.; SEIBERF, J. B.; ARAUJO, C. M.; SOUZA, G. H. B. D.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. *Baccharis trimera* improves the antioxidant defense system and inhibits iNOS and NADPH oxidase expression in a rat model of inflammation. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 975-984, 2013.

PÁDUA; ROSSONI JÚNIOR, J. V.; MAGALHÃES, C. L. D. B.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; SOUZA, G. H. B. D.; BRANDÃO, G. C.; RODRIGUES, I. V.; LIMA, W. G. Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. **Mediators of inflammation**, v. 2014, n., p., 2014.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PALA, D.; BARBOSA, P. O.; SILVA, C. T.; DE SOUZA, M. O.; FREITAS, F. R.; VOLP, A. C. P.; MARANHÃO, R. C.; DE FREITAS, R. N. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 618-623, 2018.

PANG, C.; SHENG, Y.-C.; JIANG, P.; WEI, H.; JI, L.-L. Chlorogenic acid prevents acetaminophen-induced liver injury: the involvement of CYP450 metabolic enzymes and some antioxidant signals. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 16, n. 7, p. 602-610, 2015.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 172, n., p. 462-468, 2015.

PEREIRA, R. R.; ABREU, I. C. M. E. D.; GUERRA, J. F. D. C.; LAGE, N. N.; LOPES, J. M. M.; SILVA, M.; LIMA, W. G. D.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) upregulates paraoxonase 1 gene expression and activity with concomitant reduction of hepatic steatosis in high-fat diet-fed rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n., p., 2016.

PETRUK, G.; DEL GIUDICE, R.; RIGANO, M. M.; MONTI, D. M. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, n., p., 2018.

PINTON, P.; RIZZUTO, R. Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 8, p. 1409, 2006.

PLOTKIN, M. J.; BALICK, M. J. Medicinal uses of South American palms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 157-179, 1984.

POLI, G.; BIASI, F.; LEONARDUZZI, G. 4-Hydroxynonenal–protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. **Molecular aspects of medicine**, v. 29, n. 1-2, p. 67-71, 2008.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

PRESCOTT, L. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. **British journal of clinical pharmacology**, v. 10, n. S2, p. 291S-298S, 1980.

PRESCOTT, L. Paracetamol overdose. **Drugs**, v. 25, n. 3, p. 290-314, 1983.

PUTHALAKATH, H.; O'REILLY, L. A.; GUNN, P.; LEE, L.; KELLY, P. N.; HUNTINGTON, N. D.; HUGHES, P. D.; MICHALAK, E. M.; MCKIMM-BRESCHKIN, J.; MOTOYAMA, N. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1337-1349, 2007.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014, n., p., 2014.

RAŠKOVIĆ, A.; GIGOV, S.; ČAPO, I.; KUSTURICA, M. P.; MILIJAŠEVIĆ, B.; KOJIĆ-DAMJANOV, S.; MARTIĆ, N. Antioxidative and protective actions of apigenin in a paracetamol-induced hepatotoxicity rat model. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 42, n. 5, p. 849-856, 2017.

RAŠKOVIĆ, A.; BUKUMIROVIĆ, N.; PAUT KUSTURICA, M.; MILIĆ, N.; ČABARKAPA, V.; BORIŠEV, I.; ČAPO, I.; MILJKOVIĆ, D.; STILINOVIĆ, N.; MIKOV, M. Hepatoprotective and antioxidant potential of Pycnogenol® in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 3, p. 631-639, 2019.

RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, n., p. 151, 2014.

SABIR, S. M.; ROCHA, J. B. T.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Hepatoprotective activity and phenolic profile of *Zanthoxylum alatum* Roxb. fruit extract. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 30, n. 5, p., 2017.

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.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006a.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; HUANG, D.; OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart.(acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8604-8610, 2006b.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, n., p. 739-789, 2005.

SEBEN, V. C.; DE WALLAU LUGOCH, R.; SCHLINKER, C. S.; ARBO, M. D.; VIANNA, R. L. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 2, p. 143-148, 2010.

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

SHARMA, C. V.; MEHTA, V. Paracetamol: mechanisms and updates. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 14, n. 4, p. 153-158, 2013.

SHEN; CHEN, X.; HENDERSHOT, L.; PRYWES, R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. **Developmental cell**, v. 3, n. 1, p. 99-111, 2002.

