



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIRIAM SAYURI NAGASHIMA HOHMANN

**PARTICIPAÇÃO DA 5-LIPOXIGENASE NA LETALIDADE E
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDAS PELO
ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

Londrina
2012

MIRIAM SAYURI NAGASHIMA HOHMANN

**PARTICIPAÇÃO DA 5-LIPOXIGENASE NA LETALIDADE E
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDAS PELO
ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

H719p Hohmann, Miriam Sayuri Nagashima.
Participação da 5-lipoxigenase na letalidade e hepatotoxicidade induzidas pelo acetaminofeno em camundongos / Miriam Sayuri Nagashima Hohmann. – Londrina, 2012.
78 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Acetaminofeno – Teses. 2. Fígado – Doenças – Teses. 3. Intoxicação – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. 6. Farmacologia experimental – Teses. I. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 615:616.36

MIRIAM SAYURI NAGASHIMA HOHMANN

**PARTICIPAÇÃO DA 5-LIPOXIGENASE NA LETALIDADE E
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDAS PELO ACETAMINOFENO EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Phileno Pinge-Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profª. Dra. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida. Obrigada pela força e coragem para realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior, pela orientação, apoio, paciência e conhecimentos científicos. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender em seu laboratório.

Aos meus pais, Celso e Regina, que nunca mediram esforços para me incentivar e apoiar. Muito obrigada pela força, carinho e orgulho que sentem por mim. Sou muito grata à formação que vocês me deram. Se hoje cheguei até aqui, é graças a vocês!

Ao Matheus pelo companherismo, apoio e palavras de carinho. Obrigada por SEMPRE me incentivar e estar ao meu lado. Agradeço, também, pela compreensão, mesmo nos momentos em que a dedicação aos estudos e a este trabalho foi exclusiva. A família Tófoli, que são pessoas maravilhosas que sempre me incentivaram. Obrigada por incluírem em seu convívio familiar.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer da Universidade Estadual de Londrina. Obrigada pela agradável convivência e auxílio, direta ou indiretamente, nos experimentos.

A todos meus amigos e familiares pela amizade, incentivo, carinho e momentos de descontração!

Ao Jesus (Zui) e Pedro pelo apoio técnico, muito obrigada. Gostaria de agradecer também a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (Decit/SCTIE), Ministério da Saúde (MS) (Decit/SCTIE/MS) por intermédio do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e o apoio Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

HOHMANN, Miriam Sayuri Nagashima. **Participação da 5-lipoxigenase na letalidade e hepatotoxicidade induzidas pelo acetaminofeno em camundongos**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A via da 5-lipoxigenase (5-LO) é responsável pela conversão do ácido araquidônico (AA) em leucotrienos (LTs). Os LTs são importantes mediadores pró-inflamatórios encontrados em altas concentrações na maioria das lesões inflamatórias. A via da 5-LO desempenha papel central na resposta inflamatória às lesões, já que a mesma é capaz de desenvolver e propagar a inflamação. A participação da 5-LO tem sido demonstrada em diferentes modelos de lesão hepática, no entanto, até o presente momento, sua participação na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno (APAP) ainda não foi investigada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da 5-LO na letalidade e hepatotoxicidade induzidas pelo APAP. Além disso, buscou-se investigar a participação da 5-LO na inflamação e no estresse oxidativo hepático induzidos por esta droga. Camundongos machos deficientes para a 5-LO (5-LO^{-/-}) e respectivo controle selvagem (WT, Sv129) foram tratados com APAP (3g/kg, v.o.) ou volume equivalente de salina. Após 12h, a lesão hepática foi avaliada pela determinação dos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), o recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático pela determinação da atividade da mieloperoxidase, a produção de citocinas e mediadores inflamatórios pela dosagem hepática de LTB₄, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10 e a depleção da capacidade antioxidante pela determinação dos níveis hepáticos de glutathiona (GSH) reduzida e capacidade antioxidante do fígado pelo ensaio do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). Foi observado que o APAP induz a produção de LTB₄ no fígado, o órgão alvo primário da intoxicação por APAP. Além disso, foi verificado que a letalidade, o aumento dos níveis plasmáticos de AST e ALT, da atividade da mieloperoxidase, da produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10 no fígado, e a depleção de GSH e da capacidade antioxidante do fígado induzidos pelo APAP, estavam inibidos ou reduzidos em camundongos 5-LO^{-/-} quando comparados com camundongos WT. Camundongos WT e 5-LO^{-/-} apresentaram respostas semelhantes no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital sódico, portanto, a redução da letalidade e hepatotoxicidade em camundongos 5-LO^{-/-} não pode ser explicada por uma possível menor formação do metabólito tóxico N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI). Assim, os resultados deste estudo demonstram a participação da 5-LO na letalidade e hepatotoxicidade induzidas pelo APAP. Além disso, indicam que a 5-LO participa da inflamação e estresse oxidativo hepático induzido pelo APAP.

Palavras-chave: 5-lipoxigenase. Leucotrieno B₄. Acetaminofeno. Hepatotoxicidade. Inflamação

HOHMANN, Miriam Sayuri Nagashima. **5-lipoxygenase participates in acetaminophen-induced lethality and hepatotoxicity in mice.** 2012. 78f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) –Londrina State University, Londrina. 2012.

ABSTRACT

The 5-lipoxygenase (5-LO) pathway is responsible for converting arachidonic acid (AA) into leukotrienes (LTs). LTs are important pro-inflammatory mediators that can be found in high levels in most inflammatory lesions. 5-LO pathway plays an important role in inflammatory response to injury, since it can develop and sustain inflammation. Many studies have demonstrated that 5-LO is involved in the pathogenesis of different models of liver injury, however, their participation in acetaminophen (APAP) induced hepatotoxicity has not been investigated. Thus, the objective of this study was to evaluate the participation of 5-LO in APAP-induced lethality and hepatotoxicity. In addition, it aimed to investigate the role of 5-LO in liver inflammation and oxidative stress induced by this drug. Male 5-LO deficient (5-LO^{-/-}) and strain-matched wild type (WT, Sv129) mice were treated with APAP (3g/kg, p.o.) or equal volume of saline. After 12h, liver injury was assessed by determining plasma aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels, neutrophil recruitment to the liver by myeloperoxidase activity determination, cytokine and inflammatory mediator production by determining LTB₄, IL-1β, TNF-α, IFN-γ, and IL-10 levels in the liver, and depletion of antioxidants by determining reduced glutathione (GSH) levels and antioxidant capacity by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate; ABTS) assay in the liver. It was observed that APAP induces LTB₄ production in the liver, which is the primary target organ in APAP toxicity. Furthermore, APAP-induced lethality, increase of plasma AST and ALT levels, myeloperoxidase activity, IL-1β, TNF-α, IFN-γ, and IL-10 production in the liver, and depletion of GSH and antioxidant capacity in the liver were inhibited or reduced in 5-LO^{-/-} mice compared to WT mice. WT and 5-LO^{-/-} mice presented similar response in the "sleeping time" induced by sodium pentobarbital, therefore, reduced formation of the toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) does not explain reduced lethality and hepatotoxicity in 5-LO^{-/-} mice. Therefore, the results of this study not only demonstrates that 5-LO participates in APAP-induced lethality and hepatotoxicity, but also that 5-LO is involved in the liver inflammation and oxidative stress induced by this drug.

Keywords: 5-lipoxygenase. Leukotriene B₄. Acetaminophen. Hepatotoxicity. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese dos leucotrienos pela via da 5-lipoxigenase	12
Figura 2 – Metabolismo do acetaminofeno.....	15
Figura 3 – Participação da 5-LO nos mecanismos envolvidos na lesão hepática induzida por APAP	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ABTS ^{•+}	Radical cátion ABTS
ALT	Alanina aminotransferase
APAP	Acetaminfeno
AST	Aspartato aminotransferase
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FLAP	Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
GSH	Glutationa
15-HETE	Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico
HMGB1	Proteína de alta mobilidade box 1
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
JNK	C-jun-N-terminal quinase
LO	Lipoxigenase
5-LO ^{-/-}	Deficientes para a 5-LO
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetil-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
NF κ B	Fator nuclear kappa B

RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral
v.o.	Via oral
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular 1
WT	Controle selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	LEUCOTRIENOS.....	11
1.2	LIPOXINAS.....	13
1.3	PARTICIPAÇÃO DA 5-LIPOXIGENASE NA LESÃO HEPÁTICA.....	14
1.4	HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO.....	14
1.5	PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO	16
1.6	NEUTRÓFILOS NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO	18
1.7	ESTRESSE OXIDATIVO NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO.....	19
1.8	JUSTIFICATIVA.....	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	ANIMAIS.....	24
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DAS AMOSTRAS	25
3.3	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES ENZIMÁTICOS DE LESÃO HEPÁTICA	25
3.4	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LTB ₄ E CTOCINAS.....	25
3.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MPO	25
3.6	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH	26
3.7	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	26
3.8	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL SÓDICO.....	26
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	ARTIGO: 5-LIPOXYGENASE DEFICIENCY REDUCES ACETAMINOPHEN- INDUCED LETHALITY AND HEPATOTOXICITY	29
4.1.1	Figure 1: Acetaminophen Induces Dose Dependent Lethality and LTB ₄ Production in the Liver.....	55
4.1.2	Figure 2: Acetaminophen Induces 5-LO-Dependent Lethality.....	56

4.1.3	Figure 3: Acetaminophen Induces 5-LO-Dependent Liver Damage	57
4.1.4	Figure 4: Acetaminophen Induces 5-LO-Dependent Neutrophil Recruitment5	58
4.1.5	Figure 5: Acetaminophen Induces 5-LO-Dependent Induction of Cytokine Production in the Liver	59
4.1.6	Figure 6: Acetaminophen Induces the Depletion of Reduced Glutathione and Antioxidant Capacity in the Liver in a 5-LO-Dependent Manner	60
4.1.7	Table 1- Effect of 5-LO Deficiency on Sodium Pentobarbital Induced Sleeping Time in Mice	61
CONCLUSÕES		62
PERSPECTIVAS FUTURAS		64
REFERÊNCIAS		65
ANEXOS		71
	ANEXO A –Normas do periódico Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology	72
	ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEUCOTRIENOS

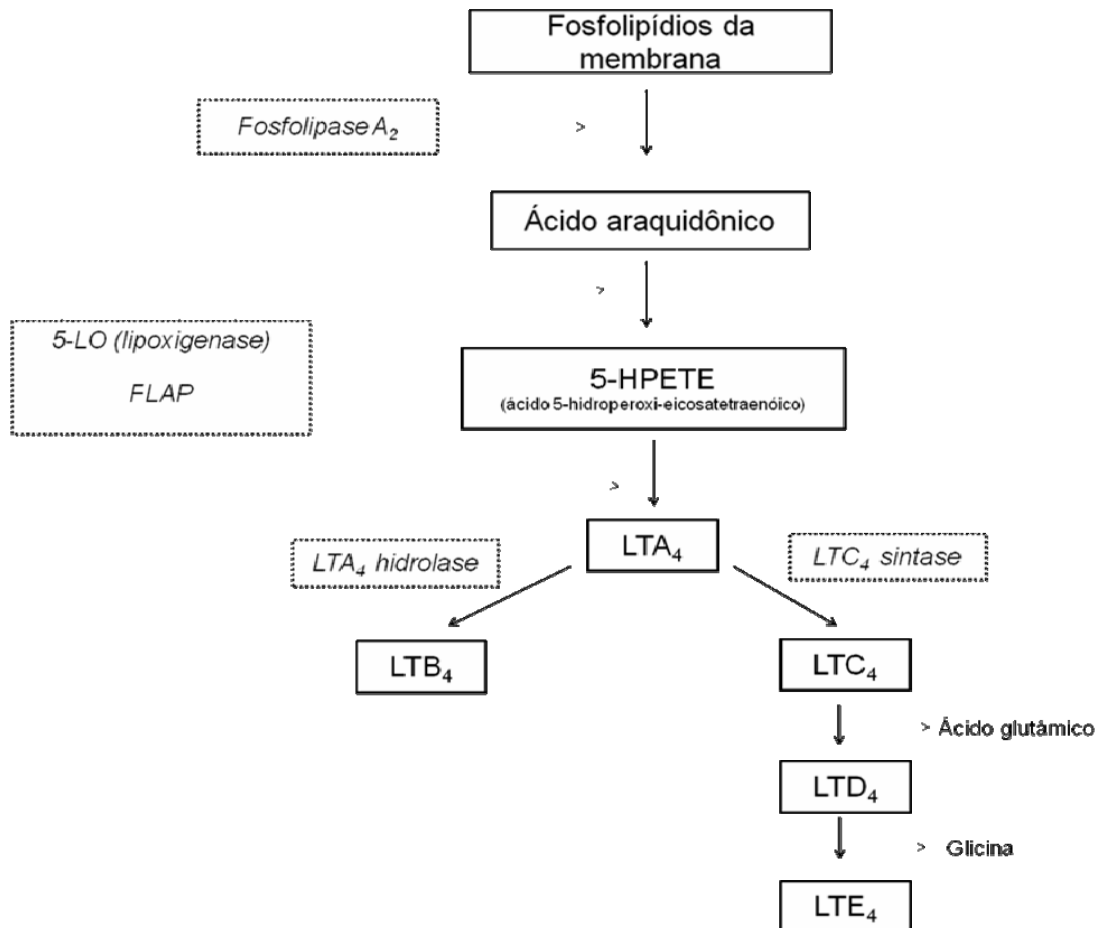
A via da 5-lipoxigenase (5-LO) desempenha papel central na resposta inflamatória às lesões. Estudos indicam que esta via contribui para desenvolvimento e propagação da inflamação em diversas doenças inflamatórias (FUNK, 2001; RUBIN; MOLLISON, 2007), uma vez que a 5-LO é responsável pela biossíntese de mediadores pró-inflamatórios importantes, os leucotrienos (LTs). Os LTs são sintetizados predominantemente em células de origem mielóide através do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela via da 5-LO (Figura 1). A 5-LO interage com sua proteína ativadora (FLAP) e catalisa a reação de duas etapas, nas quais o AA é transformado no produto intermediário, ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico, e em seguida é desidratado para formar o LTA_4 . O LTA_4 é instável e possui meia vida curta, sendo rapidamente convertido em LTB_4 pela ação da LTA_4 hidrolase ou é conjugado com a glutatona pelo LTC_4 sintase, gerando o LTC_4 . Em seguida, a retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC_4 dá origem ao LTD_4 e com a retirada da glicina do LTD_4 , forma-se o LTE_4 . O LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 são conhecidos coletivamente como cisteinil LTs ou LTs peptídicos (CHO; SEO; KIM, 2011).

Todos os LTs desempenham papéis importantes na inflamação, no entanto o LTB_4 e os cisteinil LTs possuem atividades biológicas diferentes. O LTB_4 é um dos mais potentes mediadores pró-inflamatórios e da quimiotaxia de polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) (FORD-HUTCHINSON et al., 1980) e, quando comparado com os outros produtos da 5-LO, é capaz de exercer um efeito quimiotático muito maior. Em concentrações baixas, o LTB_4 é capaz de estimular leucócitos circulantes a aderirem ao endotélio e transmigrarem. Já em concentrações mais altas, este mediador induz leucócitos polimorfonucleares a liberarem mediadores citotóxicos e pró-inflamatórios, assim como proteases e elastases, no local da inflamação, propagando, assim, a inflamação e lesão tecidual (CHO; SEO; KIM, 2011).

As atividades do LTB_4 nas respostas imunes e patogênese de doenças inflamatórias são mediadas pelos receptores BLT1 e BLT2, porém o LTB_4 apresenta maior afinidade pelo primeiro (TAGER; LUSTER, 2003). O BLT1 está expresso em diversas células do sistema imune como os neutrófilos, monócitos/macrófagos e células dendríticas, entre outras, e também em algumas células não hematopoiéticas, como as células endoteliais e células da musculatura lisa vascular. A ativação deste receptor pode promover a quimiotaxia e

adesão firme de leucócitos, a degranulação de neutrófilos, inibição da apoptose e indução de fagocitose em macrófagos (KIM; LUSTER, 2007). Em humanos o BLT2 é amplamente expresso em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, mastócitos, células dendríticas, células do baço, fígado, ovários, pâncreas e coração, e já foi implicado na síntese de IL-8 induzida por IL-1 β (KIM et al., 2010). Já em camundongos, a expressão do BLT2 está restrita a alguns tecidos e tipos de células como o intestino curto, cólon, mastócitos e queratinócitos (LUNDEEN et al., 2006). Apesar de estudos já terem demonstrado que este receptor possui papel importante na artrite inflamatória induzida por auto-anticorpos e na manutenção da integridade da mucosa intestinal em camundongos (IIZUKA et al., 2010; MATHIS et al., 2010), pouco se sabe ainda sobre as respostas biológicas mediadas pelo BLT2 em murinos.