SHEN; KONG, A. N. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 30, n. 7, p. 345-355, 2009.

SILVA. Efeito protetor do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) na doença hepática gordurosa não alcoólica mediado pelo aumento dos níveis de paraoxonase-1 e redução da oxidação de LDL em ratos. v., n., p., 2017.

SILVA; BECKMAN, A.; RODRIGUES, A.; SILVA, L. Avaliação da composição nutricional e capacidade antioxidante de compostos bioativos da polpa de açaí. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 11, n. 1, p. 2205-2216, 2017.

SILVA; BATISTA, A.; DA COSTA, D. C. F.; MOURA-NUNES, N.; KOURY, J. C.; DA COSTA, C. A.; RESENDE, Â. C.; DALEPRANE, J. B. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) seed flour prevents obesity-induced hepatic steatosis regulating lipid metabolism by increasing cholesterol excretion in high-fat diet-fed mice. **Food Research International**, v., n., p., 2018.

SLATTERY, J. T.; NELSON, S. D.; THUMMEL, K. E. The complex interaction between ethanol and acetaminophen. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 60, n. 3, p. 241-246, 1996.



SOARES, E. R.; MONTEIRO, E. B.; GRAZIELE, F.; INADA, K. O.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; SOULAGE, C. O.; MONTEIRO, M. C.; RESENDE, A. C.; MOURA-NUNES, N. Up-regulation of Nrf2-antioxidant signaling by Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. **Journal of Functional Foods**, v. 37, n., p. 107-115, 2017.

SONG, E.; FU, J.; XIA, X.; SU, C.; SONG, Y. Bazhen decoction protects against acetaminophen induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107405, 2014.

SOUZA, M. O. D.; SANTOS, R.; SILVA, M.; PEDROSA, M. Açai (*Euterpe oleracea* Martius): Chemical composition and bioactivity. **J. Braz. Soc. Food Nutr**, v. 36, n. 161, p. e169, 2011.

STINE, J. G.; CHALASANI, N. Chronic liver injury induced by drugs: a systematic review. **Liver International**, v. 35, n. 11, p. 2343-2353, 2015.

SUBRAMANYA, S.; VENKATARAMAN, B.; MEERAN, M.; GOYAL, S.; PATIL, C.; OJHA, S. Therapeutic Potential of Plants and Plant Derived Phytochemicals against Acetaminophen-Induced Liver Injury. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 3776, 2018.

SZEGEZDI, E.; LOGUE, S. E.; GORMAN, A. M.; SAMALI, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **EMBO reports**, v. 7, n. 9, p. 880-885, 2006.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 907-914, 2010.

TOSKA, E.; ZAGORSKY, R.; FIGLER, B.; CHENG, F. Transcriptomic studies on liver toxicity of acetaminophen. **Drug development research**, v. 75, n. 6, p. 419-423, 2014.

UDANI, J. K.; SINGH, B. B.; SINGH, V. J.; BARRETT, M. L. Effects of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: a pilot study. **Nutrition journal**, v. 10, n. 1, p. 45, 2011.

URANO, F.; WANG, X.; BERTOLOTTI, A.; ZHANG, Y.; CHUNG, P.; HARDING, H. P.; RON, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 664-666, 2000.

UZI, D.; BARDA, L.; SCAIEWICZ, V.; MILLS, M.; MUELLER, T.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, A.; VALVERDE, A. M.; IWAWAKI, T.; NAHMIA, Y.; XAVIER, R. CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 3, p. 495-503, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VEMBAR, S. S.; BRODSKY, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 12, p. 944, 2008.

VERMA, P. K.; RAINA, R.; SULTANA, M.; PRAWEZ, S.; JAMWAL, N. Hepatoprotective mechanisms of *Ageratum conyzoides* L. on oxidative damage induced by acetaminophen in Wistar rats. **Free radicals and antioxidants**, v. 3, n. 2, p. 73-76, 2013.

WADDINGTON, J. C.; MENG, X.; NAISBITT, D. J.; PARK, B. K. Immune Drug-Induced Liver Disease and Drugs. **Current Opinion in Toxicology**, v., n., p., 2017.

WANG; KAUFMAN, R. J. How does protein misfolding in the endoplasmic reticulum affect lipid metabolism in the liver? **Current opinion in lipidology**, v. 25, n. 2, p. 125-132, 2014.