Figura 1 - Biossíntese dos leucotrienos pela via da 5-lipoxigenas



Fonte: Cho, Seo, Kim, 2011

Os cisteinil LTs, por outro lado, foram inicialmente identificados como constituintes da substância de reação lenta da anafilaxia (ARM, 2004). Estes produtos da 5-LO parecem estar mais envolvidos em processos inflamatórios crônicos. Estes mediadores

induzem a contração das vias aéreas e das células da musculatura lisa e o aumento na permeabilidade vascular, promovendo, assim, a broncoconstrição e edema, além de aumentar a secreção de muco nos brônquios. Além disso, estes mediadores são diretamente responsáveis pelo recrutamento e ativação de eosinófilos e outras células do sistema imune em condições atópicas. Desta forma, os cisteinil LTs têm sido implicados principalmente na patogênese da asma e alergias, como a rinite e dermatite atópica (KIM; LUSTER, 2007).

1.2 LIPOXINAS

A via da 5-LO também é responsável pela biossíntese de lipoxinas (LXs), as quais são capazes de controlar a duração e a magnitude da inflamação. LXs, como a LXA₄ e LXB₄, são mediadores com potentes ações anti-inflamatórias e imunomoduladores tanto *in vitro*, como *in vivo* (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Duas principais vias de produção destes mediadores foram estabelecidas. A primeira depende da interação entre leucócitos e plaquetas. A 5-LO presente em leucócitos converte o AA em LTA₄. Este é liberado e sofre ação da 12-LO presente em plaquetas, formando as LXs. Já a segunda via depende da interação entre células epiteliais e leucócitos e se inicia na superfície da mucosa. O AA é transformado no produto intermediário, o ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15S-HETE), pela ação da 15-LO, e é rapidamente convertido em LXs pela 5-LO presente em leucócitos. Além disso, existe uma terceira via de produção dependente da 5-LO, a via de produção de LX desencadeada pela aspirina. Nesta via, a ciclooxigenase-2 acetilada pela aspirina perde sua capacidade de formar a prostaglandina H₂ e passa a produzir o 15R-HETE a partir do AA. A 5-LO converte este intermediário em 15-epi-lipoxinas, estereoisômeros relativamente estáveis das LXs, denominados de LXs desencadeadas pela aspirina (CHIANG et al., 2006).

As LXs exercem seu efeito anti-inflamatório ao inibir o recrutamento e transmigração de neutrófilos, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e LTs (CHIANG et al., 2006; SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Além de possuir efeitos anti-inflamatórios, estes mediadores também estimulam a resolução da inflamação. As LXs estimulam macrófagos a fagocitarem células que sofreram apoptose no local da inflamação, diminuindo, assim, o excesso de danos teciduais (GODSON et al., 2000). Elas também estimulam a produção de IL-10 em macrófagos (SCHWAB et al., 2007) e promovem o efluxo de macrófagos para linfonodos periféricos (SERHAN; CHIANG; VAN

DYKE, 2008). Desta forma, as LXs não só reduzem a infiltração de leucócitos, como também promovem a remoção dos mesmos do local da inflamação.

1.3 PARTICIPAÇÃO DA 5-LIPOXIGENASE E DOS LEUCOTRIENOS NA LESÃO HEPÁTICA

Em diversos modelos de lesão hepática, aumento na produção de LT tem sido observado. Macrófagos peritoneais e células de Kupffer de ratos com esteatose e fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono, apresentam produção aumentada destes mediadores (ALRIC et al., 1996, 2000). Já em modelo de lesão hepática por isquemia e reperfusão, o aumento de LTs observado foi associado ao desenvolvimento de edema e disfunção hepática (TAKAMATSU et al., 2004). Além disso, estes e outros estudos demonstraram que a 5-LO e os LTs estão envolvidos na inflamação e lesão hepática, já que a inibição da via da 5-LO reduziu a inflamação e a extensão de lesões no fígado (TITOS et al., 2003, 2010). Foi observado, também, que a inibição da 5-LO foi fator protetor para fibrose e lesão hepática necroinflamatória (TITOS et al., 2005; HORRILLO et al., 2007). Desta forma, a 5-LO e os LTs participam da inflamação e lesão hepática.

1.4 HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO

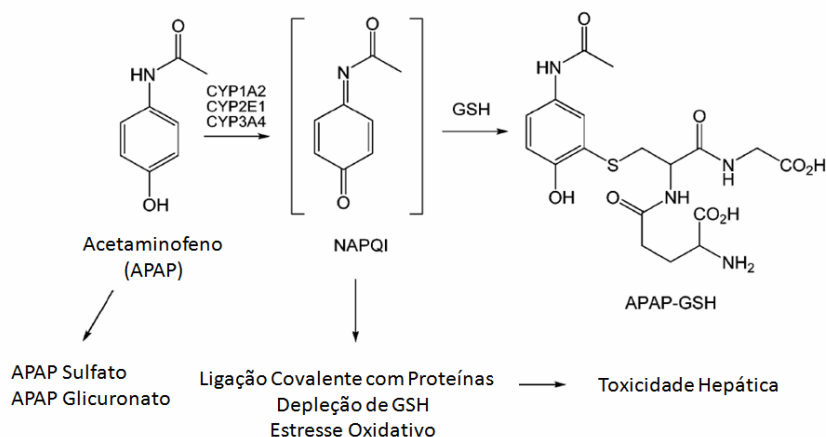
O acetaminofeno (APAP), também conhecido como paracetamol, é um anti-inflamatório não-esteroidal amplamente utilizado por seus efeitos analgésicos e antipiréticos. Este medicamento é considerado seguro em doses terapêuticas, doses abaixo de 4 g/dia para adultos e 80 mg/kg para crianças. No entanto, a ingestão aguda de mais 7 g (adultos) e 150-200 mg/kg (crianças) já são consideradas potencialmente tóxicas. Já a ingestão de doses acima de 15 g pode acarretar uma intoxicação fatal (CLARK et al., 2012; KATZUNG, 2005). A intoxicação por APAP pode acometer os rins, o fígado, coração e sistema nervoso central, no entanto a morte por intoxicação aguda da droga é secundária, principalmente, à disfunção hepática e falência hepática aguda (PRESCOTT, 1980), sendo estas caracterizadas pela necrose hepática centrolobular (MITCHELL et al., 1973a).

Hepatotoxicidade por APAP já é uma das causas mais comuns de falência hepática aguda em muitos países desenvolvidos (BERNAL; AUZINGER; WENDON, 2009; LARSON et al., 2005; WEI et al., 2007). Apesar de ainda não existirem dados precisos das principais causas de falência hepática aguda no Brasil, estudos demonstram que o número de casos de intoxicação por APAP vem aumentando nos últimos anos (ANDRADE; DIAS,

2001; SCHUH, 2007). De acordo com o Centro de Informação Toxicológica (CIT) do Rio Grande do Sul, nos últimos anos, os analgésicos/antipiréticos têm sido uma das principais classes de agentes envolvidas nas exposições a agentes tóxicos, sendo que, dentre os medicamentos desta classe, o APAP foi responsável por mais de 60% dos casos. (CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2010, 2009, 2008). Assim, é possível que falência hepática aguda decorrente da hepatotoxicidade por APAP também seja elevado no Brasil.

O passo inicial para a lesão hepática é a metabolização do APAP e a formação do metabólito altamente reativo, N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) (Figura 2) (MITCHELL et al., 1973a). Em doses terapêuticas, mais de 90% do APAP sofre glicuronidação ou sulfatação e é eliminado pela excreção renal ou biliar. Apenas uma porcentagem pequena é metabolizada pelo sistema microsomal P450, principalmente pelo citocromo 2E1, produzindo a NAPQI (PATTEN et al., 1993). Este metabólito é quase que imediatamente detoxificado pela conjugação com a glutationa (GSH) hepática. No entanto, na intoxicação por APAP, há saturação das vias de glicuronidação e sulfatação, resultando em excesso de formação de NAPQI, que, por sua vez, depleta os níveis de GSH (MITCHELL et al., 1973b). Assim, a NAPQI se torna disponível para ligar com proteínas celulares importantes (JOLLOW et al., 1973), principalmente proteínas mitocondriais (JAESCHKE et al., 2012).

Figura 2 - Metabolismo do Acetaminofeno



Fonte: Adaptado de Baillie e Rettie, 2011

Após a ligação covalente do NAPQI com proteínas da mitocôndria ocorrem estresse oxidativo e disfunção na respiração mitocondrial (COVER et al., 2005), iniciando, assim, a lesão celular no fígado. Em seguida, há ativação de mediadores como c-jun-N-

terminal quinase (JNK), translocação da Bax, alteração da permeabilidade mitocondrial, translocação de proteínas mitocondriais como o Fator Indutor de Apoptose e a Endonuclease G para o núcleo que, por sua vez, leva à fragmentação do DNA, necrose oncótica das células parenquimais e amplificação da lesão hepática (JAESCHKE et al., 2012). Além disso, durante a necrose hepatocelular, há liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como a proteína de alta mobilidade box 1 (HMGB1), proteínas de choque térmico, fragmentos de DNA, entre outras, que são capazes de ativar células não parenquimais, como as células de Kupffer, células endoteliais e neutrófilos (MARTIN-MURPHY; HOLT; JU, 2010).

Além dos eventos que ocorrem nos hepatócitos, tem sido atribuído papel importante às células não parenquimais nas lesões hepáticas por APAP. O acúmulo de macrófagos no fígado está associado à hepatotoxicidade por APAP e diversos outros agentes hepatotóxicos (GRATTAGLIANO et al., 2009). Quando expostos ao APAP estas células apresentam atividade fagocítica, quimiotática e citotóxica aumentada, podendo contribuir, assim, com as lesões. Além disso, a inibição da ativação de macrófagos (LASKIN et al., 1995) e depleção das células de Kupffer (ANDRÉS et al., 2003) parecem ser fatores protetores para as lesões hepáticas induzidas pelo APAP e outros agentes hepatotóxicos.

Existem evidências de que as células parenquimais e não parenquimais interagem entre si na hepatotoxicidade por APAP. Células endoteliais, células de Kupffer e neutrófilos também podem ser quimioatraídas e ativadas por mediadores inflamatórios (por exemplo, LTB_4 , óxido nítrico, HMGB1) liberados pelos próprios hepatócitos lesionados (DRAGOMIR; LASKIN; LASKIN, 2011; GRATTAGLIANO et al., 2009). As células não parenquimais, quando ativadas, são fonte de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (MICHAEL et al., 1999), LTs (TITOS et al., 2003), citocinas pró-inflamatórias, enzimas lisossomais, fator de agregação plaquetária, entre outros capazes aumentar a resposta inflamatória e os danos teciduais (ROBERTS et al., 2007)

1.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO

O aumento na produção de citocinas inflamatórias tem sido observado e implicado na hepatotoxicidade por APAP. De acordo com estes estudos, as citocinas são importantes mediadores da hepatotoxicidade e, desta forma, pelo menos parcialmente responsáveis pela propagação da lesão iniciada pelo metabólito tóxico do APAP, o NAPQI (BLAZKA et al., 1995).

A administração de doses tóxicas de APAP é acompanhada do aumento nos níveis séricos e hepáticos de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, entre outras (BLAZKA et al., 1995; COVER et al., 2006). Estas citocinas são produzidas por diversas células, dentre elas as células de Kupffer, e desempenham papel central nas respostas inflamatórias (ROBERTS et al., 2007). Elas ativam neutrófilos e células endoteliais, promovem recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático e propagam a inflamação e lesão tecidual (LIU et al., 2006). Já o TNF- α estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e induz a liberação de EROs por células de Kupffer e neutrófilos infiltrados; as EROs contribuem para a necrose hepática (ROBERTS et al., 2007). Além disso, o TNF- α por si só é capaz gerar efeitos citotóxicos e induzir apoptose e necrose (LARRICK; WRIGHT, 1990). Ademais, a inibição das respostas da IL-1 e TNF- α reduz lesão hepática e outras manifestações da intoxicação por APAP, confirmando a participação destas citocinas nas lesões secundárias ao APAP (BLAZKA et al., 1996).

Aumento da expressão de RNAm para o IFN- γ após exposição a doses tóxicas de APAP também tem sido reportado e associado às lesões hepáticas decorrentes do APAP. Foi demonstrado que camundongos deficientes para o IFN- γ apresentam redução da lesão hepática induzida pelo APAP, menor recrutamento de leucócitos e redução da expressão de genes da IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , quimiocinas, moléculas de adesão e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) quando comparados com os controles selvagem. Além disso, o uso de anticorpos anti-IFN- γ diminuiu a inflamação, necrose hepática, assim como, a letalidade induzida pelo APAP (ISHIDA et al., 2002).

A IL-10, por outro lado, parece reduzir as lesões hepáticas por APAP. Níveis aumentados desta potente citocina anti-inflamatória também foram reportados na hepatotoxicidade por APAP e associadas à proteção contra a lesão hepática e letalidade induzida pelo APAP (BOURDI et al., 2002; GARDNER et al., 2002).

Estudos demonstram que a produção das citocinas pode ser modulada pela 5-LO e seus produtos. Os LTs, em particular o LTB $_4$, são sinais positivos para a expressão e síntese de citocinas em células inflamatórias (MARCOUILLER et al., 2005; SIPE; BARTLE; LOOSE, 1992). Além disso, já foi reportado aumento na produção de IL-1 β e TNF- α em monócitos, macrófagos e tecidos via LTB $_4$ (CONTE et al., 2008; GAGNON et al., 1989). Horrillo et al. (2007) verificaram que a produção da IL-6 também é modulada pelo LTB $_4$, já que somente o antagonista do receptor do LTB $_4$, e não dos cisteinil LTs, diminui expressão de RNAm para IL-6. Além de mediar a produção das citocinas, o LTB $_4$ também participa das respostas imunológicas induzidas por elas. O recrutamento de neutrófilos para a cavidade

peritoneal induzido pelo TNF- α ocorre por um mecanismo dependente do LTB₄ em modelo de resposta imune adaptativa (CANETTI et al., 2001).

A inibição da 5-LO permitiu que fosse evidenciado o papel desta via e de seus produtos na amplificação de lesões teciduais através da regulação da produção de citocinas inflamatórias (HORRILLO et al., 2007; MARCOUILLER et al., 2005). Na lesão hepática por isquemia e reperfusão, a inibição da 5-LO diminuiu os níveis hepáticos de IL-6, IL-1 β e TNF- α . Juntamente com a redução dos níveis dessas citocinas foi evidenciada diminuição da apoptose. Como os produtos da 5-LO são pelo menos parcialmente responsáveis pela expressão e produção de citocinas, foi possível relacionar a inibição da 5-LO com a diminuição de lesão hepática e apoptose mediado por citocinas pró-inflamatórias (DAGLER et al., 2009).

1.6 NEUTRÓFILOS NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO

Lesão hepática mediada por neutrófilos tem sido demonstrada na hepatotoxicidade por APAP (LIU et al., 2006) e em vários outros modelos experimentais como hepatite alcoólica (BAUTISTA, 2002), danos hepáticos por isquemia e reperfusão (JAESCHKE; FARHOOD; SMITH, 1990), entre outros (RAMAIAH; JAESCHKE, 2007). Apesar da ativação de neutrófilos ser essencial para a proteção do hospedeiro e a eliminação de restos celulares, os mesmos também podem agravar danos no tecido hepático e causar falência hepática (JAESCHKE; HASEGAWA, 2006). A presença de mediadores específicos que promovem quimiotaxia e ativação dos neutrófilos é essencial para a propagação dos danos hepáticos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, DAMPs (JAESCHKE et al., 2012), LTs e muitos outros mediadores têm sido associados ao recrutamento de neutrófilos para o fígado (RAMAIAH; JAESCHKE, 2007). Além disso, estes mediadores não só recrutam os neutrófilos para os sinusóides, mas também os ativam, induzindo a liberação de EROs, LTB₄, e proteases que, por sua vez, aumentam o recrutamento e ativação de neutrófilos e levam à exacerbação dos danos hepáticos causados por uma lesão inicial (COVER et al., 2006; JAESCHKE; HASEGAWA, 2006). Ademais, a depleção de neutrófilos diminuiu lesão hepática induzida por APAP, evidenciando, assim, a contribuição dos neutrófilos para a hepatotoxicidade induzida por esta droga (LIU et al., 2006; SMITH et al., 1998).

Estudos indicam que a 5-LO é responsável pela lesão tecidual e inflamação induzida pelo recrutamento de neutrófilos. Sua ativação durante a inflamação aguda pode

mediar as interações leucócito-endotélio através da regulação da expressão da P-selectina, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) (CUZZOCREA et al., 2003a). Além disso, a ausência da 5-LO reduz a expressão das moléculas de adesão E-selectina, P-selectina e ICAM-1, regulando, assim, o recrutamento de neutrófilos na fase de rolamento e adesão firme (CUZZOCREA et al., 2003b). Ademais, foi observado correlação entre a redução da migração de neutrófilos e diminuição dos danos teciduais em camundongos deficientes para a 5-LO em modelo de pancreatite aguda. A participação do LTB₄ no recrutamento e quimiotaxia de neutrófilos já foi descrito em inúmeros estudos (MONTEIRO et al., 2011). Este mediador aumenta a expressão de CD11/CD18 na superfície dos neutrófilos, estimulando a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular e facilitando a migração destas células ao tecido adjacente (KIM; LUSTER, 2007). Além disso, o LTB₄ é um dos mais potentes mediadores da quimiotaxia de neutrófilos (FORD-HUTCHINSON et al., 1980).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO NA HEPATOTOXICIDADE POR ACETAMINOFENO

O estresse oxidativo é outro mecanismo importante que já foi implicado na hepatotoxicidade por APAP. Vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo contribui para a propagação da lesão hepática induzida pelo APAP (JAESCHKE; KNIGHT; BAJIT, 2003; REID et al., 2005).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio no sistema pró-oxidantes e antioxidantes. Isto pode resultar de um excesso de produção de agentes oxidantes (espécies reativas) ou da depleção das defesas antioxidantes.

Aumento nos níveis hepáticos de EROs e ERNs pode ser observado após exposição a doses tóxicas de APAP. Diversas fontes de espécies reativas têm sido reportadas. Liu et al. (2006) demonstrou que neutrófilos hepáticos isolados de camundongos previamente tratados com doses tóxicas de APAP exibem produção aumentada de ânion superóxidos e peróxido de hidrogênio. As células de Kupffer, quando ativadas por mediadores inflamatórios liberados durante a própria lesão hepática, também são uma importante fonte de espécies reativas (ALRIC et al., 2000; GRATTAGLIANO et al., 2009). Além disso, durante a própria formação da NAPQI pelo citocromo P450 também há produção do ânion superóxido, que sofre dismutação, formando, assim, o peróxido de hidrogênio (JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que as espécies reativas são mediadores da lesão hepatocelular por APAP. A síntese aumentada de óxido nítrico, por exemplo, se correlaciona positivamente com os níveis de alanina aminotransferase (ALT), marcador de lesão hepática. As espécies reativas podem iniciar a peroxidação de membranas fosfolipídicas, oxidação de proteínas, alterações no DNA, contribuindo, assim, para lesão hepática (MICHAEL et al., 1999).

O ânion superóxido e óxido nítrico, que estão presente em altos níveis na hepatotoxicidade por APAP, podem rapidamente reagir para formar o peroxinitrito, um importante mediador de lesão tecidual. Esta espécie reativa promove a nitração de resíduos de tirosina em proteínas resultando em necrose nas regiões centrolobulares do fígado, o que parece estar correlacionado com a severidade da toxicidade. O peroxinitrito também é um potente agente oxidante capaz de propagar lesões hepáticas, especialmente em condições de depleção dos antioxidantes celulares (KNIGHT et al., 2002).

Em condições normais os peróxidos são detoxificados pela GSH/GSH peroxidase, no entanto, na hepatotoxicidade por APAP este importante mecanismo de defesa encontra-se comprometido (RADI et al., 1991). Assim, o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito se acumulam e dão início à peroxidação lipídica, o principal mecanismo de morte celular induzida por EROs (KNIGHT et al., 2002). A peroxidação lipídica promove a destruição de membranas celulares e culmina rapidamente em morte dos hepatócitos por necrose (RADI et al., 1991).

Além da GSH, antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase, GSH peroxidase e GSH redutase também se encontram reduzidos após administração de APAP (AHMAD et al., 2012). Estes antioxidantes são essenciais para o controle da produção e detoxificação de espécies reativas, a defesa contra o estresse oxidativo, manutenção da homeostase redox e eliminação de xenobióticos (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Estudo prévio demonstra que a formação de hidroperóxido, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio aumentam à medida que a GSH e as atividades dos antioxidantes enzimáticos diminuem (LORES-ARNAIZ et al., 1995). Portanto, a depleção dos antioxidantes hepáticos pode contribuir significativamente para o acúmulo de espécies reativas e estresse oxidativo observado na hepatotoxicidade por APAP.

O tratamento com GSH é capaz de restaurar completamente os níveis de GSH, melhorar a detoxificação do NAPQI e reduzir a formação de peroxinitrito e injúria nas células do fígado induzidas pelo APAP (KNIGHT et al., 2002). Já a administração de

antioxidantes e GSH tem efeito hepatoprotetor contra lesão hepática por APAP (AHMAD et al., 2012; KNIGHT et al., 2002). Estes dados demonstram que a depleção dos antioxidantes hepáticos é um fator determinante na lesão hepática por APAP, via estresse oxidativo.

Além da ação direta nos danos teciduais, o estresse oxidativo também pode amplificar a lesão hepática por ações indiretas. Estudos demonstram que as espécies reativas e o estresse oxidativo também promovem o acúmulo de leucócitos (JAESCHKE; HASEGAWA, 2006) e desencadeiam a produção de mediadores pró-inflamatórios (HADDAD, 2002). Diversos fatores de transcrição sensíveis às EROs e ERNs podem induzir a transcrição de genes de citocinas como a IL-1, IL-6, TNF- α e moléculas de adesão. O fator nuclear kappa B (NF κ B) é um dos mais importantes fatores de transcrição que respondem diretamente ao estresse oxidativo. Acredita-se que as espécies reativas regulam e modulam a atividade de quinases responsáveis pela ativação da via de sinalização do NF κ B. Vários antioxidantes capazes de detoxificar as espécies reativas podem suprimir a ativação do NF κ B, sugerindo que as espécies reativas possuem papel central nesta via de sinalização (HADDAD, 2002; SARADA et al., 2008). Além disso, existe evidência que citocinas como TNF- α e IL-1 β , por exemplo, podem ativar NADPH oxidase e induzir a produção de EROs e estas, por sua vez, induzem a ativação de NF κ B e, assim, aumentar a produção de citocinas (VALÉRIO et al., 2009b). Assim, as citocinas também têm papel importante na manutenção do próprio estresse oxidativo.

1.8 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos têm demonstrado a participação da 5-LO e seus produtos em diferentes modelos de lesão hepática, porém, até o presente momento, sua participação na hepatotoxicidade induzida pelo APAP ainda não foi investigada. A intoxicação com APAP já é uma das causas mais comuns de falência hepática fulminante no homem, desta forma a letalidade e lesão hepática por APAP apresenta-se como modelo experimental de grande relevância com possíveis implicações clínicas. Ademais, muitas das intoxicações que ocorrem ainda são fatais. Portanto, terapias que aumentem o tempo de sobrevivência na intoxicação por APAP são importantes para aumentar a possibilidade de se instituir terapias de suporte convencionalmente utilizadas nesse quadro de intoxicação. Além disso, atualmente o N-acetil-cisteína (NAC) é o único tratamento específico para a hepatotoxicidade por APAP. O NAC aumenta a eliminação do NAPQI e, assim, previne a lesão hepática por APAP, no entanto este antídoto é pouco eficaz em casos em que a lesão hepática já tenha começado.

Desta forma, tratamentos que diminuam e previnam a propagação da lesão hepática induzida pelo APAP poderiam contribuir com terapias já existentes.

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos na lesão hepática por APAP, porém a inflamação e estresse oxidativo parecem ser essenciais. Estudos demonstram que a 5-LO e seus produtos podem mediar a inflamação e estresse oxidativo em diversos modelos experimentais de lesão tecidual. Assim, é possível que a 5-LO também participa da lesão hepática por APAP. Portanto, a participação da 5-LO na letalidade e lesão hepática induzida por dose tóxica de APAP foi investigada. Além disso, foi avaliada a participação da 5-LO na inflamação e estresse oxidativo induzida pelo APAP, mecanismos importantes neste modelo experimental de lesão hepática.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre a sobrevivência de camundongos deficientes e não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre os níveis de LTB₄ no fígado de camundongos não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre os níveis plasmáticos dos marcadores enzimáticos de danos hepáticos: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em camundongos deficientes e não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre o recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático de camundongos deficientes e não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre níveis hepáticos das citocinas: IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10 de camundongos deficientes e não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da administração de APAP sobre os níveis hepáticos de GSH e a capacidade antioxidante do fígado de camundongos deficientes e não deficientes para a 5-LO;
- Avaliar o efeito da deficiência para a 5-LO na atividade do citocromo P450 microsomal hepático pelo teste do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Camundongos machos (20-25 g) deficientes para a 5-LO (5-LO^{-/-}) e respectivo controle selvagem (WT, Sv129), originários do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), foram gentilmente doados pelo Dr. Marc Lee Peters-Golden da Universidade de Michigan. Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo menos 72 h antes dos experimentos. Os animais foram mantidos a 21 °C em ciclo de claro/escuro (12/12 h), com livre acesso a água e ração. O projeto seguiu as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (processo 2961/2010-10).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DAS AMOSTRAS

Para o experimento de dose-resposta, camundongos WT (n=10 por grupo) foram tratados via oral com 0,3; 1; 2; 3 e 6 g/kg de solução de APAP. A dose de APAP selecionada na curva dose-resposta foi utilizada para os próximos experimentos. Já para a avaliação da letalidade induzido pelo APAP, camundongos 5-LO^{-/-} e WT (n= 10 por grupo) foram tratados via oral com 3 g/kg de solução APAP (200 mg/mL de salina) ou volume equivalente de salina. A sobrevivência dos camundongos foi avaliada a cada 6 h durante 72 h. Animais moribundos ou que estivessem apresentando sofrimento extremo foram sacrificados. Para a realização dos outros experimentos deste estudo, camundongos 5-LO^{-/-} e WT (n= 5 por grupo) receberam mesma dose de APAP ou volume de salina e após 12 h foram sacrificados sob anestesia para a coleta das amostras. Amostras de plasma foram coletadas para a determinação da atividade enzimática do AST e ALT. Além disso, foi realizada laparotomia para acesso a amostras do lóbulo esquerdo do fígado que foram fragmentadas e armazenadas a -20 °C em tampão K₂HPO₄ 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) para avaliação do recrutamento de neutrófilos pela determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e a -80 °C para a determinação dos níveis de LTB₄ e citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10).

Para a avaliação do sistema antioxidante endógeno do tecido hepático, o fígado foi primeiramente perfundido com 10 mL de KCl 1,15% gelada pela veia porta. Um fragmento do lóbulo esquerdo do fígado perfundido foi imediatamente congelado a - 80 °C

para a determinação dos níveis de GSH reduzida e o restante foi separado para o ensaio do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS).

3.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICO DOS MARCADORES ENZIMÁTICOS DE LESÃO HEPÁTICA

Em microtubos contendo 50 µL do anticoagulante EDTA (5000 UI/mL) foi coletado 1 mL de sangue. Em seguida as amostras foram centrifugadas (200 x g, 10 min, 4 °C), e o plasma foi separado para a determinação dos níveis plasmáticos do AST e ALT por metodologia cinética UV, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstico S.A., Brazil), utilizando Multiskan EX (Uniscience – Labsystems, Helsinki, Finlândia). Os resultados foram expressos em U/L.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LTB₄ E CITOCINAS

As amostras de tecido hepático congeladas foram homogeneizadas em salina com auxílio do turrax T10 basic (IKA, Staufen, Alemanha) em banho de gelo e em seguida centrifugadas (800 x g, 10 min, 4 °C). No sobrenadante foi quantificado LTB₄ e citocinas (IL-1β e TNF-α, IFN-γ e IL-10) por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) e (eBioscience), respectivamente. Os resultados foram expressos em pg/mg de fígado.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MPO

Amostras de fígado congelados em tampão K₂HPO₄ com HTAB foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas (16.100 x g, 2 min, 4 °C). No sobrenadante o recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático foi avaliado por espectrofotometria. Brevemente, 5 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de tampão K₂HPO₄ 50 mM (pH 6,0) contendo 0,167 mg/ml dihidroclorato de O-dianisidina e peróxido de hidrogênio 0,015%. A atividade da MPO das amostras foi comparada com uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos x 10³ /mg de fígado) (VALÉRIO et al., 2009a).

3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH

As amostras de tecido hepático previamente perfundidas e congeladas foram homogeneizadas em EDTA 0,02 M gelado. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético 50% e as amostras foram misturadas em vortex e, após 15 min, centrifugadas (1.500 x g, 15 min, temperatura ambiente). O sobrenadante foi adicionado ao Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e ao ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e em seguida misturado em vortex. Após 5 min, as absorbâncias das amostras foram lidas a 412 nm. A curva padrão foi preparada utilizando o padrão de GSH em diversas concentrações e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol GSH/g}$ fígado (SEDLACK; LINDSAY, 1968).

3.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As amostras de fígado coletadas foram imediatamente pesadas e o homogenato do tecido foi preparado com solução de KCl 1,15% gelado para a concentração de 20% peso/volume. As amostras foram centrifugadas (200 x g, 10 min, 4 °C) e no sobrenadante a capacidade total antioxidante do fígado foi avaliada pelo ensaio do ABTS. Este ensaio é baseado na capacidade antioxidante equivalente ao Trolox e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade dos antioxidantes presentes no tecido reduzirem o radical cátion ABTS (ABTS^+) (composto com cor verde-azul) e decrescer a cor do meio a 734 nm. O ABTS^+ foi formado pela reação entre solução de ABTS (ABTS dissolvido em água a concentração de 7 mM) e solução de persulfato de potássio 2,45 mM e o armazenamento desta mistura em um local escuro durante 12-16 h. Previamente à realização do ensaio, esta solução de ABTS^+ foi diluída em tampão fosfato pH 7,4 até que a solução apresentasse absorbância de 0,7 ($\pm 0,02$) a 743 nm (KATALINIC et al., 2005). 10 μL do sobrenadante foi adicionado a 1mL da solução de ABTS^+ diluída e as amostras foram misturadas em vortex. Após 6 min as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 734 nm. A curva padrão foi preparada utilizando Trolox em diversas concentrações, assim os resultados foram expressos em mMol equivalente de Trolox/g de fígado.

3.8 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SONO INDUZIDO POR PENTOBARBITAL SÓDICO

A intoxicação induzida por APAP é dependente da formação de seu metabólito reativo, NAPQI, pelas enzimas do citocromo P450. Desta forma, foi avaliado se a deficiência para a 5-LO modularia de alguma forma a atividade destas enzimas, e isto pode ser avaliado pelo tempo de sono induzido pelo pentobarbital sódico. Assim, camundongos WT e 5-LO^{-/-} (n=10 por grupo) receberam pentobarbital sódico diluído em salina (50 mg/kg, intraperitoneal) e o tempo de sono foi avaliado como o tempo decorrido entre a perda e recuperação do reflexo de postura de cada animal (DARIAS et al., 1998).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do estudo foram expressos em média \pm erro padrão da média. As taxas de sobrevivência foram estimadas pelo método de Kaplan–Meier e a análise estatística realizada pelo teste de Log-Rank. Diferenças estatísticas entre somente dois grupos foram comparadas pelo Teste *t* de student e mais de dois grupos por ANOVA de uma-via seguido do pós-teste de Bonferroni de comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism (La Jolla, 5 CA) e todos os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Os dados mostrados são uma média de dois a três experimentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho foram apresentados e discutidos no artigo científico intitulado “*5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced lethality and hepatotoxicity*”, que será submetido para Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology.