WANG; JIANG, Y.; FAN, X.; TAN, H.; ZENG, H.; WANG, Y.; CHEN, P.; HUANG, M.; BI, H. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways. **Toxicology letters**, v. 236, n. 2, p. 82-89, 2015.

WEBER, D.; DAVIES, M. J.; GRUNE, T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions. **Redox biology**, v. 5, n., p. 367-380, 2015.

WHITCOMB, D. C.; BLOCK, G. D. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. **Jama**, v. 272, n. 23, p. 1845-1850, 1994.

WU, S.; TAN, M.; HU, Y.; WANG, J.-L.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J. Ultraviolet light activates NF $\kappa$ B through translational inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34898-34902, 2004.

XIE, C.; KANG, J.; BURRIS, R.; FERGUSON, M. E.; SCHAUSS, A. G.; NAGARAJAN, S.; WU, X. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327-333, 2011.

YAHYA, F.; MAMAT, S.; KAMAROLZAMAN, M.; SEYEDAN, A.; JAKIUS, K.; MAHMOOD, N.; SHAHRIL, M.; SUHAILI, Z.; MOHTARRUDIN, N.; SUSANTI, D. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Bauhinia purpurea* leaves against paracetamol-induced hepatic damage in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n., p., 2013.

YAMAMOTO, K.; ICHIJO, H.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 12, p. 8469-8478, 1999.

YAN-ZI, L.; ZHI-NA, M.; YIN-SHI, S.; SHEN, R.; JIANG, S.; ZHANG, W.-Z.; ZI, W.; WEI, L. Protective effects of extracts of Schisandra chinensis stems against acetaminophen-induced hepatotoxicity via regulation of MAPK and caspase-3 signaling pathways. **Chinese journal of natural medicines**, v. 16, n. 9, p. 700-713, 2018.

YAN, M.; HUO, Y.; YIN, S.; HU, H. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. **Redox biology**, v., n., p., 2018.

YANG, J.-J.; TAO, H.; HUANG, C.; LI, J. Nuclear erythroid 2-related factor 2: a novel potential therapeutic target for liver fibrosis. **Food and chemical toxicology**, v. 59, n., p. 421-427, 2013.

YE; RAWSON, R. B.; KOMURO, R.; CHEN, X.; DAVÉ, U. P.; PRYWES, R.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. **Molecular cell**, v. 6, n. 6, p. 1355-1364, 2000.

YE; NELSON, L. J.; DEL MORAL, M. G.; MARTÍNEZ-NAVES, E.; CUBERO, F. J. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 13, p. 1373, 2018.

YEN, F.-L.; WU, T.-H.; LIN, L.-T.; CHAM, T.-M.; LIN, C.-C. Nanoparticles formulation of Cuscuta chinensis prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 5, p. 1771-1777, 2008.

YOSHIDA, H.; MATSUI, T.; HOSOKAWA, N.; KAUFMAN, R. J.; NAGATA, K.; MORI, K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. **Developmental cell**, v. 4, n. 2, p. 265-271, 2003.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. What is oxidative stress? **Japan medical association journal**, v. 45, n. 7, p. 271-276, 2002.

ZHANG, L.; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Frontiers in plant science**, v. 3, n., p. 293, 2012.

ZITKA, O.; SKALICKOVA, S.; GUMULEC, J.; MASARIK, M.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; TRNKOVA, L.; KRUSEOVA, J.; ECKSCHLAGER, T.; KIZEK, R. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. **Oncology letters**, v. 4, n. 6, p. 1247-1253, 2012.

## ANEXO - Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ufop.br](mailto:ceua@ufop.br)



## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2017/27, intitulado "*Potencial da polpa de açai (Euterpe oleracea Mart.) na modulação do estresse oxidativo e inflamação induzidos por paracetamol em ratos Fischer*", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a) Maria Lucia Pedrosa, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP - CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
<i>Ratus norvegicus/ Fischer</i>	52	60 dias	Fêmea	Biotério do Laboratório de Nutrição Experimental (ENUT)

Restrição de dieta: ( ) sim ( x ) não

Especificar a dieta:

**Este Certificado expira em: 01/03/2019**

Ouro Preto, 30 de agosto de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira  
Coordenadora da CEUA/UFOP.