4.1 ARTIGO

5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality

Miriam S. N. Hohmann¹; Renato D. R. Cardoso¹; Thiago M. Cunha²; José C. Alves-Filho²; Phileno Pinge-Filho¹; Sergio H. Ferreira²; Fernando Q. Cunha²; Rubia Casagrande³; Waldiceu A. Verri, Jr^{1*}.

ABSTRACT

The 5-lipoxygenase (5-LO) pathway converts arachidonic acid into leukotrienes (LTs) and studies indicate that this pathway is responsible for developing and sustaining inflammation. Although many studies have demonstrated that 5-LO pathway is involved in the pathogenesis of liver inflammation, at present, the participation of 5-LO in acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity and liver damage has not been addressed. In this context, 5-LO deficient (5-LO^{-/-}) mice were used to investigate the role of 5-LO in APAP-induced lethality and liver damage. In addition, the role of 5-LO in liver inflammation and oxidative stress induced by APAP was assessed. 5-LO^{-/-} and background wild type mice were treated with APAP (0.3-6 g/kg) or saline. The lethality, liver damage, neutrophil recruitment, LTB₄ and cytokine production as well as antioxidant depletion were assessed. APAP induced a dose-dependent mortality and the dose of 3 g/kg was selected for next experiments. It was observed that

¹ Department of Pathology, Biological Science Centre, State University of Londrina, (Address: Rodovia Celso Garcia Ced Pr 445, Km 380. Cx. Postal 6001, Cep 86051-990, Londrina-Pr-Brazil)

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, (Address: Av. Bandeirantes, 3900, Cep 14049-900)

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, State University of Londrina (Address: Rodovia Celso Garcia Ced Pr 445, Km 380. Cx. Postal 6001, Cep 86051-990, Londrina-Pr-Brazil).

* **Author for correspondence:** Waldiceu A. Verri Jr (waldiceujr@yahoo.com.br or waverri@uel.br). Present mailing address: Department of Pathology, Biological Science Center, State University of Londrina. Rod. Celso Garcia Cid Pr 445, KM 380, P.O. Box 6001, 86051-980, Londrina, Parana, Brazil. Fax: + 55 43 3371-4387, Tel: + 55 43 3371-4979.

APAP induces LTB₄ production in the liver, which is the primary target organ in APAP toxicity. Furthermore, APAP-induced lethality, increase of plasma levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, liver production of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-10) and myeloperoxidase activity, and decrease of liver reduced glutathione and antioxidant capacity measured by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) assay were prevented in 5-LO^{-/-} mice compared to WT mice. Therefore, the lack of 5-LO resulted in reduced mortality due to reduced liver inflammatory and oxidative damage. These results suggest that 5-LO is a promising target to reduce APAP-induced lethality and liver inflammatory/oxidative damage.

Key words: 5-lipoxygenase, leukotriene B₄, acetaminophen, hepatotoxicity, inflammation.

1. INTRODUCTION

The 5-lipoxygenase (5-LO) pathway converts arachidonic acid into leukotrienes (LTs), specifically LTB₄ and cysteinyl-LTs (LTC₄, LTD₄, and LTE₄) (Samuelsson et al. 1987), and studies indicate that this pathway is responsible for developing and sustaining inflammation (Funk 2001). All LTs display a variety of pro-inflammatory actions, but LTB₄, in particular, is one of the most potent chemotactic agents and activating factors for leukocytes (Ford-Hutchinson et al. 1980). In fact, LTB₄ has been implicated in the pathophysiology of acute and chronic inflammatory diseases (Chen et al. 2010; Al-Amran et al 2011).

In this context, over the past decade, many studies have investigated the participation of 5-LO and its products in different experimental models of liver injury. 5-LO pathway and LTs products have been implicated in hepatic inflammation and liver damage. Elevated production of LTs in the liver was detected in rats with CCl₄-induced liver injury (Alric et al. 2000; Titos et al. 2003). In hepatic ischemia and reperfusion injury, LT production was enhanced and associated with the development of hepatic edema and dysfunction (Takamatsu et al. 2004).

Furthermore, LTB₄ and the 5-LO pathway were reported to be involved in the pathogenesis of experimental liver fibrosis and inflammatory necrosis (Titos et al. 2003, 2005; Horrillo et al. 2007). Thus, 5-LO products are important mediators of hepatic inflammation and cell injury.

Considering that LTs are important mediators of liver inflammation and damage, 5-LO pathway and its products might also be involved in Acetaminophen (APAP)-induced liver injury. APAP is a widely used over-the-counter analgesic and antipyretic with few side effects when taken at therapeutic doses. However, APAP intoxication can result in severe liver damage characterized by centrilobular liver necrosis and, in more severe cases, acute liver failure and eventually death (Prescott, 1980). Studies have shown that APAP overdose has become the most common cause of acute liver failure in many Western countries (Larson et al. 2005; Craig et al. 2011).

It is well established that APAP-induced liver injury depends on the metabolic conversion of APAP to the highly reactive metabolite *N*-acetyl-*p*-benzoquinonimine (NAPQI) by cytochrome P-450 enzymes, primarily CYP2E1 and to a lesser extent CYP1A2, CYP2A6, and CYP3A4 (Mitchell et al. 1973a; Patten et al. 1993). In normal conditions, this metabolite is readily detoxified by hepatic reduced glutathione (GSH). However, after toxic dose of APAP, GSH is depleted, and as a result, NAPQI accumulates and covalently binds to hepatocellular proteins, initiating liver injury (Jollow et al. 1973; Mitchell et al. 1973b). Although protein binding is the initiator of toxicity and cellular injury, secondary processes amplify and propagate it. Initial hepatocellular damage caused by NAPQI can lead to the release of damage associated molecular patterns (DAMPs) such as high-mobility group box 1 protein (HMGB1), heat shock proteins, DNA fragments and others (Martin-Murphy et al. 2010), which can directly activate non-parenchymal hepatic cells, Kupffer cells (KC) and other innate immune cells (Schwabe et al. 2006; Jeannin et al. 2008). In addition, these cells can also be activated by potent chemotactic factors (i.e. LTB₄) released by injured hepatocytes

(Laskin and Pendino 1995). Activated cells can release a wide range of inflammatory mediators, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Michael et al. 1999), pro-inflammatory cytokines (Martin-Murphy et al. 2010) and LTs (Alric et al. 2000) amplifying the oxidative stress and inflammatory responses, consequently promoting further hepatic injury (Roberts et al. 2007). Moreover, the excessive ROS and RNS production during inflammation contributes to the depletion of GSH (Valério et al. 2009b), which could result in further NAPQI accumulation (Mitchell et al. 1973b).

Neutrophil recruitment to the liver has also been associated to APAP-induced liver injury (Liu et al. 2006) and several other experimental animal models of liver injury such as ischemia-reperfusion injury (Jaeschke et al. 1990), endotoxemia (Jaeschke et al. 1991), and alcoholic hepatitis (Bautista 2002). Neutrophils under certain circumstance can severely aggravate tissue damage. In APAP-induced hepatotoxicity, excessive neutrophil activity can contribute to liver inflammation and injury (Liu et al. 2006).

Although many studies have demonstrated that 5-LO pathway is involved in the pathogenesis of different models of liver inflammation, at present the participation of 5-LO in APAP-induced hepatotoxicity and liver damage has not been addressed. In this context, the aim of the current study was to use 5-LO deficient mice to investigate the role of 5-LO on APAP-induced lethality and liver damage. In addition, it aimed to demonstrate the mechanisms by which 5-LO deficiency ameliorates the events mentioned above focusing on neutrophil recruitment, cytokine production and antioxidant endogenous systems in the liver.

2. Methods

2.1 Animals

Male 5-Lipoxygenase deficient (5-LO^{-/-}) and wild type (WT, SV129) mice weighing 20-25 g were used. 5-LO^{-/-} and WT mice, originally from The Jackson Laboratory (Bar

Harbor, ME), were gifted from Dr. Marc Lee Peters-Golden (University of Michigan) weighing 20-25 g. Mice were housed at 21 °C on a 12 h light/dark cycle in standard clear plastic cages with food and water *ad libitum*. Animals were handled humanely and all procedures concerning animal care and use were approved by the Research and Ethics Committee from Londrina State University (process 2961/2010-10) and carried out in accordance with its guidelines.

2.2 Experimental design

In dose-response experiments, WT mice (n=10 per group) were treated orally with 0.3, 1, 2, 3, and 6 g/kg of APAP suspended in saline (200mg/mL). In APAP-induced lethality experiments, 5-LO^{-/-} and WT mice (n= 10 per group) were treated orally with 3 g/kg of APAP suspended in saline (200 mg/mL of saline) or equal volume of saline (control group). In these survival experiments, mice were observed every 6 h during 72 h, and any that showed extreme distress or became moribund were sacrificed. For subsequent experiments, animals (n= 5 per group) were slightly anesthetized and sacrificed 12 h post APAP treatment. Plasma samples were collected to determine the enzymatic activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). For liver analysis, the abdomen of the mice was opened, and the left lateral lobule of the liver was quickly excised. A portion of the tissue was stored at -20 °C in 50 mM K₂HPO₄ buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB) for myeloperoxidase (MPO) activity determination, and the remaining tissue was stored in saline at -80 °C for LTB₄ and cytokine (TNF α , IL-1 β , IFN- γ and IL-10) quantification. In order to assess hepatic antioxidant status, the liver was first perfused with 10 mL of ice-cold 1.15% KCl solution through the portal vein. The left lateral lobule was excised in the same manner and portion of the perfused tissue was separated for 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) assay, whereas the rest of the

tissue was immediately stored at -80 °C for further reduced glutathione (GSH) assay. The pentobarbital-induced sleeping time was evaluated in 5-LO^{-/-} and WT mice (n= 10 per group).

2.3 Enzymatic markers of liver injury

Blood was collected into micro tubes containing 50 µL of the anticoagulant Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (5000 IU/mL), centrifuged (200 x g, 10 min, 4 °C), and the plasma was separated. In order to determine enzymatic activities of AST and ALT, plasma samples were processed according to the manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstico S.A., Brazil). Results were presented as U/L.

2.4 Cytokines and LTB₄ levels

Frozen liver samples were homogenized in 500 µL of saline using a turrax T10 basic (IKA, Staufen, Germany) in an ice bath. The samples were centrifuged (800 x g, 10 min, 4 °C) and with the resulting supernatant, IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-10 (eBioscience) and LTB₄ (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) levels were determined by ELISA, according to the manufacturer's instructions.

2.5 MPO activity

Neutrophil migration to the liver was evaluated by a colorimetric assay. Frozen samples were homogenized as described above and centrifuged (16,100 x g, 2 min, 4 °C). The resulting supernatant was assayed spectrophotometrically for MPO activity determination at 450 nm. The MPO activity of samples was compared with a standard curve of neutrophils. Briefly, 5 µL of the supernatant was mixed with 200 µL 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.167 mg/ml O-dianisidine dihydrochloride and 0.015% hydrogen peroxide. The

results were presented as the MPO activity (number of neutrophils/mg of liver) (Valério et al. 2009a).

2.6 GSH

GSH levels were determined spectrophotometrically by an adapted method described by (Sedlack and Lindsay 1968). The frozen perfused liver samples were homogenized in cold 0,02 M EDTA. The homogenate was treated with 50% trichloroacetic acid, centrifuged (1,500 x g, 15 min), and to the supernatant 0.4 M Tris-HCl, pH 8.9 was added. Next, samples were vortex-mixed and 10 mM dithiobisnitrobenzoic acid was added, followed by vortex-mixing. Samples were allowed to stand for 5 minutes before being read at 412 nm. Standard curve was prepared using different concentrations of GSH, in addition to the other reagents mentioned before. Results were presented as $\mu\text{mol GSH/g liver}$.

2.7 ABTS assay

The perfused liver samples collected were immediately processed and homogenates (20% w/v) were prepared with ice-cold 1.15% KCl. Samples were centrifuged (200 x g, 10 min, 4 °C) and with the resulting supernatant total antioxidant capacity of liver was assessed by ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay (Katalinic et al. 2005). This assay is based on the ability of the antioxidants molecules to quench ABTS radical cation ($\text{ABTS}^{\cdot+}$), a blue-green chromophore with characteristic absorption at 734 nm, compared with that of Trolox. The antioxidants present in the liver samples when added to $\text{ABTS}^{\cdot+}$ reduce it into ABTS, which results in decolorization. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ was produced by reacting ABTS stock solution (ABTS dissolved in water to a 7 mM concentration) with 2.45 mM potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12–16 h before use. For the study $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution was diluted in phosphate

buffer pH 7.4 to an absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. 10 μ L of the samples were added to 1 mL of the diluted ABTS⁺ solution, samples were vortex-mixed and allowed to stand for 6 min. The samples were read in spectrophotometer at 734 nm. A standard curve was prepared using different concentrations of Trolox. Because this is a Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, results were presented as mmol Trolox equivalent/g liver.

2.8 Sleeping time induced by pentobarbital sodium

APAP induced toxicity is highly dependent on metabolic conversion of APAP to NAPQI by cytochrome P-450 enzymes, therefore, it was assessed if 5-LO deficiency affected hepatic microsomal cytochrome P450 activity. 5-LO^{-/-} and WT mice were treated with pentobarbital sodium diluted in saline (50 mg/kg, i.p.) and the duration of sleep (min) of each animal was analysed. Loss of righting reflex to recovery was recorded as the sleeping time end point (Darias et al. 1998).

2.9 Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm S.E.M. Survival rates were estimated by the Kaplan–Meier method, and statistical analysis was carried out by the log-rank test to test for equality of the survival curves. Statistical differences were compared by Student's *t* test or by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison *t* test. All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism (La Jolla, 5 CA). The level of significance was set at $P < 0.05$. Studies were conducted two to three times, and mean data are shown.

3. RESULTS

3.1 APAP induces dose-dependent lethality and LTB₄ production in the liver

To determine the dose of APAP necessary to induce significant lethality in this strain, a dose-response study was performed. WT mice were treated orally with APAP (0.3, 1, 2, 3, and 6 g/kg) or equal volume of saline and lethality was assessed. Saline and 0.3 g/kg of APAP did not induce death in any of the animals (Fig. 1a). The administration of 1.0 g/kg of APAP induced 15% lethality in 6 h, 25% in 18 h, 30% in 24 h, and 35% in 48 h, which maintained until the end of the experiment. The administration of 2 g/kg induced similar lethality; 20% in 12 h and 35% in 66 h, which also maintained. Mice treated with 3g/kg of APAP presented 45% and 70% mortality within 6 h and 12 h, respectively, and a little over 95% in 24 h, which was maintained. Finally, mice were treated with 6 g/kg of APAP to assure that 3 g/kg of APAP was the sub-maximal lethal dose in this experimental model. The administration of 6 g/kg of APAP induced 100% mortality in 6 h, thus considered inadequate. Therefore, 3 g/kg of APAP was selected for the following experiments addressing the hepatic mechanisms triggered by a lethal dose of APAP.

In order to determine 5-LO participation in APAP hepatotoxicity, the effect of the toxic dose of APAP on hepatic levels of LTB₄ was assessed. In this context, WT mice received 3 g/kg of APAP or equal volume of saline per oral, and after 12 h animals were sacrificed and liver samples were collected for assessment of LTB₄ levels. It was observed that APAP induced a ~10-fold increase of LTB₄ levels in the liver compared to saline (Fig. 1b). Twelve h was selected since it is an intermediary time point between intoxication and death (Fig. 1a).

3.2 APAP-induced lethality depends on 5-LO

5-LO^{-/-} and WT mice were treated with APAP (3 g/kg) or equal volume of saline per oral and survival rates during APAP intoxication were determined (Fig. 2). APAP administration induced significant mortality in WT mice, with approximately 45% lethality in

6 h, 75% in 12 h, and 100% in 24 h. However, APAP induced significantly lower mortality in 5-LO^{-/-} mice compared to WT mice: 5% lethality in 6 h, 15% in 12 h, 60% in 24 h, and 90% in 54 h in 5-LO^{-/-} mice. Saline did not induce death in any of the animals. Twelve h was selected for the next experiments investigating the mechanisms involved in APAP-induced intoxication because the greatest difference between WT and 5-LO^{-/-} was observed at this time point.

3.3 APAP induced liver damage was reduced in 5-LO^{-/-} mice.

APAP (3 g/kg) or equal volume of saline per oral was administrated in 5-LO^{-/-} and WT mice and the plasma levels of AST and ALT were determined after 12 h. These enzymes are used to monitor liver damage (Ishida et al. 2002) APAP significantly increased plasma levels of both enzymes in WT mice when compared to control group receiving saline, but not in 5-LO^{-/-} mice (Fig. 3a and 3b). There was no significant difference in AST and ALT levels between WT and 5-LO^{-/-} mice receiving saline.

3.4 APAP induced neutrophil recruitment was reduced in 5-LO^{-/-} mice

The myeloperoxidase (MPO) activity was used as an indirect marker of neutrophil presence in hepatic tissue 12 h after oral administration of APAP (3 g/kg) or equal volume of saline. APAP induced a significant increase of MPO activity in WT mice compared to saline (Fig. 4). On the other hand, MPO activity was reduced in 5-LO^{-/-} mice compared to WT receiving APAP. No significant difference was found between MPO activity of WT and 5-LO^{-/-} mice that received saline.

3.5 APAP induced cytokine production in the liver was reduced in 5-LO^{-/-} mice

Mice were treated with APAP (3 g/kg) or equal volume of saline per oral and after 12 h liver samples were collected and cytokine levels were determined. In WT mice, APAP induced significant increase of hepatic IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , and IL-10 production compared to saline (Fig. 5a-5d, respectively). In 5-LO^{-/-} mice, however, APAP did not increase cytokine production. There was no significant difference in cytokine levels between WT and 5-LO^{-/-} that received saline.

3.6 APAP-induced depletion of reduced glutathione (GSH) and antioxidant capacity in the liver were reduced in 5-LO^{-/-} mice

Mice were treated with APAP (3 g/kg) or equal volume of saline per oral and after 12 h liver samples were collected to determine GSH levels and antioxidant capacity by ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) assay). WT mice treated with APAP presented significant decrease of GSH levels (Fig. 6a) and antioxidant capacity (Fig. 6b) compared to saline WT mice, which was not observed in 5-LO^{-/-} mice treated with APAP. There was no significant difference between WT and 5-LO^{-/-} that received saline.

3.7 Pentobarbital sodium-induced sleeping time was not increased in 5-LO^{-/-} mice

Mice were treated with pentobarbital sodium (50mg/kg, intra peritoneal) and sleeping time was assessed. WT (142.8 \pm 10.10 min) and 5-LO^{-/-} (128.25 \pm 7.25 min) mice did not present significant difference in pentobarbital-induced sleeping time (P = 0.363) (Table 1). Therefore, 5-LO^{-/-} mice did not present significant alteration in cytochrome P450 metabolization activity.

4. DISCUSSION

Enhanced production of 5-LO pathway metabolites (LTs) in the liver has been observed and implicated in CCl₄ and ischemia/reperfusion-induced liver injury (Alric et al. 2000; Daglar et al. 2009). In agreement with these findings, the inhibition of 5-LO pathway reduces LT production and results in significant reduction in liver inflammation and damage (Titos et al. 2003, 2005). Although many studies have clearly demonstrated 5-LO and LT participation in various models of liver injury, the participation of 5-LO in APAP-induced liver injury had not been investigated.

In most studies, hepatotoxicity is induced in mice by administering 300 - 750 mg/kg of APAP (Ishida et al. 2002; Ezzat et al. 2012), however in this study a higher dose was used. Dose-response studies carried out in wild type (WT; Sv129) mice demonstrated that 3 g/kg of APAP is the sub-maximal lethal dose in this experimental model. The administration of 1 g/kg, for example, did not induce significant lethality, while 300 mg/kg did not even induce mortality of any of the mice. The route of administration is certainly a contributing factor for this difference since in the present study APAP was administered per orally and not intraperitoneally (Ishida et al. 2002; Ezzat et al. 2012). Another factor is that the mice used in our study were not submitted to food restriction or fasting prior to APAP administration. Studies show that food restriction and fasting enhances susceptibility to APAP toxicity by CYP 2E1 induction, enhancing ATP and GSH depletion (Qin et al. 2007; Antoine et al. 2010). Furthermore, the dose of APAP necessary to induce hepatotoxicity may also vary depending on mice strains. In Swiss mice, for example, 1.5 g/kg of APAP per orally induced a similar profile as 3 g/kg of APAP in Sv129 mice (data not shown).

In the present study it was observed that APAP induces ~10 fold increase of LTB₄ production in the liver. In agreement, 5-LO deficient (5-LO^{-/-}) mice presented lower lethality rates compared to WT mice. The markedly higher lethality in WT mice lined up well with the

several-fold higher liver damage in these mice as assessed by the plasma levels of AST and ALT. Furthermore, myeloperoxidase (MPO) activity and cytokine levels were increased as well as antioxidant systems were depleted in the liver in a 5-LO-dependent manner, which is consistent with a pro-inflammatory and oxidative role of 5-LO products in the APAP-induced lethality. Moreover, the reduction of APAP-induced lethality and hepatotoxicity is most likely related to the inhibition of inflammation and oxidative stress and not to reduced formation of APAP toxic metabolite, *N*-acetyl-*p*-benzoquinonimine (NAPQI), since 5-LO deficiency does not seem affect hepatic microsomal cytochrome P450 activity.

LTB₄ is an important pro-inflammatory product of 5-LO pathway that has been detected at sites of inflammation (Al-Amran et al. 2011). High levels of this product had also been observed in experimental models of liver injury such as liver fibrosis induced by CCl₄ (Titos et al. 2003) and hepatic ischemia/reperfusion injury (Takamatsu et al. 2004). In agreement with a role of 5-LO in APAP-induced liver toxicity, APAP induced significant production of LTB₄ in liver samples. Although high levels of LTB₄ have been observed in other experimental models of liver injury, to our knowledge, this is the first report demonstrating that an overdose of APAP induces LTB₄ production in the liver.

Much of the pro-inflammatory actions exerted by LTB₄ have been attributed to its chemotactic properties. LTB₄ is considered to be one of the most potent chemotactic agents for neutrophils produced from arachidonic acid (Ford-Hutchinson et al. 1980). In fact, a wide range of experimental models have demonstrated increased neutrophil recruitment induced by LTB₄ administration (Steiner et al. 2001; Guerrero et al. 2008). Neutrophil recruitment to the liver has been reported to be associated to the progression and severity of APAP-induced liver injury (Smith et al. 1998; Liu et al. 2006). In accordance with previous reports, APAP induced increase of neutrophil recruitment to the liver in a 5-LO-dependent manner. Taking into consideration the chemotactic actions of LTB₄, this finding corroborates with the increased

levels of LTB₄ detected. These findings are also supported by reports that 5-LO deficiency results in reduced expression of endothelial adhesion molecules such as E-selectin, P-selectin and ICAM-1 in acute pancreatitis, reducing neutrophil recruitment and culminating in drastic reduction of inflammatory cell infiltration (Cuzzocrea et al. 2003). Additionally, there was good correlation between reduction of neutrophil recruitment and reduced tissue damage.

Although neutrophils are essential for host defense against pathogens and the removal of damaged cells and cell debris, excessive neutrophil recruitment and activity may contribute to perpetuation of inflammatory responses, additional liver damage and even liver failure (Liu et al. 2006; Jaeschke and Hasegawa, 2006). Studies show that activated neutrophils can release a series of pro-inflammatory molecules, such as cytokines (Schölmerich 1996), reactive oxygen species (ROS) (Liu et al. 2006) and proteases (Faurischou and Borregaard 2003), that are responsible for further tissue damage and inflammation. Together with the present results, these data suggest that increased neutrophil recruitment may contribute to liver damage induced by APAP, and that this recruitment in great part dependent on 5-LO.

There has been report of important inflammatory cytokine release after APAP challenge. Similarly, in the present study we observed increased production of both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, following APAP treatment. IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , and IL-10 levels were increased in WT compared to 5-LO^{-/-} mice treated with APAP. Previous studies have also evidenced increased production of IL-1 β (Cover et al. 2006), TNF- α (Blazka et al. 1995), IFN- γ (Ishida et al. 2002), and IL-10 (Gardner et al. 2002) in response to high doses of APAP.

Studies have demonstrated that 5-LO and LTs can regulate cytokine production. LTB₄, for instance, enhances the production of IL-1 β and TNF- α by inflammatory cells (Gagnon et al. 1989). In addition, many studies have used 5-LO inhibition to demonstrate that 5-LO regulates the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 (Daglar et al. 2009). Considering previous

findings of cytokine participation in APAP hepatotoxicity and the role of 5-LO in regulating cytokine production, the results obtained in this study suggest that 5-LO products are involved in the production of cytokines induced by APAP.

Accumulating evidence suggests that these cytokines are critical mediators of APAP hepatotoxicity. Previous studies report that the enhanced release of TNF- α and IL-1 β may be responsible for further hepatic damage caused by NAPQI (Blazka et al. 1995). Interestingly, it has been observed a correlation between reduced induction of TNF α and IL-1 β genes and attenuated hepatic neutrophil accumulation (Cover et al. 2006). TNF- α and IL-1 β can potently activate and recruit neutrophils into the hepatic vasculature, therefore it is conceivable that these cytokines may contribute to the neutrophil recruitment to the liver in APAP intoxication (Verri et al. 2007).

APAP-induced increase in IFN- γ mRNA expression in the liver has also been associated with liver damage and lethality (Ishida et al. 2002). It was demonstrated that IFN- γ participates in APAP-induced liver injury by mediating leukocyte infiltration, hepatocyte apoptosis, and nitric oxide and cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α) production. In this context, it is possible that the APAP-induced IFN- γ production observed in our study may also have a contributing role in IL-1 β and TNF- α production.

During APAP-induced hepatotoxicity, increased production of IL-10 is also observed (Gardner et al. 2002, Cover et al. 2006). IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine capable of down regulating inflammation and, according to Ju et al (2002), in response to severe liver damage, hepato-protective factors such as IL-10 are also upregulated in an attempt to protect the organ against exacerbated injury. This is a possible explanation as to why increased IL-10 production was not observed in 5-LO^{-/-} mice after administration of APAP. 5-LO^{-/-} mice presented significantly reduced liver damage and inflammation when compared to WT mice, thus the endogenous upregulation of IL-10 was not observed. Furthermore, although it has

been suggested that IL-10 may suppress pro-inflammatory production in the liver (Gardner et al. 2002), in our study, IL-10 levels were not increased in 5-LO^{-/-} mice, suggesting that the reduction of IL-1 β , TNF- α and IFN- γ production observed in 5-LO^{-/-} mice was not dependent on the increased IL-10 production.

Another important finding of our study was that 5-LO deficiency improves antioxidant status in the liver of mice treated with APAP. APAP induced depletion of reduced glutathione (GSH) levels and overall oxidative buffering capacity of the liver (assessed by ABTS assay) of WT mice. Furthermore, a previous study reported that GSH levels correlate with ABTS profile as observed in the present study (Kang et al. 2002). Consistent with our findings, there are many other reports of very low levels of GSH and impaired antioxidant status after high doses of APAP (Moon et al. 2011; Ahmad et al. 2012). Antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase are responsible for controlling reactive species production and elimination (Takahashi 2012). GSH, on the other hand, is a nonenzymatic antioxidant responsible for not only biotransformation and elimination of xenobiotics, but also cellular defence against oxidative stress (Huber et al. 2008). Therefore, exhaustion of GSH and other antioxidants leads to an increase in ROS and reactive nitrogen species (RNS) in hepatocytes, in addition to the accumulation of NAPQI, all of which result in a condition of oxidative stress and tissue damage (Jollow et al. 1973; Moon et al. 2011). A significant amount of evidence has pointed to the involvement of oxidative stress in APAP toxicity (Reid et al. 2005; Zhao et al. 2011), and the abrogation of APAP-induced hepatotoxicity by administering antioxidants confirms that oxidative stress is important in the pathogenic process (Reid et al. 2005; Ahmad et al. 2012).

Studies have demonstrated that 5-LO has an important role in oxidative stress during inflammatory processes. In an acute lung injury mediated by oxidative stress and inflammation, inhibition of 5-LO by MK-886 significantly attenuated GSH depletion and

lipid peroxidation in tissues, suggesting that inhibition of 5-LO has protective effect against oxidative injury (Al-Amran et al. 2011). Moreover, 5-LO deficiency inhibited leukocyte-derived ROS production and protected against degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy (Gubitosi-Klug et al. 2008). This is consistent with the role that 5-LO plays in ROS generation by polymorphonuclear leukocytes (Serezani et al. 2005). According to this study, LTB₄ induces NADPH oxidase activation in polymorphonuclear leukocytes that results in ROS production in a dose-dependent manner. In this context, it is possible that 5-LO deficiency reduces antioxidant depletion by inhibiting ROS production. Furthermore, the role of 5-LO products in ROS production might also be related to recruitment of neutrophils considering that LTB₄ is a chemoattractant of neutrophils, which contribute to oxidative stress in APAP intoxication. In fact, the depletion of neutrophils by the treatment with an antibody anti-GR1 reduces the production of superoxide and hydrogen peroxide in APAP intoxication, e.g. reduced ROS (Liu et al., 2006). It is also important to consider the interactive system in which cytokines induce oxidative stress by stimulation of NADPH oxidase and ROS induce the activation of NFκB and consequently cytokine production (Valério et al. 2009b). Therefore, it is possible that there is also an association between the inhibition of cytokine production and preservation of antioxidant systems observed in 5-LO^{-/-} mice.

The protection conferred by 5-LO deficiency in APAP-induced lethality was more evident in the first 12h following APAP administration. Afterwards, although 5-LO^{-/-} mice presented less severe lethality when compared to WT mice, progressive lethality did occur. This might be related to the lack of lipoxin (LX) production in 5-LO^{-/-} mice since the synthesis of these important lipid mediators is dependent on 5-LO (Chiang et al. 2006). LXs present dual role in inhibiting inflammation and promoting resolution of the inflammation, which is essential for resolution of acute inflammatory processes and return to homeostasis

(Serhan 2008). Therefore, 5-LO inhibition seems to be more beneficial in the early stages of APAP intoxication when LT contribution to liver damage is critical. Moreover, it is possible that the indirect inhibition of the 5-LO pathway may be more beneficial in this experimental model of liver damage since the inhibitor of 5-LO activating protein (FLAP), Bay-X-1005, significantly reduces LT biosynthesis and stimulated LX formation, resulting in further protection against CCl₄-induced liver injury (Titos et al. 2005).

In conclusion, the current study demonstrates that 5-LO participates in APAP-induced liver damage and lethality by enhancing LTB₄ production in the liver. We verified that a lethal dose of APAP increases neutrophil migration, cytokine production, and depleted GSH levels and antioxidant capacity in the liver, all of which are reduced or abolished in 5-LO^{-/-} mice, therefore, elucidating the participation of 5-LO in these mechanism of APAP hepatotoxicity. Furthermore, our findings suggest that inhibition of 5-LO may be a potential strategy to reduce the lethality and liver damage produced by APAP intoxication, and possibly, other types of liver damage that are mediated by similar mechanisms of tissue damage. Finally, although 5-LO deficiency did not abolish the lethality of APAP, it increased the survival rates following the ingestion of a lethal dose of APAP and prevented liver damage, which might add to the current therapeutic approaches to reduce APAP intoxication-induced death.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciated the technical support of Giuliana B. Francisco and Pedro S. R. Dionísio Filho. This work was supported by grants from Fundação Araucária, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. M.S.N.H. received a Brazilian fellowship

from Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos (Decit/SCTIE), Ministério da Saúde (MS) (Decit/SCTIE/MS) by means of Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação Araucária.

6. CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest.

7. REFERENCES

Ahmad ST, Arjumand W, Nafees S, Seth A, Ali N, Rashid S et al (2012) Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Toxicol Lett* 208:149-161

Al-Amran FG, Hadi NR, Hashim AM (2011) Leukotriene biosynthesis inhibition ameliorates acute lung injury following hemorrhagic shock in rats. *J Cardiothorac Surg* 6:81

Alric L, Orfila C, Carrere N, Beraud M, Carrera G, Lepert JC, Duffaut M, Pipy B, Vinel JP (2000) Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by Kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced by CCl₄. *Inflamm Res* 49:700-707

Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Lavery H, Park BK (2010) Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. *Mol Med* 16:479-490

Bautista, A (2002) Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27:17–21

Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI (1995) Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:43-52

Chen M, Lam BK, Luster AD, Zarini S, Murphy RC, Bair AM, Soberman RJ, Lee DM (2010) Joint tissues amplify inflammation and alter their invasive behavior via leukotriene B₄ in experimental inflammatory arthritis. *J Immunol* 185:5503-5511

Chiang N, Serhan CN, Dahlén SR, Drazen JM, Hay DW, Rovati GE et al (2006) The lipoxin receptor ALX: Potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharm Ver* 58:463-487

Craig DG, Bates CM, Davidson JS, Martin KG, Hayes PC, Simpson KJ (2011) Overdose pattern and outcome in paracetamol-induced acute severe hepatotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 71:273-282

Cover C, Liu J, Farhood A, Malle E, Waalkes MP, Bajt ML, Jaeschke H (2006) Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 216:98-107

Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Britti D, Sciarra G, De Sarro A, Caputi AP, Saubetin L (2003) 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 110:120-130

Daglar G, Karaca T, Yuksek YN, Gozalan U, Akbiyik F, Sokmensuer C, Gurel B, Kama NA (2009) Effect of Montelukast and MK-886 on hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res* 153:31-38

Darias V, Abdala S, Martin-Herrera D, Tello ML, Vega S (1998) CNS effects of a series of 1,2,4-triazolyl heterocarboxylic derivatives. *Pharmazie* 53:477-481

Tarek Ezzat, Dipok Kumar Dhar, Massimo Malago, Damink SW (2012) Dynamic tracking of stem cells in an acute liver failure model. *World J Gastroenterol* 18: 507–516.

Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5:1317–1327

Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith JH (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265

Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875

Gagnon L, Filion LG, Dubois C, Rola-Pleszczynski R (1989) Leukotrienes and macrophage activation: augmented cytotoxic activity and enhanced interleukin 1, tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. *Agents Actions* 26:141-147

Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Sacco M, Durham SK, Bruno MK, Bruno MK, Cohen SD, Gordon MK, Gerecke DR, Zhou P, Laskin DL (2002) Reduced Hepatotoxicity of Acetaminophen in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase: Potential Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10. *Toxicol Appl Pharmacol* 184:27-36

Gubitosi-Klug RA, Talahalli R, Du Y, Nadler JL, Kern TS (2008) 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 57:1387-1393

Guerrero AT, Verri WA Jr, Cunha TM, Silva TA, Schivo IR, Dal-Secco D, Canetti C, Rocha FA, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH (2008) Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. *J Leukoc* 83:122-130

Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, López-Parra M, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J (2007) Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 323:778-786

Huber PC, Almeida WP, Fátima A (2008) Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quím Nova* 31

Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura Y, Mukaida N (2002) A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J* 16:1227-1236

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW (1991) Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol* 261:G1051-1056

Jaeschke H, Farhood A, Smith, C W (1990) Neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4:3355-3359

Jaeschke H, Hasegawa T (2006) Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 26:912-919

Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y (2008) Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 20:530-537

Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 187:195-202

Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, Pohl LR (2002) Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* 15:1504-1513

Kang HM, Saltveit ME (2002) Antioxidant capacity of lettuce leaf tissue increases after wounding. *J Agric Food Chem* 50:7536-7541

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M (2005) Gender differences in antioxidant capacity of rat tissue determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140:47-52

Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiødt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WM (2005) Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 42:1364–1372

Laskin DL, Pendino KJ (1995) Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:655-77

Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43:1220-1230

Martin-Murphy BV, Holt MP, Ju C (2010) The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* 192:387–394

Michael S L, Pumford N R, Mayeux P R, Niesman M R, Hinson J A (1999) Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology* 30:186-195

Mitchell JR, Jollow, DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette, JR, Brodie BB (1973a) Acetaminophen-induced hepatic necrosis: I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 187:185–194

Mitchell JR, Jollow, DJ, Potter WZ, Gillette, JR, Brodie BB (1973b) Acetaminophen-induced hepatic necrosis IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 187:211–217

Moon MS, Kang BH, Kreminski J, Amin S, Aliagas C, Zhu J, McDevitt EI, Kocher S, Richie JP, Isom HC (2011) 3,5,5-Trimethyl-Hexanoyl-Ferrocene Diet Protects Mice from Moderate Transient Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 124: 348-58

Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, and Yang CS (1993) Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol* 6:511–518

- Prescott LF (1980) Hepatotoxicity of mild analgesics. *Br J Clin Pharmacol* 10:373S-377S
- Qin LQ, Wang Y, Xu JY, Kaneko T, Sato A, Wang PY (2007) One-day dietary restriction changes hepatic metabolism and potentiates the hepatotoxicity of carbon tetrachloride and chloroform in rats. *Tohoku J Exp Med* 212: 379-387
- Reid, AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA (2005) Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 312:509–516
- Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klauning JE (2007) Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis. *Toxicol Sci* 96:2-15
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237:1171-1176.
- Schölmerich J (1996) Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 219:37-42
- Schwabe RF, Seki E, Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 130:1886–1900
- Sedlack J, Lindsay RH (1968) Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem* 25:192-205
- Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Peters-Golden M (2005) Leukotriene B4 mediates p47phox phosphorylation and membrane translocation in polyunsaturated fatty acid-stimulated neutrophils. *J Leukoc Biol* 78:976-984
- Serhan CN (2008) Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J Periodontol* 79:1520–1526

Smith GS, Nadig DE, Kokoska ER, Solomon H, Tiniakos DG, Miller TA (1998) Role of neutrophils in hepatotoxicity induced by oral acetaminophen administration in rats. *J Surg Res* 8:252-258

Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG (2001) Leukotriene B₄ promotes reactive oxidant generation and leukocyte adherence during acute hypoxia *J Appl Physiol* 91:1160-1167

Takahashi M (2012) Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of Mammalian embryos. *J Reprod Dev* 58:1-9

Takamatsu Y, Shimada K, Chijiwa K, Kuroki S, Yamaguchi K, Tanaka M (2004) Role of leukotrienes on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 119:14-20

Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, González-Pérez A, Gaya J, Miquel R, Arroyo V, Rodés J (2005) Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 78:871-878

Titos E, Clària J, Planagumà A, López-Parra M, Villamor N, Parrizas M, Carrió A, Miquel R, Jimenez W, Arroyo V, Rivera F, Rodés J (2003) Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. *FASEB J* 17:1745-1747

Valério DA, Ferreira FI, Cunha TM, Alves-Filho JC, Lima FO, De Oliveira JR, Ferreira SH, Cunha FQ, Queiroz RH, Verri WA Jr (2009a) Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A₁ receptor. *Br J Pharmacol* 158:558-568

Valério DA, Georgetti SR, Magro DA, Casagrande R, Cunha TM, Vicentini FT, Vieira SM, Fonseca MJ, Ferreira SH, Cunha FQ, Verri WA Jr (2009b) Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod* 72:1975-1979

Verri WA Jr, Cunha TM, Ferreira SH, Wei X, Leung BP, Fraser A, McInnes IB, Liew FY, Cunha FQ (2007) IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. *Eur J Immunol* 37:3373-3380

Zhao YL, Zhou GD, Yang HB, Wang JB, Shan LM, Li RS, Xiao XH (2011) Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Food Chem Toxicol* 49:1705-1710

FIGURES, TABLES AND LEGENDS

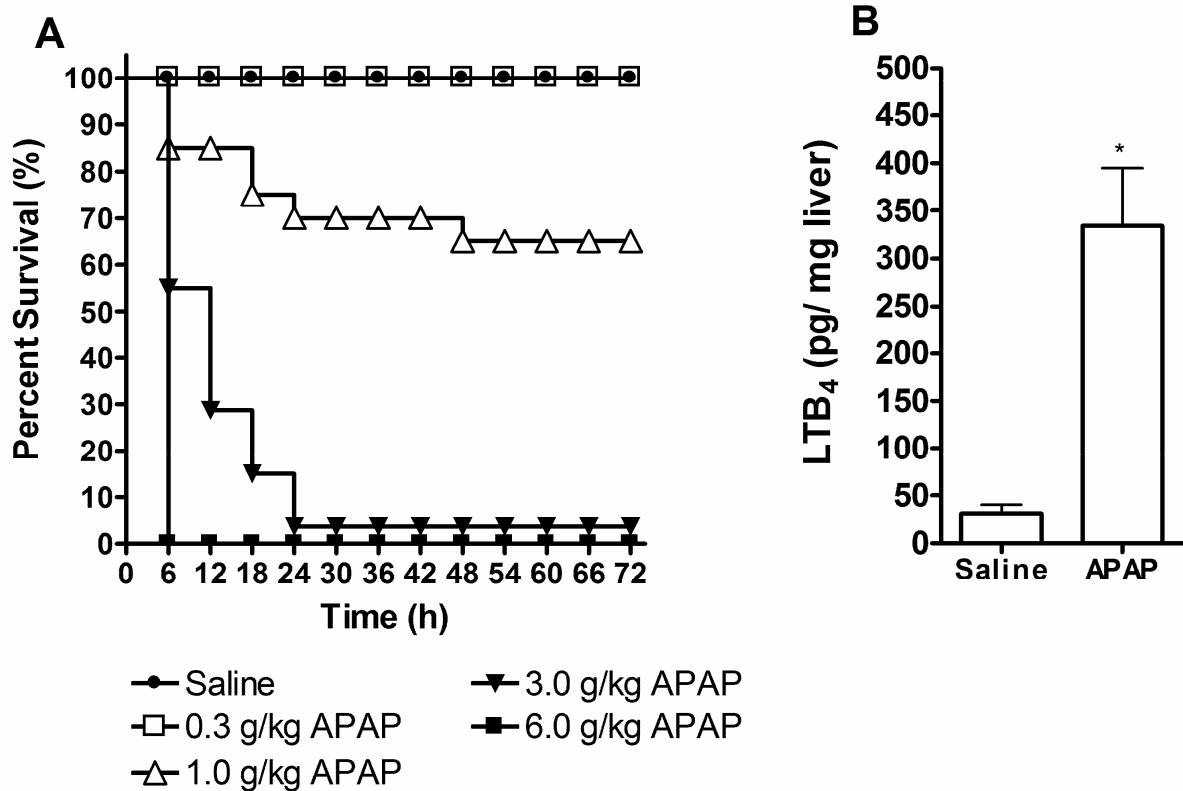


Fig. 1 a,b Acetaminophen (APAP) induces dose dependent lethality and LTB₄ production in the liver. **(a)** WT mice were treated with APAP (0.3, 1, 3, and 6 g/kg) or saline per oral. and lethality was assessed. The lethality induced by APAP was monitored at 6 h intervals during 72 h. n= 10, representative of three separate experiments. **(b)** WT mice were treated with APAP (3g/kg, per oral) or saline and after 12 h liver samples were collected for the determination of LTB₄ levels by EIA. Values are mean \pm S.E.M., n= 5, representative of two separate experiments. * $p < 0.05$ compared to saline group, student's *t* test

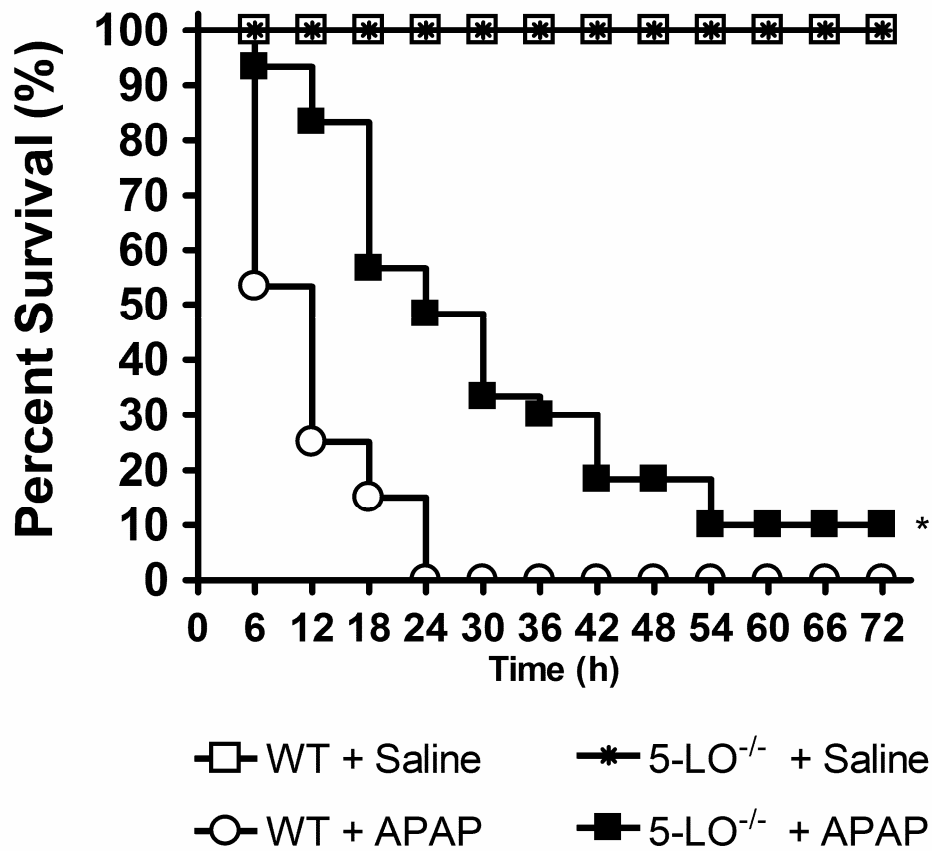


Fig. 2 Acetaminophen (APAP) induces 5-LO-dependent lethality. WT mice and 5-LO^{-/-} mice were treated with APAP (3 g/kg, per oral) or saline. The lethality induced by APAP was monitored at 6 h intervals during 72 h. n= 10, representative of three separate experiments. **p* < 0.001 compared to WT mice treated with APAP, Kaplan–Meier method, followed by the log-rank test

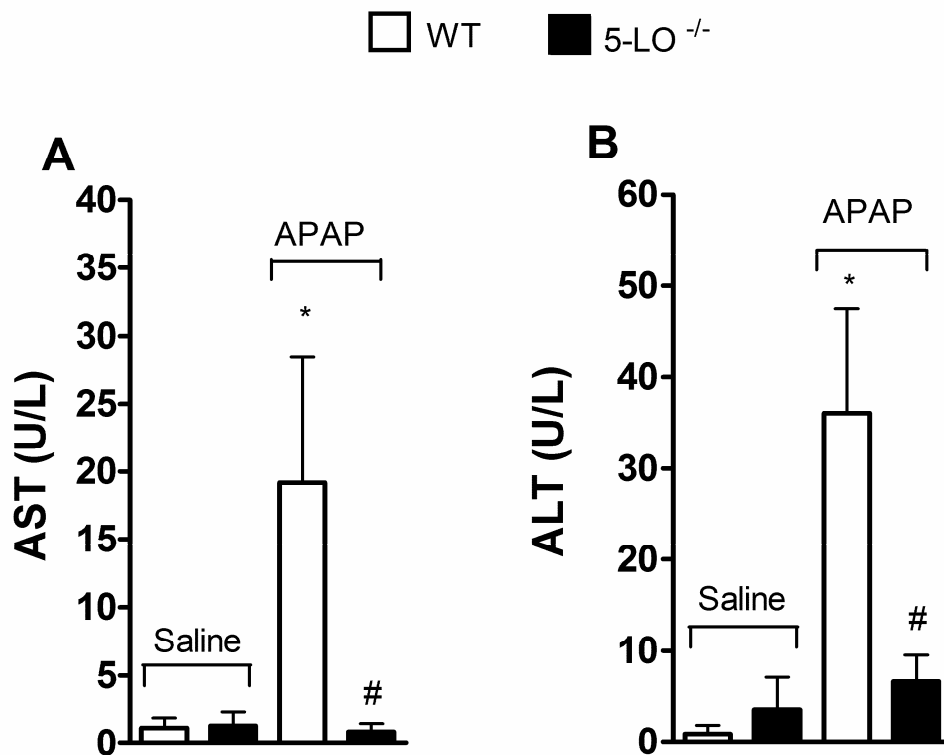


Fig. 3 a,b Acetaminophen (APAP) induces 5-LO-dependent liver damage. WT and 5-LO^{-/-} mice were treated with APAP (3 g/kg, per oral) or saline and after 12 h blood samples were collected to assess liver damage by measuring plasma levels of (a) aspartate aminotransferase (AST) and (b) alanine aminotransferase (ALT). Values are mean \pm S.E.M., n= 5, representative of two separate experiments. * $p < 0.05$ compared to saline treated WT and 5-LO^{-/-} mice and # $p < 0.05$ compared to APAP treated WT mice. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison t test

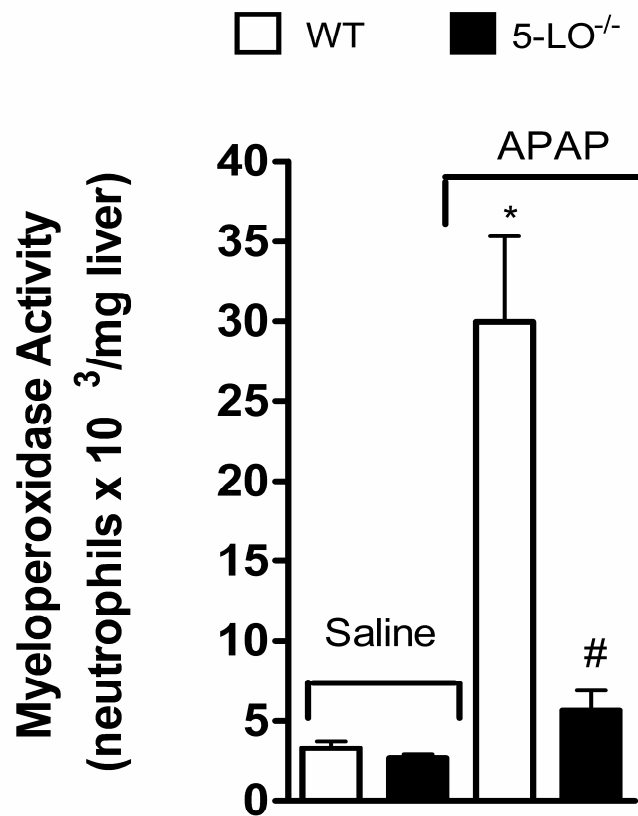


Fig. 4 Acetaminophen (APAP) induces 5-LO-dependent neutrophil recruitment. Neutrophil recruitment to the liver was assessed by myeloperoxidase activity determination in the liver 12 h after APAP (3 g/kg, p.o.) or saline treatment of WT and 5-LO^{-/-} mice. Values are mean \pm S.E.M., n= 5, representative of two separate experiments. * $p < 0.05$ compared to saline treated WT and 5-LO^{-/-} mice and # $p < 0.05$ compared to APAP treated WT mice. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison t test

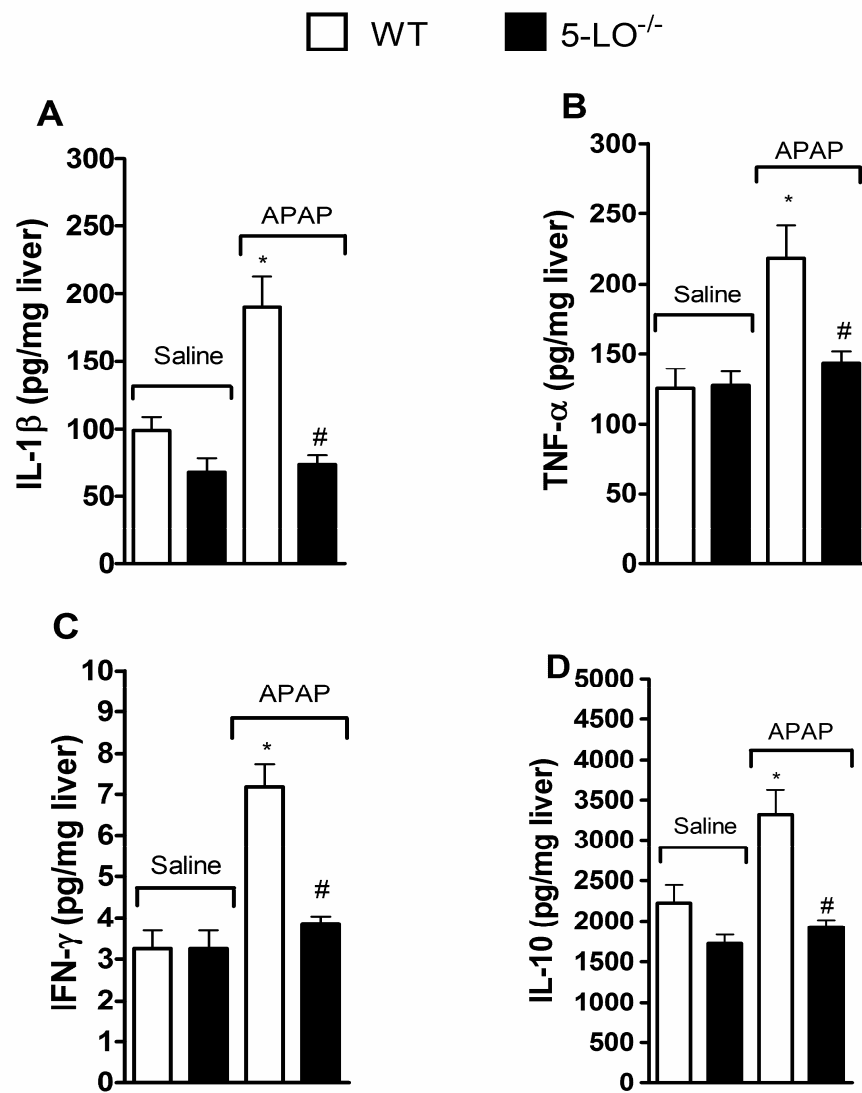


Fig. 5 Acetaminophen (APAP) induces 5-LO-dependent induction of cytokine production in the liver. WT and 5-LO^{-/-} mice were treated with APAP (3 g/kg, per oral) or saline and after 12 h, liver samples were collected to determine (a) IL-1 β , (b) TNF- α , (c) IFN- γ , (e) IL-10 levels by ELISA. Values are mean \pm S.E.M., n = 5, representative of two separate experiments. * p < 0.05 compared to saline treated WT and 5-LO^{-/-} mice and # p < 0.05 compared to APAP treated WT mice. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison t test

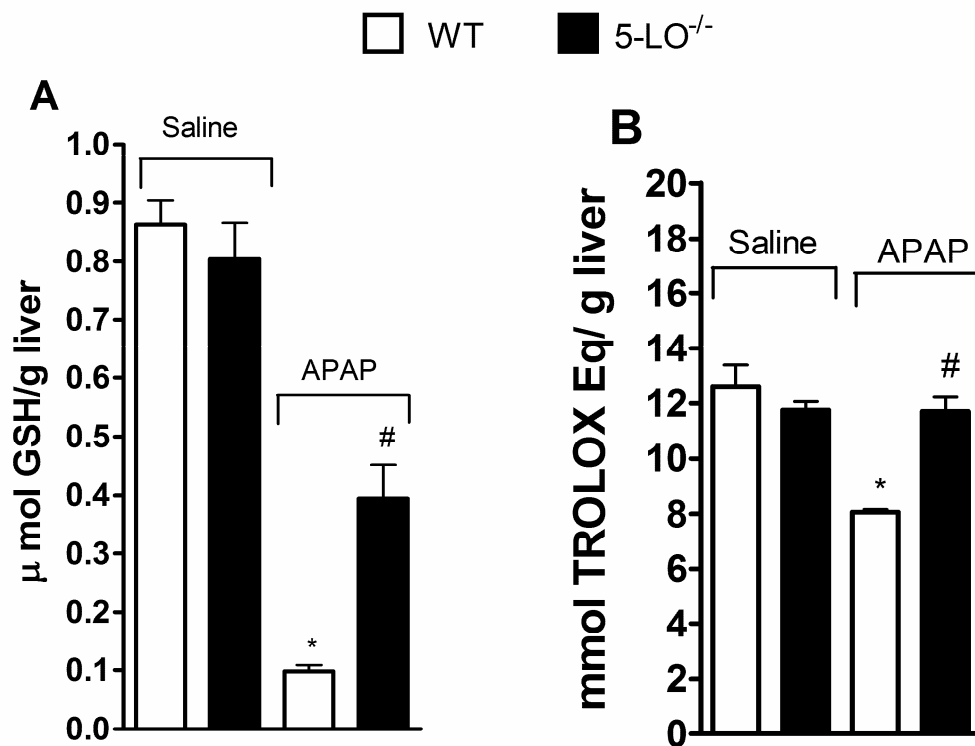


Fig. 6 a,b Acetaminophen (APAP) induces the depletion of reduced glutathione (GSH) and antioxidant capacity in the liver in a 5-LO-dependent manner. WT and 5-LO^{-/-} mice were treated with APAP (3 g/kg, per oral) or saline, and after 12 h, liver samples were collected to determine (a) GSH levels and (b) antioxidant capacity by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) assay. Values are mean \pm S.E.M., n= 5, representative of two separate experiments. * $p < 0.05$ compared to saline treated WT and 5-LO^{-/-} mice and # $p < 0.05$ compared to APAP treated WT mice. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison t test

Table 1 Effect of 5-LO deficiency on sodium pentobarbital (50mg/kg, intraperitoneal) induced sleeping time in mice

Groups	Sleeping time (min)
WT	142.8 ± 10.10
5-LO^{-/-}	128.25 ± 7.25

Data as mean±S.E.M.; n= 10 per group, p= 0.363 vs. WT
(Student's *t* test)

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a 5-LO participa da letalidade e hepatotoxicidade por APAP. Níveis aumentados de LTB_4 foram observados no fígado de camundongos expostos ao APAP. Além disso, camundongos 5-LO^{-/-} apresentaram lesão hepática e letalidade reduzidas, comparados com camundongos WT.

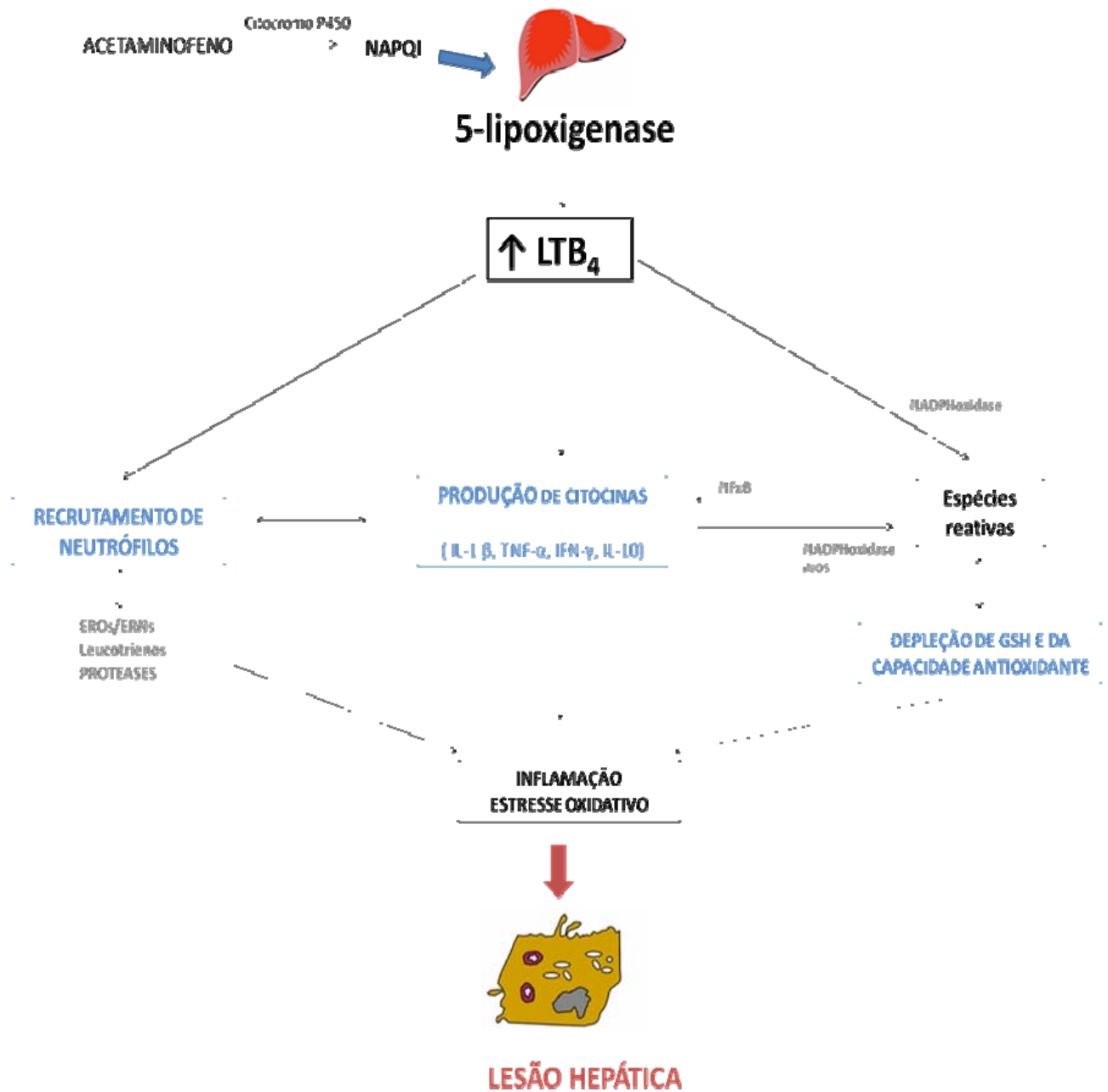
A redução da letalidade e da hepatotoxicidade por APAP observada em camundongos 5-LO^{-/-} parece estar associada à redução da inflamação e do estresse oxidativo e não a menor formação de NAPQI pelo citocromo P450, visto que os camundongos WT e 5-LO^{-/-} apresentaram respostas semelhantes no teste de sono induzido por pentobarbital sódico. Ademais, o aumento da produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10, da atividade da MPO e da depleção dos níveis de GSH e da capacidade antioxidante pelo ensaio do ABTS no fígado induzidos por APAP estavam reduzidos em camundongos 5-LO^{-/-}. Assim, a 5-LO contribui para a lesão hepática induzida por APAP via produção de citocinas, recrutamento de neutrófilos para o fígado e depleção dos níveis de GSH e da capacidade antioxidante no fígado (Figura 3).

É importante ressaltar que a redução dos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ que ocorreu em camundongos 5-LO^{-/-} não foi mediada por IL-10, já que os mesmos também apresentaram redução dos níveis de IL-10. Entretanto, é possível que a menor produção de IL-1 β e TNF- α seja decorrente da menor produção de IFN- γ ou do menor estresse oxidativo apresentados por estes camundongos.

A proteção conferida pela deficiência para a 5-LO contra a letalidade induzida pelo APAP é mais evidente nas primeiras 12 horas após exposição à droga. Apesar de os camundongos 5-LO^{-/-} apresentarem letalidade menos severa do que camundongos WT, nas horas seguintes ocorreu letalidade progressiva. Assim, a inibição da 5-LO parece ser mais benéfica no início do quadro de intoxicação por APAP.

Portanto, os resultados deste estudo indicam que inibição da 5-LO poderia ser utilizada para diminuir a letalidade e a lesão hepática induzida pela intoxicação por APAP e, até mesmo, outros tipos de lesão hepática que são mediadas por mecanismos de lesão semelhantes.

Figura 3 – Participação da 5-LO nos mecanismos envolvidos na lesão hepática induzida por APAP



PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo foi observado que a deficiência para a 5-LO reduz a letalidade induzida pelo APAP. Desta forma, a inibição da 5-LO poderia ser utilizada para aumentar a sobrevivência em casos de ingestão de dose letal de APAP e, assim, aumentar a possibilidade do uso de terapias de suporte convencionalmente utilizadas nestes quadros de intoxicação. Assim, é importante que seja avaliado o efeito do uso de um inibidor da 5-LO e de terapias de suporte que já são utilizados neste quadro de intoxicação. Além disso, se considerarmos que o NAC aumenta a eliminação do NAPQI e a 5-LO reduz a propagação da lesão hepática induzida por APAP, é possível que o uso concomitante de um inibidor da 5-LO e do NAC apresente maiores benefícios no tratamento da hepatotoxicidade por APAP. Desta forma, são necessários mais estudos que investiguem o efeito do uso de um inibidor da 5-LO como antídoto e do NAC em conjunto.

Outro aspecto que deve ser considerado é que, apesar de camundongos 5-LO^{-/-} terem apresentado redução da letalidade induzida pelo APAP, a deficiência para a 5-LO não aboliu a letalidade. É possível que isto tenha ocorrido devida à ausência das LXs, mediadores responsáveis por diminuir e promover a resolução do processo inflamatório. Neste contexto, é importante considerar que uso de um inibidor indireto da 5-LO poderia ser mais benéfico neste modelo experimental de lesão hepática, uma vez que o inibidor da FLAP (por exemplo, Bay-X-1005) é capaz de reduzir drasticamente a síntese dos LTs, sem comprometer a produção das LXs (Titos et al., 2005). Assim, é essencial que novos estudos sejam realizados para investigar o efeito do uso de inibidores indiretos da 5-LO e também dos antagonistas dos receptores do LTB₄ e cisteinil LTs na lesão hepática induzida pelo APAP.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.T. et al. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. **Toxicology Letters**, v. 208, n. 2, p. 149-161, jan. 2012.
- ALRIC, L. et al. Involvement of calcium in macrophage leukotriene release during experimental cirrhosis. **Hepatology**, v. 23, n. 3, p. 614-22, mar. 1996.
- ALRIC, L. et al. Reactive oxygen intermediates and eicosanoid production by Kupffer cells and infiltrated macrophages in acute and chronic liver injury induced by CCl₄. **Inflammation Research**, v. 49, n. 12, p. 700-707, dez .2000.
- ANDRADE FILHO, D.A.C.; DIAS, M.B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001. 351p.
- ANDRÉS, D. et al. Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 917-26, set. 2003.
- ARM, J.P. Leukotriene generation and clinical implications. **Allergy Asthma Proceedings**, v. 25, n. 1, p. 37-42, jan-fev. 2004.
- BAILLIE, T.A.; RETTIE, A.E. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. **Drug Metabolism Pharmacokinetics**, v. 26, n. 1, p. 15-29, 2011.
- BAUTISTA, A.P. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. **Alcohol**, v. 27, n. 1, p. 17-21, maio 2002.
- BERNAL, W.; AUZINGER, G.; WENDON, J. Prognostic utility of the bilirubin lactate and etiology score. **Clinical Gastroenterology Hepatology**, v. 7, n. 2, p. 249, fev. 2009.
- BLAZKA, M. et al. Histopathology of acetaminophen-induced liver damages: role of interleukin 1alpha and tumor necrosis factor alpha. **Toxicologic Pathology**, v. 24, n. 2, p. 181-189, abr. 1996.
- BLAZKA, M. et al. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 43-52, jul. 1995.
- BOURDI, M. et al. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin-10: Role of inducible nitric oxide synthase. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 289-298, nov.2002.
- CANETTI, C. et al. Tumour necrosis factor- α and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in imune inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 134, n. 8, p. 1619-1628, set. 2001.

CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA. 2010. Disponível em:
<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/rel_2010.pdf>. Acesso em 29 jul. 2012.

CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA. 2009. Disponível em:
<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/rel_2009.pdf>. Acesso em 29 jul. 2012.

CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA. 2008. Disponível em:
<http://www.cit.rs.gov.br/images/dados_publicados/rel_atend_2008.pdf>. Acesso em 29 jul. 2012.

CHIANG, N. et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. **Pharmacological Review**, v. 58, n. 3, p. 463-487, set. 2006.

CHO, K.J.; SEO, J.M.; KIM, J.H. Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidase and reactive oxygen species. **Molecules Cells**, v. 32, p. 1-5, jul. 2011.

CLARK, R. et al. Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study. **BMC Clinical Pharmacology**, v.12, jun. 2012.

CONTE, F. et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan- induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α and CXCL-1. **J. Leukocyte Biology**, v. 84, n. 3, p. 652-660, set. 2008.

COVER, C. et al. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 216, n. 2, p. 98-107, nov. 2006.

COVER, C. et al. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 879-887, nov. 2005.

CUZZOCREA, S. et al. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. **Immunology**, v. 110, n. 1, p. 120-130, set. 2003b.

CUZZOCREA, S. et al. 5-Lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal Leukocyte Biology**, v. 73, n. 6, p. 739-746, jun. 2003a.

DAGLER, G. et al. Effect of Montelukast and MK-886 on hepatic ischemia-reperfusion in rats. **Journal Surgical Research**, v. 153, n. 1, p. 31-38, maio 2009.

DARIAS, V. et al. CNS effects of a series of 1,2,4-triazolyl heterocarboxylic derivatives. **Pharmazie**, v. 53, n. 7, p. 477-481, jul. 1998.

DRAGOMIR, A.C.; LASKIN, J.D.; LASKIN, D.L. Macrophage activation by factors released from acetaminophen-injured hepatocytes: Potential role of HMGB1. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 253, n. 3, p. 170-177, jun. 2011.

- FORD-HUTCHINSON, A.W. et al. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v. 286, p. 264-265, jul. 1980.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, nov. 2001.
- GAGNON, L. et al. Leukotrienes and macrophage activation: Augmented cytotoxic activity and enhanced interleukin 1, tumor necrosis factor and hydrogen peroxide production. **Agents Actions**, v. 29, n. 1-2, p. 141-147, jan. 1989.
- GARDNER, C.R. et al. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: Potential role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 184, n. 1, p. 27-36, out. 2002.
- GODSON, C.; MITCHELL, S.; HARVEY, K. Cutting edge: Lipoxins rapidly stimulate nonphagocytic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **Journal Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1663-1667, fev. 2000.
- GRATTAGLIANO, I. et al. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: Certainties and doubts. **World Journal Gastroenterology**, v. 15, n. 39, p. 4865-4876, out. 2009.
- HADDAD, J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signalling*, v. 14, n. 11, p. 870-897, nov. 2002.
- HORRILLO, R. et al. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 778-786, dez. 2007.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 2008.
- IIZUKA, Y. et al. Protective role of the leukotriene B₄ receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. **FASEB Journal**, v. 24, n. 12, p. 4678-4690, 2010.
- ISHIDA, Y. et al. A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. **Federation American Society Experimental Biology Journal**, v. 16, n. 10, p. 1227-1236, ago. 2002.
- JAESCHKE, H. et al. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. **Liver International**, v. 32, n. 1, p. 8-20, jan. 2012.
- JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; SMITH, C.W. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. **FASEB Journal**, n. 4, n. 15, p. 3355-3359, dez. 1990.
- JAESCHKE, H.; HASEGAWA, T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. **Liver International**, v. 26, n. 8, p. 912-919, out. 2006.
- JAESCHKE, H.; KNIGHT, T.; BAJT, M.L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 144, n. 3, p. 279-288, out. 2003.

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

JOLLOW, D.J. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 195–202, out. 1973.

KATALINIC, V. et al. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissue determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry Physiology. Toxicology Pharmacology: CBP**, v. 140, n. 10, p. 47–52, jan. 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.497, p. 827.

KIM, G.Y. et al. Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. **Journal Immunology**, v. 184, p. 3946–3954, 2010.

KIM, N.D.; LUSTER, A.D. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. **The Scientific World Journal**, v. 1; n. 7; p.1307-1328, set. 2007.

KNIGHT, T.R. et al. Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: Protection by glutathione. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 468–475, nov. 2002.

LARRICK, J.; WRIGHT, S. Cytotoxic mechanisms of tumor necrosis factor- α . **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 4, n. 14, p. 3215-3223, nov. 1990.

LARSON, A.M. et al. Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure: Results of a United States Multicenter, Prospective Study. **Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 1364-1372, dez. 2005.

LASKIN, D. et al. Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. **Hepatology**, v. 21, n. 4, p. 1045-1050, abr. 1995.

LIU, Z.X. et al. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1220-30, jun. 2006.

LORES-ARNAIZ, S. et al. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. **Free Radical Biology Medicine**, v. 19, n. 3, p. 303-310, set. 1995.

LUNDEEN, K. A., SUN, B., KARLSSON, L. et al. Leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. **Journal Immunology**, v. 177, n. 5, p. 3439–3447, set. 2006.

MARCOUILLER, P. et al. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin-1beta synthesis. **Journal Rheumatology**, v. 32, n. 4, p. 704–712, abr. 2005.

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, fev. 2010.

MATHIS, S.P. et al. Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. **Journal Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3049-3056, 2010.

MICHAEL, S L. et al. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. **Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 186-95, jul. 1999.

MITCHELL, J.R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.187, n,1, p.185-194, out.1973a.

MITCHELL, J.R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 187, n. 1, p. 211-217, out.1973b.

MONTEIRO, A.P. et al. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. **Journal Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6562-6567, maio 2011.

PATTEN, C.J. et al. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. **Chemical Research Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 511–518, jul-ago. 1993.

PRESCOTT, L. Hepatotoxicity of mild analgesics. **British Journal Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 373S-379S, out. 1980.

RADI, R et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Journal Biological Chemistry**, v. 266, p. 4244–4250, mar. 1991.

RAMAIAH, S.K.; JAESCHKE, H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 6, p. 757-766, out. 2007.

REID, A.B. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 509-516, fev. 2005.

ROBERTS, R.A. et al. Role of the Kupffer Cell in Mediating Hepatic Toxicity and Carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, v. 96, n. 1, p. 2-15, 2007.

RUBIN, P.; MOLLISON, K.W. Pharmacotherapy of diseases mediated by 5-lipoxygenase pathway eicosanoids. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 83, n. 3, p. 188–197, maio 2007.

SARADA, S. et al. Role of oxidative stress and NFkB in hypoxia-induced pulmonary edema. **Experimental Biology Medicine (Maywood)**, v.223, n.9, p.1088-1098, jul.2008.

SCHUH, D. C. **Intoxicações e exposições por paracetamol: Análise de seis anos de registros do Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina – CIT/SC**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SCHWAB, J.M. et al. Resolvin e1 and protectin d1 activate inflammation resolution programmes. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 869–874, jun. 2007.

SEDLACK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, out. 1968.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T.E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and proresolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, maio 2008.

SIPE, J.D.; BARTLE, L.M.; LOOSE, L.D. Modification of proinflammatory cytokine production by the antirheumatic agents tenidap and naproxen: a possible correlate with clinical acute phase response. **Journal Immunology**, v. 148, n. 2, p. 480–484, jan. 1992.

SMITH, G.S. et al. Role of neutrophils in hepatotoxicity induced by oral acetaminophen administration in rats. **Journal Surgical Research**, v.8, n.2, p.252-258, dez.1998.

TAGER, A.M.; LUSTER, A.D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 2-3, p. 123-134, set-ago. 2003.

TAKAMATSU, Y. et al. Role of leukotrienes on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal Surgical Research**, v. 119, n. 1, p. 14-20, jun. 2004.

TITOS, E. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 17, n. 12, p. 1745-1747, jul. 2003.

TITOS, E. et al. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells. **Journal Leukocyte Biology**, v. 78, n. 4, p. 871-878, out. 2005.

TITOS, E. et al. Protection from hepatic lipid accumulation and inflammation by genetic ablation of 5-lipoxygenase. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 92, n. 1-4, p. 54-61, jun. 2010.

VALÉRIO, D.A. et al. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A₁ receptor. **British Journal Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 558-68, set. 2009a.

VALÉRIO, D.A. et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal Natural Products**, v.72, n.11, p.1975-1979, nov. 2009b.

WEI, G. et al. Acute liver failure in Sweden: etiology and outcome. **Journal Internal Medicine**, v. 262, n. 3, p. 393-401, set. 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Normas do Periódico Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.

1. Instructions for Authors

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology will consider manuscripts in all fields of pharmacology for publication as full papers or Rapid communications. The publication must make a significant contribution to pharmacological knowledge. The proceedings of meetings of the Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie are published separately as supplements. The journal publishes invited reviews, original articles and short communications. When submitting a contribution that is part of a Special Issue please include the following footnote on the title page of your submission: "This article is published as part of the Special issue on [title of Special Issue]."

2. Editorial procedure

The Managing Editor assigns each manuscript to one of the editors or to a guest editor. The editor selects the referees, corresponds with the authors and makes the final decision as to whether the manuscript is accepted. Rapid communications are generally edited by the Managing Editor in order to keep the publication delay to a minimum. When a manuscript is returned for revision, it should be resubmitted within four months; otherwise it may be regarded as a new manuscript. When a revised manuscript is submitted, the original version should also be returned. To avoid unnecessary delays, manuscripts should be prepared in accordance with journal requirements.

3. Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

4. Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

5. Text**Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- [Word template \(zip, 154 kB\)](#)
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

6. Specific remarks

Introduction: The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent research.

Methods: The methods section should follow the Introduction and should provide enough information to ensure the reproducibility of the experimental work. This includes that the full chemical name must be given for all compounds identified by code name only. Similarly, the sequence of primers used in molecular biology experiments etc. should be reported.

Results: The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided. In short papers, there may sometimes be advantages in combining the Results section and the Discussion (Results and discussion).

Discussion: The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to work by other authors.

Rapid communications: Manuscripts submitted as Rapid communications should be brief and contain complete series of experiments with results of unusual interest. A Rapid communication should normally not exceed 2–3 printed pages, including not more than two displayed items (figures, tables). The review process is accelerated. Only minor revision is normally allowed. Papers appear in the next available issue after acceptance. Authors are asked to explain in the letter that accompanies the manuscript why the data merit publication in this form. The editors reserve the right to decide whether a manuscript is suitable to be published as a Rapid communication.

7. Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

8. References

Citation: Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- a) Journal article

- Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
- Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
 - o Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI:
 - o Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- b) Book
 - South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- c) Book chapter
 - Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- d) Online document
 - Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- e) Dissertation
 - Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see: www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list. [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

9. Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

10. Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

11. Electronic Supplementary Material

- Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".
-

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that:
 - o The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
 - o Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

12. Integrity of research and reporting

Ethical standards

- Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

Conflict of interest

- Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

ANEXO B

Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Universidade
Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 126/2010

Londrina, 18 de novembro de 2010

Prezado Pesquisador


O CEEA/UEL, reunido aos 13 de abril do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Participação e mecanismo dos leucotrienos na hepatotoxicidade por acetaminofeno**", registrado no CEEA sob o nº 12/10, processo nº 2961/2010-10, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 400 camundongos Swiss, machos, pesando entre 20 e 25g, com procedência da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os animais serão divididos nos seguintes grupos: toxicidade dose-dependente induzida pelo acetaminofeno em camundongos Sv 129; participação da 5-lipoxigenase (5-LO) na letargia induzida pela intoxicação com acetaminofeno em camundongos; participação da 5-LO no estresse oxidativo induzido pelo acetaminofeno; participação da 5-LO na produção de citocinas e transaminases induzidas pelo acetaminofeno; participação da 5-LO nas alterações histológicas induzidas pelo acetaminofeno. Cada grupo será composto por 4 subgrupos com 10 animais cada e 2 repetições, e se necessário a 3 repetição será solicitado a aprovação no CEEA. O projeto está previsto para ser executado entre dezembro de 2010 e novembro de 2013.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Waldiceu A. Verri Junior
Coordenador do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas
Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Srª Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG).