



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA – UFDPar
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO - CMRV
CURSO DE BIOMEDICINA

VANDERLENE OLIVEIRA RODRIGUES

**PAPEL DA ISOFORMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA LESÃO HEPÁTICA
INDUZIDA POR NIMESULIDA**

PARNAÍBA – PIAUÍ

2025

VANDERLENE OLIVEIRA RODRIGUES

**PAPEL DA ISOFORMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA LESÃO HEPÁTICA
INDUZIDA POR NIMESULIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba –
UFDPAr, como requisito obrigatório para a
obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis
Barbosa

Coorientador: Prof. Me. Rafael da Silva
Prudêncio

PARNAÍBA – PIAUÍ

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

R696p Rodrigues, Vanderlene Oliveira
 Papel da isoforma óxido nítrico sintase na lesão hepática induzida por
 nimesulida [recurso eletrônico] / Vanderlene Oliveira Rodrigues. – 2025.
 55 p.

 TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta
 do Parnaíba, 2025.

 Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

 Coorientador Prof. Me. Rafael da Silva Prudêncio

 1. Fígado. 2. Nimesulida. 3. Lesão hepática. 4. Óxido nítrico. I.
 Barbosa, André Luiz dos Reis. II. Título.

CDD: 616.362

Elaborada por Adriana Luiza de Sousa Varão CRB-3/1493

VANDERLENE OLIVEIRA RODRIGUES

**PAPEL DA ISOFORMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NA LESÃO HEPÁTICA
INDUZIDA POR NIMESULIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao departamento do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 27/06/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (Presidente)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof. Me. Rafael da Silva Prudêncio (Examinador)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof. Me. Antônio Kleiton de Sousa (Examinador)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

PARNAÍBA - PI

2025

DEDICATÓRIA

A minha família, pelo apoio incondicional e incentivo em cada etapa desta jornada.

Aos amigos que compartilharam comigo desafios e conquistas.

Ao grupo LAFFEX, por todo o ensinamento nessa jornada.

E, acima de tudo, a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para
superar cada obstáculo.

Com todo o meu coração, dedico a vocês este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma conquista é feita sozinha; cada passo nesta trajetória foi possível graças ao apoio, incentivo e dedicação de pessoas que fizeram diferença em minha vida acadêmica e pessoal.

Primeiramente, agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e amor, por ter me guiado com paciência e por permitir que eu superasse cada desafio desta jornada.

Em especial, agradeço aos meus pais, Rosa Barros, que, apesar de ter suas asas cortadas, nunca cortou as minhas, e Enicássio Ferreira, que, mesmo atrás de um volante, pôde me guiar por uma estrada mais segura, da qual ele não teve a oportunidade. A eles devo minha eterna e imensurável gratidão por terem acreditado em mim e me dado a oportunidade de estudar e crescer.

Também sou grata às minhas irmãs, Vanderleia Oliveira e Vanessa Oliveira, por cada gesto de cuidado e por nunca me deixarem esquecer que eu era capaz; ter vocês ao meu lado fez toda a diferença.

Não poderia deixar de agradecer às minhas cachorrinhas de estimação Pandora, Harumy Barony e Pretinha (estrela no céu), que foram essenciais para que eu mantivesse minha sanidade durante essa trajetória.

Ao meu namorado, Jeseías Barbosa, meu reconhecimento e gratidão, pois, mesmo em todas as tempestades, nunca largou minha mão e dançou comigo em todas as chuvas. Obrigada por todo amor, paciência e força que você me deu.

Da mesma forma, agradeço às minhas amigas, Camily Vitória, Bianca Sáilan, Kethely Brito, Melissa Ferreira, Nikaely Brandão e Sthefany Araujo pela companhia fiel ao longo dessa caminhada.

Além disso, dirijo meus agradecimentos a toda equipe do grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia-Farmacologia Experimental – LAFFEX. Em especial, agradeço à Dr.^a Viviane Almeida, ao Me. Tino Marcos, Ana Clara Coelho, Maria da Graça Sales, Danyela Leal, Dr. João Janilson, Dr.^a Diva Magalhães e Dr. André Carvalho, que se tornaram uma segunda família acadêmica. Entre risos, cafés, experimentos, frustrações e vitórias, aprendi muito com cada um de vocês e sou grata pela parceria nessa jornada.

Também registro minha profunda gratidão à minha banca examinadora, Me. Rafael Prudêncio e Me. Kleiton Sousa, pelas observações cuidadosas, pelas palavras de incentivo e pelas contribuições tão relevantes para este momento tão importante da minha trajetória. Ademais, agradeço por tornarem a rotina científica mais leve e divertida.

Por fim, agradeço ao meu querido orientador, Dr. André Luiz dos Reis Barbosa, pela orientação dedicada, pelos ensinamentos valiosos e pelo apoio constante durante toda a realização deste trabalho. Sua experiência e paciência foram fundamentais para o meu desenvolvimento acadêmico.

Atenciosamente, Vandinha.

RESUMO

O fígado é o principal órgão envolvido na metabolização de xenobióticos, exercendo funções essenciais na biotransformação e excreção de compostos potencialmente tóxicos. A nimesulida, um anti-inflamatório não esteroidal seletivo para a enzima ciclooxigenase-2, tem ampla aplicação clínica, mas seu uso prolongado ou indiscriminado está associado à ocorrência de lesão hepática induzida por medicamentos. Essa toxicidade pode envolver mecanismos como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação de respostas inflamatórias exacerbada. O óxido nítrico, produzido pelas enzimas óxido nítrico sintase, exerce papel dual, podendo ser protetor ou deletério, especialmente quando produzido em excesso pela isoforma induzível. Com isso, o presente estudo teve como objetivo investigar papel do óxido nítrico e da isoforma do óxido nítrico sintase na hepatotoxicidade induzida pela nimesulida. Para esse objetivo, foi utilizado o protocolo experimental de indução da hepatotoxicidade em camundongos através do modelo de overdose por nimesulida em camundongos *Swiss* machos (20-30g) provenientes do Biotério Geral da Universidade Federal do Piauí. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (Protocolo:10/2021). Para isso, foram utilizados camundongos divididos em cinco grupos experimentais tratados da seguinte forma: Salina (solução salina a 0,9% v.o.); nimesulida (200 mg/kg v.o.) + DMSO 4% (150 µL i.p.); L-NAME (antagonista não específico da óxido nítrico sintase induzida; 3 mg/kg i.p.) e 1400W (antagonista específico da óxido nítrico sintase induzida; 2,5 mg/kg i.p.). A lesão hepática foi induzida por administração de nimesulida 200 mg/kg por via oral. Após a eutanásia, foi realizado a coleta sanguínea e retirado o fígado para a realização de dosagens bioquímicas, tais como: mieloperoxidase; malondialdeído; glutathione; aspartato aminotransferase; alanina aminotransferase; bilirrubina e albumina, além disso, foi avaliado a relação peso do fígado peso do animal. Os resultados obtidos de proporção entre o peso do fígado e o peso total do animal; estresse oxidativo por meio da quantificação de glutathione e malondialdeído no homogenato hepático; determinação da concentração da enzima mieloperoxidase no e marcadores hepáticos de alanina aminotransferase; aspartato aminotransferase; Bilirrubina e Albumina evidenciaram que a lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos promoveu alterações inflamatórias, oxidativas e de parâmetros bioquímicos. Diante disso, o uso de inibidores seletivos do óxido nítrico sintase induzido como agentes hepatoprotetores na hepatotoxicidade induzida por nimesulida demonstrou proteção considerável ao fígado, com atenuação dos parâmetros inflamatórios avaliados. Esses achados indicam que a óxido nítrico sintase induzida pode ser um alvo terapêutico promissor na prevenção da lesão hepática induzida por medicamentos associada à nimesulida e reforçam a importância do uso racional de anti-inflamatório não esteroidal na prática clínica.

Palavras-chaves: Fígado; nimesulida; lesão hepática; óxido nítrico.

ABSTRACT

The liver is the main organ involved in the metabolism of xenobiotics, playing essential roles in the biotransformation and excretion of potentially toxic compounds. Nimesulide, a nonsteroidal anti-inflammatory drug selective for the enzyme cyclooxygenase-2, has wide clinical application, but its prolonged or indiscriminate use is associated with the occurrence of drug-induced liver injury. This toxicity may involve mechanisms such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction and exacerbated activation of inflammatory responses. Nitric oxide, produced by nitric oxide synthase enzymes, plays a dual role, and can be protective or deleterious, especially when produced in excess by the inducible isoform. Therefore, the present study aimed to investigate the role of nitric oxide and the nitric oxide synthase isoform in nimesulide-induced hepatotoxicity. For this purpose, the experimental protocol for inducing hepatotoxicity in mice through the nimesulide overdose model in male Swiss mice (20-30 g) from the General Bioterium of the Federal University of Piauí was used. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Delta do Parnaíba (Protocol: 10/2021). For this, mice were divided into five experimental groups treated as follows: Saline (0.9% saline solution v.o.); nimesulide (200 mg/kg v.o.) + DMSO 4% (150 µL i.p.); L-NAME (non-specific antagonist of induced nitric oxide synthase; 3 mg/kg i.p.) and 1400W (specific antagonist of induced nitric oxide synthase; 2.5 mg/kg i.p.). Liver injury was induced by oral administration of nimesulide 200 mg/kg. After euthanasia, blood was collected and the liver was removed for biochemical measurements, such as: myeloperoxidase; malondialdehyde; glutathione; aspartate aminotransferase; alanine aminotransferase; bilirubin and albumin; in addition, the liver weight/animal weight ratio was evaluated. The results obtained from the ratio between liver weight and total animal weight; oxidative stress by quantifying glutathione and malondialdehyde in the liver homogenate; determination of the concentration of the enzyme myeloperoxidase in the liver and hepatic markers of alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; bilirubin and albumin showed that liver injury induced by nimesulide in mice promoted inflammatory, oxidative and biochemical parameter changes. Therefore, the use of selective inhibitors of induced nitric oxide synthase as hepatoprotective agents in nimesulide-induced hepatotoxicity demonstrated considerable protection to the liver, with attenuation of the inflammatory parameters evaluated. These findings indicate that induced nitric oxide synthase may be a promising therapeutic target in the prevention of drug-induced liver injury associated with nimesulide and reinforce the importance of the rational use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical practice.

Keywords: Liver; Nimesulide; liver injury; nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia histológica do fígado.	17
Figura 2 - Metabolização de xenobióticos.	20
Figura 3 - Lesão hepática induzida por medicamentos, destacando os eventos que levam ao dano hepático.	22
Figura 4 - Estrutura química da nimesulida.	26
Figura 5 - Cronograma experimental lesão hepática.	32
Figura 6 - Coleta para dosagens.	33
Figura 7 - Relação peso fígado e peso corporal.	36
Figura 8 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de mieloperoxidase.	37
Figura 9 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de malondialdeído.	38
Figura 10 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de glutathione.	39
Figura 11 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de alanina aminotransferase.	40
Figura 12 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de asparto aminotransferase.	41
Figura 13 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de bilirrubina.	42
Figura 14 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de albumina.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso da Nimesulida no SUS e Alternativas Terapêuticas.	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CYP 450 - Citocromo P450;

ATP - Adenosina trifosfato;

AINEs – Anti-inflamatório não esteroidais;

COX – Ciclo-oxigenase;

COX-1 – Ciclooxigenase-1;

COX-2 – Ciclooxigenase-2;

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa;

MDA – Ácido Malondialdeído;

GSH – Glutathiona;

MPO – Mieloperoxidase;

AST – Aspartato aminotransferase;

ALT – Alanina Aminotransferase;

NOS – Óxido nítrico sintase;

iNOS – Óxido nítrico sintase induzido;

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial;

LHIM – Lesão hepática induzida por medicamentos;

L-NAME – Ng-Nitro-L-arginina metil éster

HSCs – células estreladas hepáticas

DILI – *Drug-Induced Liver Injury*

HTAB – Tampão de Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

DTNB – Ácido 5,5'-Ditiobis-(2- nitrobenzoico)

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. FISIOLOGIA E MORFOLOGIA HEPÁTICA.....	17
2.2. METABOLISMO HEPÁTICO DE XENOBIÓTICOS.....	19
2.3. LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR MEDICAMENTOS (LHIM)	21
2.4. EPIDEMIOLOGIA DO USO INDISCRIMINADO DE AINES	23
2.5. NIMESULIDA.....	25
2.5.1 Lesão hepática induzida por nimesulida.....	27
2.6. PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO HEPÁTICA POR XENOBIÓTICOS	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. ANIMAIS.....	31
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	31
4.2.1. Indução experimental da lesão hepática por nimesulida.....	31
4.2.2. Avaliação da relação peso do fígado/peso do animal com ou sem lesão	33
4.3. ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	33
4.3.1. Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	33
4.3.2. Determinação de malonaldeído (MDA) no tecido hepático	34
4.3.3. Análise dos níveis de glutathione (GSH) no tecido hepático.....	34
4.3.4. Determinação de níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e albumina	35
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS	36
5.1. ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO/PESO DO ANIMAL COM OU SEM LESÃO.....	36
5.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO HEPÁTICO.....	36
4.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO NO TECIDO HEPÁTICO	37
4.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATHIONE NO TECIDO HEPÁTICO	38
5.5. ANÁLISE NÍVEIS DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), BILIRRUBINA E ALBUMINA	39
5.5.1 Alanina aminotransferase (ALT)	39
5.5.2 Aspartato aminotransferase (AST)	40
5.5.3 Bilirrubina.....	41

5.5.4. Albumina	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O fígado é um dos principais órgãos responsáveis pela metabolização e excreção de xenobióticos, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo. Atua como o principal local de biotransformação de fármacos, convertendo compostos lipofílicos em formas hidrossolúveis, facilitando sua eliminação. Essa atividade depende da ação de enzimas específicas, como as do complexo citocromo P450 (CYP 450), cuja expressão pode ser influenciada por fatores genéticos, ambientais e fisiológicos. O metabolismo de fármacos ocorre por meio de um conjunto de reações enzimáticas organizadas em fases distintas: a fase I, conhecida como fase de modificação; a fase II, denominada fase de conjugação; e, em determinados casos, por fim, a fase III é responsável pela excreção efetiva dos metabólitos para fora das células (Susa *et al.*, 2022).

Entre os medicamentos amplamente utilizados na prática clínica, destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), devido à sua eficácia no tratamento de processos inflamatórios, dor e febre, bem como pela facilidade de acesso. No entanto, o uso prolongado ou em doses elevadas desses fármacos está associado a uma série de efeitos adversos, incluindo toxicidade hepática, que pode variar de alterações assintomáticas nas enzimas hepáticas até lesões graves, como hepatite fulminante (Costa *et al.*, 2021). Esse cenário é agravado pelo uso indiscriminado dos AINEs, muitas vezes sem prescrição médica, o que representa um importante desafio para a saúde pública.

A nimesulida, consumida em larga escala no Brasil, aparece no ranking de um dos medicamentos mais vendidos em farmácias e é considerada um possível agente indutor de dano hepático. Diante disso, foi proibida em diversos países como EUA, Reino Unido, Alemanha, Canadá e Japão. A lesão hepática induzida por medicamentos (LHIM), também conhecida como DILI (*Drug-Induced Liver Injury*), é uma das principais causas da retirada de medicamentos do mercado, sendo caracterizada por alterações bioquímicas que refletem dano ao tecido hepático. Sendo assim, a LHIM pode ser de natureza idiossincrática ou dose-dependente, o que dificulta seu diagnóstico e manejo clínico. Diante disso, a nimesulida um AINEs no qual, tem maior afinidade para a inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Barbosa *et al.*, 2010; Villanueva – paz *et al.*, 2021).

Visto isso, a hepatotoxicidade induzida por nimesulida está relacionada a diferentes mecanismos moleculares, sendo a formação de metabólitos reativos, o estresse oxidativo e a ativação de respostas inflamatórias os mais frequentemente descritos na literatura. Estudos indicam que a bioativação hepática da nimesulida pode gerar intermediários tóxicos capazes de interagir com componentes celulares, promovendo disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e morte celular (Domingues *et al.*, 2019; Iwakiri *et al.*, 2015).

Entre essas espécies, o óxido nítrico (NO) tem despertado grande interesse devido à sua atuação dual no fígado, podendo exercer efeitos tanto protetores quanto deletérios, dependendo da sua concentração, da isoforma da enzima óxido nítrico sintase (NOS) envolvida e das condições do microambiente hepático. O NO é produzido a partir da L-arginina por diferentes isoformas da NOS, como a endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS). A expressão da iNOS no fígado, em particular, tem sido associada à formação de peroxinitrito, uma espécie reativa altamente citotóxica que contribui para o dano celular (Bañuelos *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2018).

O NO é uma molécula sinalizadora importante na fisiologia hepática, mas, em situações de inflamação, a produção excessiva via iNOS pode induzir dano oxidativo, nitratação de proteínas e disfunção mitocondrial (Beckman e Koppenol, 1996; Choi *et al.*, 2002). Dessa forma, a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na hepatotoxicidade induzida por AINEs associado à atuação do óxido nítrico, é fundamental para a compreensão dos eventos celulares que culminam em lesão hepática (Meunier; Larrey *et al.*, 2018). A aplicação de modelos experimentais permite não apenas identificar biomarcadores precoces de dano, como também avaliar o impacto de agentes bioativos no processo inflamatório e no estresse oxidativo hepático (Barbora *et al.*, 2010).

Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da nimesulida sobre o fígado, com ênfase nos marcadores de estresse oxidativo e inflamação com a avaliação de marcadores bioquímicos de lesão hepática e na participação do NO nos mecanismos de hepatotoxicidade. A elucidação desses processos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes, minimizando os riscos à saúde decorrentes do uso inadequado de anti-inflamatórios não esteroidais.

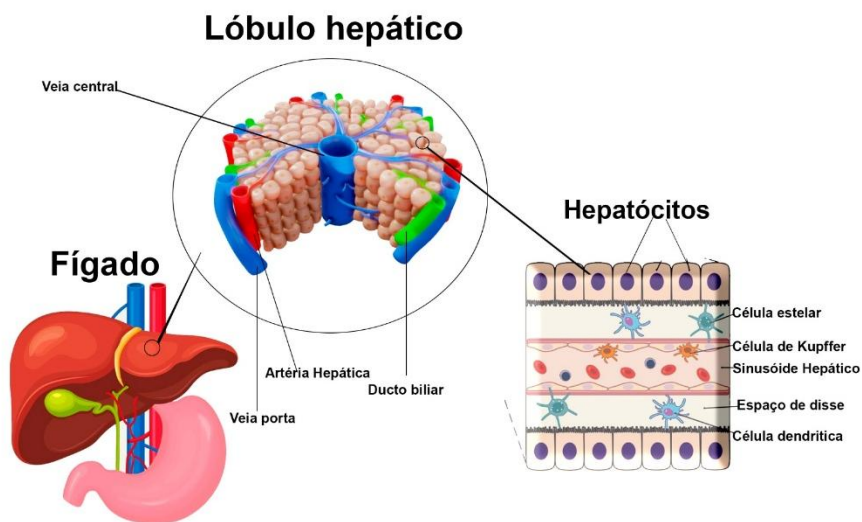
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FISIOLOGIA E MORFOLOGIA HEPÁTICA

O fígado é um órgão vital, considerado o segundo maior do corpo humano desenvolvendo diversos processos fisiológicos no organismo e pertence ao sistema digestório. É localizado na parte superior do abdômen, abaixo do diafragma e acima do estômago, tem cerca de 20 cm de comprimento e pesa 1,5 kg em homens e 1,2 kg em mulheres. É subdividido em quatro lobos, entre eles, direito, esquerdo, caudado e quadrado (Trefts; Gannon; Wasserman, 2017).

Uma das principais funções do fígado é filtrar o sangue e eliminar toxinas, as quais, são enviadas para os rins e eliminadas através da urina, além de produzir proteínas, fatores de coagulação, triglicerídeos, colesterol e bile. Outra característica importante do fígado é a sua capacidade de regeneração após algum trauma. Na figura 1 é possível observar diversas células encontradas no fígado, entre elas, hepatócitos, células epiteliais biliares, células estreladas, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais do fígado, cada uma dessas células compõem e desempenha funções cruciais para o fígado (Triviño; Abib, 2003).

Figura 1 – Anatomia histológica do fígado.



Fonte: Autoria própria.

Nesse contexto, os hepatócitos destacam-se como a principal população de células hepáticas, constituindo cerca de 80% onde, desempenham funções cruciais para o fígado. Entre elas, funções exócrinas, gliconeogênese na conversão de aminoácidos em glicose, desintoxicação na quebra e conjugação de toxinas ingeridas,

incluindo drogas, a desaminação, produz a ureia a partir de aminoácidos e armazenamento de glicogênio, lipídeos e ferro. Cada hepatócito possui superfícies laterais e sinusoidais, núcleo arredondado localizado no centro da célula, cercado por citoplasma, no seu interior é rico em organelas tais como complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso e rugoso (Si-Tayeb; Lemaigre; Duncan, 2010).

As células epiteliais biliares conhecida como colangiócitos, é a segunda população de células, que desempenha função epitelial de revestimento do lúmen dos ductos biliares, contribuindo assim, para a conservação dos hepatócitos transportando ácidos biliares. Eles contribuem para a secreção biliar e atuam por meio do fluxo biliar independente de ácidos biliares, impulsionado pelo transporte ativo de eletrólitos. Em um fígado saudável diversos hormônios e mediadores são conhecidos por contribuir para a secreção de fluidos pelos colangiócitos. Entre eles, a secretina, acetilcolina, adenosina trifosfato (ATP) e a bombesina estão presentes contribuindo (Pauta *et al.*, 2013).

As células estreladas hepáticas (HSCs) apesar de constituírem uma população menor no fígado, elas produzem diversas funções responsáveis por deposição e organização de colágeno em um fígado lesionado, além disso, elas são dinâmicas desempenham um papel central na deposição da matriz extracelular hepática durante todas as formas de lesão hepática (Mederacke *et al.*, 2015). Quando apresentada em forma de quiescente elas armazenam vitamina A em gotículas lipídicas. Após uma lesão as HSCs são ativadas e proliferam progressivamente perdendo os estoques de vitamina (Kamm *et al.*, 2022).

As células de Kupffer são a população de macrófagos que residem no fígado, especificamente nos sinusoides, constituem cerca de 80% a 90% de todos os macrófagos do corpo humano e são componentes do sistema imunológico. Possuem formato ameboide, sua superfície contém microvilosidades, pseudópodes e lamelipódios, possuem aparelho de Golgi, ribossomos, centríolos, microfilamentos e microtúbulos em seu citoplasma (Basit; Tan; Webster, 2020).

No fígado, essas células reconhecem os estímulos patogênicos introduzidos pela circulação portal, sua função primária é remover detritos e partículas estranhas provenientes do sistema porta hepático durante sua passagem pelo fígado. Além disso, segundo Roberts e colaboradores (2007) elas podem produzir citocinas

inflamatórias, radicais de oxigênio, Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteases, acredita – se que a produção desses mediadores contribui para o desenvolvimento de lesão hepática.

As células endoteliais sinusoidais hepáticas (LSECs), são uma população que formam placas de peneiras no lúmen sinusoidal que desempenha função de troca de nutrientes e partículas entre o plasma e os tipos de células representa aproximadamente cerca de 15% a 20% das células hepáticas, porém apenas 3% do volume total do fígado (Deleve *et al.*, 2015). As LSECs desempenham um papel fundamental no início e na progressão de doenças hepáticas crônicas, elas capilarizam e perdem suas devidas propriedades protetoras. Shah e colaboradores (1997), demonstraram que as LSECs são a principal fonte de NO no fígado normal. Em seu modo saudável mantem a quiescência das células estreladas hepáticas, inibindo assim seu efeito vasoconstritor.

2.2 METABOLISMO HEPÁTICO DE XENOBIÓTICOS

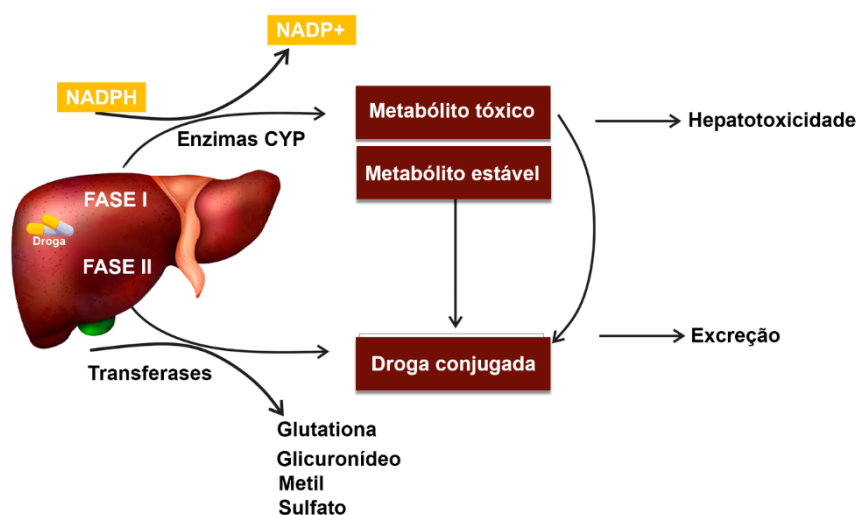
O metabolismo hepático é o principal processo responsável por transformar e eliminar substâncias benéficas e prejudiciais ao organismo, como medicamentos, álcool, drogas de abuso e compostos de origem vegetal. O fígado produz uma variedade de enzimas que degradam e inativam essas substâncias, favorecendo sua excreção, principalmente pela urina e pela bile (Sharma *et al.*, 2021).

Além disso, o fígado recebe aproximadamente 25% do débito cardíaco, o que o capacita a exercer funções metabólicas essenciais à manutenção da homeostase corporal (Gordillo-Bastidas *et al.*, 2020). Substâncias endógenas e exógenas passam por etapas específicas de metabolismo nos hepatócitos, divididas em três fases principais: captação, transformação e secreção (Godoy *et al.*, 2021).

Na fase de captação, compostos presentes no plasma são absorvidos pelos hepatócitos por meio de transportadores e canais da membrana basolateral. Em seguida, ocorre o processamento intracelular, que inclui o transporte interno e a modificação química das moléculas com o auxílio de enzimas e cofatores. Essa etapa é especialmente importante para compostos lipofílicos, que são convertidos em formas mais hidrossolúveis, facilitando sua eliminação renal ou biliar (Zanger e Schwab, 2023). Na fase de secreção, os compostos modificados podem ser excretados na bile ou retornados ao plasma para eliminação renal ou reutilização sistêmica.

Algumas substâncias são inicialmente degradadas nos lisossomos, enquanto outras passam por reações de biotransformação, divididas em duas fases como demonstrado na figura 2. As reações de fase I envolvem oxidação, redução e hidrólise, sendo catalisadas principalmente pelo sistema enzimático citocromo P450 (CYP450), presente no retículo endoplasmático (Guengerich *et al.*, 2021). Embora importantes, essas reações normalmente promovem apenas um leve aumento na solubilidade das substâncias. Portanto, a fase II, composta por reações de conjugação (como glicuronidação e sulfatação), é frequentemente necessária para tornar os compostos suficientemente solúveis para excreção (Kumar *et al.*, 2023).

Figura 2 - Metabolização de xenobióticos.



Legenda: Esquema representativo do metabolismo hepático de fármacos, dividido em Fase I e Fase II. Na Fase I, enzimas do citocromo P450 (CYP) promovem reações de oxidação, redução ou hidrólise, gerando metabólitos que podem ser estáveis ou tóxicos. Na Fase II, ocorrem reações de conjugação com glutaciona, glicuronídeo, grupos metil ou sulfato, catalisadas por transferases, resultando em compostos mais hidrossolúveis e passíveis de excreção. A formação de metabólitos tóxicos, quando não eficientemente conjugados, pode levar à hepatotoxicidade.

Fonte: Larson *et al.*, (2007).

Dada a importância dessas atividades, o uso de marcadores hepáticos é essencial para avaliar tanto a integridade estrutural quanto a capacidade funcional do fígado (Keerl e Bernsmeier, 2020). Esses marcadores bioquímicos permitem a detecção precoce de distúrbios hepáticos e são amplamente utilizados na prática clínica e laboratorial. Entre os principais, destacam-se: alanina aminotransferase

(ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e albumina (Iluz-Freundlich *et al.*, 2020).

A ALT é uma enzima intracelular predominante nos hepatócitos, desempenhando papel fundamental no metabolismo de aminoácidos. Sua presença aumentada no soro ocorre principalmente devido à necrose ou lesão celular hepática, sendo um marcador sensível de dano hepatocelular (Fonseca *et al.*, 2022). A AST, embora também se eleve em lesões hepáticas, possui menor especificidade por estar presente em outros tecidos, como o cardíaco e o muscular esquelético.

A bilirrubina é um produto da degradação da hemoglobina, metabolizada pelo fígado para excreção na bile. A bilirrubina indireta (não conjugada) é convertida em direta (conjugada) nos hepatócitos. A elevação da bilirrubina total pode indicar disfunção hepática, obstrução biliar ou processos hemolíticos (Zhou *et al.*, 2021). Outro parâmetro importante na avaliação da função hepática é a albumina, principal proteína plasmática sintetizada no fígado, fundamental para a manutenção da pressão oncótica e transporte de substâncias. Níveis reduzidos de albumina são observados em casos de insuficiência hepática crônica, desnutrição ou síndrome nefrótica (Chen *et al.*, 2021).

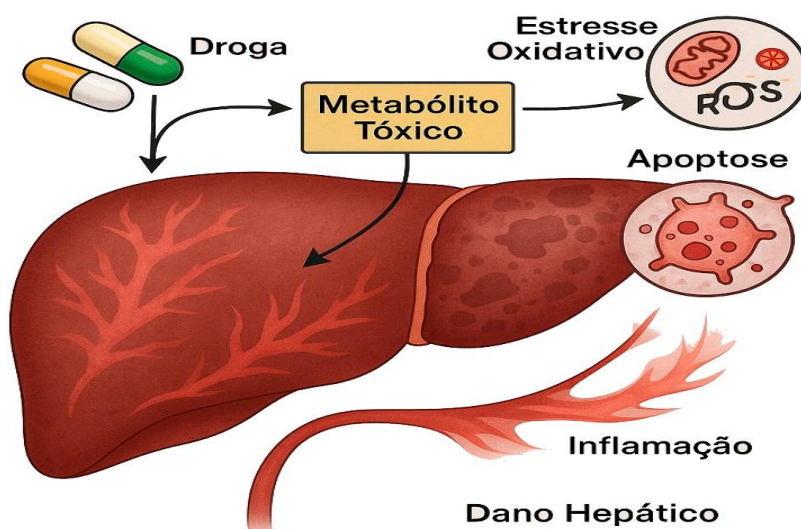
2.3 LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA POR MEDICAMENTOS (LHIM)

A LHIM, é uma condição caracterizada por danos ao fígado causados por substâncias químicas, como medicamentos, fitoterápicos e suplementos alimentares. Essa forma de lesão hepática tem se tornado uma preocupação crescente nos países ocidentais devido ao aumento do consumo dessas substâncias (Björnsson *et al.*, 2023). A resposta imunológica na LHIM pode ser aguda ou crônica, e sua fisiopatologia é geralmente classificada em dois tipos principais: intrínseca e idiossincrática (Hoofnagle *et al.*, 2021).

A LHIM intrínseca é geralmente dose-dependente e previsível. É causada por substâncias com toxicidade direta ao fígado, sendo a acetaminofeno (paracetamol) o exemplo mais clássico. A lesão pode ocorrer em poucas horas ou dias após a ingestão de doses elevadas. Nesse processo, como demonstrado na figura 3, os fármacos são metabolizados pelo fígado, resultando na formação de metabólitos reativos, os quais promovem estresse oxidativo e lesão das células hepáticas (Chen *et al.*, 2021). Esse desequilíbrio leva ao dano mitocondrial e à ativação de vias de apoptose, culminando

na morte programada dos hepatócitos. Paralelamente, os danos celulares desencadeiam uma resposta inflamatória mediada por células imunológicas, como macrófagos e células de Kupffer, amplificando o processo lesivo no fígado. Esses mecanismos estão envolvidos tanto em reações hepáticas previsíveis quanto nas formas idiossincráticas da LHIM (Kullak-Ublick *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2019).

Figura 3 - Lesão hepática induzida por medicamentos, destacando os eventos que levam ao dano hepático.



Legenda: Metabolização de fármacos no fígado. Durante a biotransformação, a droga conjugada pode gerar um metabólito altamente tóxico, que se liga às proteínas hepáticas. Esse processo leva a um desequilíbrio no sistema imune, desencadeando respostas imunológicas e ativação de vias apoptóticas, resultando na morte de algumas células do fígado.

Fonte: Autoria própria.

Por outro lado, a LHIM idiossincrática é imprevisível, geralmente não relacionada à dose e ocorre em indivíduos geneticamente predispostos. Essa forma pode se manifestar semanas ou até meses após o início do uso da substância. Entre os agentes mais frequentemente associados a essa forma estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), antibióticos e suplementos alimentares (Chalasani *et al.*, 2021). De acordo com Teschke e colaboradores (2019), os mecanismos da LHIM idiossincrática podem ser divididos em dois tipos: imunomediados, associados à hipersensibilidade (com manifestações como febre, erupções cutâneas e eosinofilia), e não imunomediados, com alterações mitocondriais e apoptose celular.

Nesse contexto, os AINEs que é considerado um exemplo clássico de lesão hepática idiossincrática compartilham um mecanismo de ação comum: a inibição das

enzimas ciclooxigenases (COXs), o que resulta na redução da síntese de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) a partir do ácido araquidônico. As isoformas mais bem caracterizadas dessas enzimas são a COX-1 (constitutiva) e a COX-2 (indutível), sendo esta última associada a processos inflamatórios (De Andrade *et al.*, 2021).

2.4. EPIDEMIOLOGIA DO USO INDISCRIMINADO DE AINES

Conforme Ranquel e seus colaboradores (2016), estima-se que no mundo milhares de pessoas fazem o uso irracional diariamente de anti-inflamatórios que não precisam de prescrição médica. A prevalência de automedicação no Brasil apresenta um crescimento significativo nos últimos anos. A nimesulida, embora tenha sido amplamente prescrita no Brasil por muitos anos, passou a ser alvo de discussões quanto à sua segurança, especialmente por conta de relatos de hepatotoxicidade. Esse fármaco apresenta algumas limitações, sendo a inflamação gastrointestinal a mais grave, frequentemente acompanhada de náuseas e dor abdominal. Esses efeitos podem se agravar com o uso inadequado e sem orientação médica (Castro *et al.*, 2023).

Diante disso, a tabela 1 resume as principais informações relacionadas à utilização da nimesulida no Sistema Único de Saúde (SUS), destacando sua exclusão da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) devido aos riscos de hepatotoxicidade associados ao seu uso. Além disso, são listados os AINEs que permanecem disponíveis pelo SUS, como o ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno, os quais possuem melhor perfil de segurança em relação à nimesulida. A tabela 1 apresenta alternativas terapêuticas indicadas conforme o quadro clínico, como o paracetamol e os corticosteroides em casos específicos, além de reforçar a importância da individualização do tratamento. Essa sistematização permite uma melhor compreensão sobre a racionalização do uso de medicamentos no serviço público de saúde e embasa decisões terapêuticas mais seguras e eficazes.

Tabela 1 - Uso da Nimesulida no SUS e Alternativas Terapêuticas.

Aspecto	Descrição	Referência
Disponibilidade da Nimesulida no SUS	A nimesulida não faz parte da RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) desde 2010. Portanto, não é padronizada pelo SUS.	Ministério da Saúde, RENAME 2022
Motivos da exclusão	Associada a eventos adversos hepáticos graves e risco elevado de toxicidade hepática, especialmente em uso prolongado.	ANVISA; EMA (European Medicines Agency)
Outros AINEs disponíveis no SUS	O SUS disponibiliza outros AINEs como: <ul style="list-style-type: none"> •Ibuprofeno •Diclofenaco •Naproxeno •Ácido acetilsalicílico (AAS) •Indometacina 	RENAME 2022; Bula do Cidadão – ANVISA
Alternativas terapêuticas à Nimesulida	Depende do quadro clínico. Substituições comuns: <ul style="list-style-type: none"> • Ibuprofeno • Diclofenaco • Paracetamol • Corticosteroides 	UpToDate; Ministério da Saúde; Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia
Considerações clínicas	A escolha deve considerar: <ul style="list-style-type: none"> • Idade do paciente • Doença hepática prévia • Tempo de uso necessário • Comorbidades 	Diretrizes Clínicas do SUS; ANVISA

Legenda: Panorama sobre a utilização da nimesulida no Sistema Único de Saúde (SUS), abordando sua indisponibilidade na RENAME, os principais problemas relacionados ao seu uso, os AINEs disponíveis na rede pública e as alternativas terapêuticas mais seguras, com base em diretrizes nacionais e internacionais.

Fonte: Autoria própria.

Silva e colaboradores (2022) realizaram um estudo em municípios do interior da Bahia, no qual, revelam uma prática comum de automedicação. Em Poções (BA), por exemplo, observou-se que medicamentos como diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e nimesulida estão entre os mais vendidos, frequentemente sem prescrição médica. Outro estudo em Itarantim (BA) identificou a nimesulida como o segundo AINE mais dispensado, representando 20,92% das formulações isoladas vendidas (Bitencourt *et al.*, 2021).

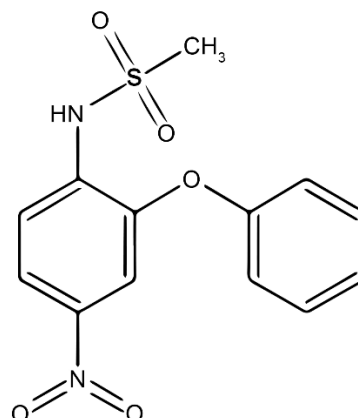
A popularidade da nimesulida no Brasil contrasta com sua proibição em diversos países devido aos riscos à saúde. Em 2024, foram vendidas mais de 102 milhões de caixas do medicamento no país, gerando um faturamento superior a R\$ 891 milhões. Um estudo recente identificou 468 casos de lesões hepáticas relacionadas ao uso de medicamentos, incluindo a nimesulida (Bessone *et al.*, 2024).

A facilidade de acesso à nimesulida, muitas vezes sem a exigência de receita médica, contribui para seu uso indiscriminado (Marques *et al.*, 2022). Especialistas alertam para a necessidade de políticas públicas que promovam o uso racional de AINEs e reforcem a importância da orientação médica na prescrição desses medicamentos (Almeida *et al.*, 2024).

2.5 NIMESULIDA

A nimesulida (N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida) observada quimicamente na figura 4 possui a fórmula molecular $C_{13}H_{12}N_2O_5S$, é um AINE amplamente comercializado em diversos países, apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, atribuídas à sua potente capacidade de inibir a enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) o que reduz a produção de prostaglandinas. É classificada como um ácido fraco, apresentando baixa solubilidade em água, solubilidade limitada em etanol e elevada solubilidade em acetona. Representa o protótipo da classe das metassulfonamidas, destacando-se por sua potente ação anti-inflamatória (Ruela; Araújo; Pereira, 2009).

Figura 4 - Estrutura química da nimesulida.



Fonte: Ruela *et al.*, (2009).

A nimesulida foi comercializada na Itália em 1985, porém somente em 1997 foi reconhecido seu efeito potencializador para induzir lesão hepática. Em virtude do seu papel terapêutico é utilizado em grande escala no Brasil. Porém, o uso prolongado desse medicamento pode demonstrar riscos tóxicos a saúde. Estudos revelam que esse medicamento pode levar a insuficiência hepática, e em alguns casos levar a morte (Junior *et al.*, 2022).

Quando administrada em doses recomendadas ao indivíduo em comprimido 100 mg ou suspensão oral 50 mg/mL apresenta baixa incidência de lesão hepática. Entretanto, doses superiores podem apresentar efeitos prejudiciais pois a absorção desse fármaco é extremamente distribuída e pode se depositar em alguns locais e órgãos específicos (Akbari *et al.*, 2019). Sua administração logo após uma refeição, não altera seu efeito terapêutico, assim como ocorre em outros AINEs, pois se liga 99% a albumina, proteína mais abundante circulante no plasma. A nimesulida apresenta um volume de distribuição entre 0,18 e 0,39 L/kg e sua metabolização ocorre no fígado através do CYP 450 (Cullen; Stalker, 2016).

O mecanismo da nimesulida se baseia na inibição da COX-2, no qual decorre da interação da sulfonamida da molécula do fármaco com um resíduo de arginina em sua cavidade hidrofílica da enzima. Seu efeito está diretamente associado a inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) fisiológica, no qual ela é recorrente da produção de prostaglandinas e resulta como proteção gástrica (Bernareggi *et al.*, 1998). Em

contraste, diferente disso, a COX-2 se encontra presente na inflamação e é denominada de enzima indutiva.

2.5.1 Lesão hepática induzida por nimesulida

A hepatotoxicidade induzida pela nimesulida foi relatada pela primeira vez em 1997 (Bessone *et al.*, 1997). Esse AINE é metabolizado no fígado, principalmente pelas enzimas do sistema citocromo P450, resultando na formação de metabólitos reativos como o 4-hidroxi-nimesulida. Esses metabólitos podem causar estresse oxidativo e induzir lesões hepáticas (Kwon *et al.*, 2019). Em concentrações elevadas, a nimesulida pode penetrar nas mitocôndrias dos hepatócitos, onde forma intermediários reativos que causam danos mitocondriais. Isso leva à diminuição da produção de ATP, disfunção celular e necrose hepática (Boelsterli *et al.*, 2022). Além disso, alguns casos de lesão hepática associada à nimesulida envolvem reações de hipersensibilidade, caracterizadas por resposta imunológica anormal do organismo ao fármaco (Aithal *et al.*, 2007).

A lesão hepática induzida por nimesulida é considerada idiossincrática, ou seja, não previsível e independente da dose administrada (Bernardes *et al.*, 2014). Sugere-se que o acúmulo de metabólitos tóxicos, é absorvida e transportada até o fígado, onde passa por biotransformação hepática. Durante esse processo, pode ser convertida em metabólitos reativos potencialmente tóxicos, que interagem com proteínas hepáticas formando complexos que podem ser reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico (Teschke *et al.*, 2013).

Essa resposta imune inadequada é característica das lesões hepáticas idiossincráticas, diferindo das reações dose-dependentes previsíveis. Nesses casos, ocorre ativação de células do sistema imune, como linfócitos T e macrófagos, que desencadeiam uma resposta inflamatória contra os hepatócitos, levando à disfunção e morte celular (Kullak-Ublick *et al.*, 2017). Esse mecanismo, ainda não completamente elucidado, sugere que fatores genéticos e imunológicos individuais desempenham papel central na suscetibilidade à lesão hepática induzida por fármacos como a nimesulida.

Diversos relatos de casos e estudos clínicos têm evidenciado a relação entre o uso da nimesulida e a ocorrência de lesões hepáticas. Um exemplo relevante foi publicado no *São Paulo Medical Journal*, no qual os autores descreveram o caso de

uma paciente idosa que evoluiu para insuficiência hepática aguda fatal após seis dias de tratamento com nimesulida, ressaltando o potencial risco hepatotóxico associado ao fármaco (Tiwari *et al.*, 2025). Adicionalmente, uma revisão de literatura revelou que a maioria dos casos de hepatotoxicidade atribuída à nimesulida ocorre em mulheres, com idade média de 62 anos, sendo a icterícia uma das manifestações clínicas mais frequentemente observadas (Kwon *et al.*, 2019).

2.6 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA LESÃO HEPÁTICA POR XENOBIÓTICOS

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa produzida endogenamente por diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) é produzida pelo corpo humano através da síntese da L-Arginina com o NOS. No fígado, o NO desempenha papéis diversos, podendo ser protetor ou prejudicial, dependendo de sua origem, concentração e contexto fisiopatológico. Em condições fisiológicas, o NO derivado da eNOS, produzido pelas células endoteliais sinusoidais hepáticas, contribui para a regulação do tônus vascular intra-hepático, manutenção da perfusão sinusoidal e inibição da ativação de células estreladas hepáticas e de Kupffer. Essa produção basal de NO é essencial para a homeostase hepática (Fang *et al.*, 2021). Por outro lado, em situações patológicas, como inflamação ou exposição a endotoxinas, ocorre a indução da iNOS, resultando em produção excessiva de NO. Essa superprodução está associada à formação de espécies reativas de nitrogênio, contribuindo para o estresse oxidativo e dano hepatocelular (Sharma *et al.*, 2007).

A família das enzimas NOS catalisa a conversão da L-arginina (L-Arg) em L-citrulina (L-Cit), com a produção de NO. Esse processo ocorre, em duas etapas, ambas mediadas por reações de oxidação dependentes do grupo heme e envolvendo, ao todo, a transferência de cinco elétrons. Na primeira etapa, a L-Arg é hidroxilada, originando o intermediário L-NG-hidroxi-arginina (NOH-L-Arg), sendo “NG” indicativo de que o grupo hidroxila está ligado ao nitrogênio do grupo guanidina, em uma reação semelhante às catalisadas pelo citocromo P450. Na etapa seguinte, o NOH-L-Arg é convertido em L-Cit e NO por meio de um mecanismo atípico, que envolve uma oxidação com perda de apenas um elétron (Barreto *et al.*, 2005)

No entanto, a superprodução de NO pela iNOS pode agravar o dano hepático, evidenciando um comprometimento no organismo, um desequilíbrio no qual contribui

para estresse oxidativo, dano mitocondrial e morte celular (Santos *et al.*, 2023). Nessas circunstâncias, ocasionado pelo estresse oxidativo é letal as células. Em modelos de endotoxemia, a produção exagerada de NO pela iNOS compromete a microcirculação hepática, levando à disfunção perfusional e agravamento da lesão hepática (Kim *et al.*, 2024). Corso e colaboradores (1999) observaram que o bloqueio da produção de NO, por meio de inibidores como o Ng-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), mostrou-se eficaz na reversão da disfunção circulatória e melhora da perfusão hepática.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

✓ Avaliar o papel do óxido nítrico e da isoforma da oxido nítrico sintase na hepatotoxicidade provocada pela nimesulida.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a proporção entre o peso do fígado e o peso total do animal;
- ✓ Examinar os marcadores de estresse oxidativo por meio da quantificação de glutathione (GSH) e malondialdeído (MDA) no homogenato hepático;
- ✓ Investigar a migração de leucócitos determinando a concentração da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido hepático de camundongos;
- ✓ Analisar os níveis dos marcadores hepáticos de alanina aminotransferase ALT; aspartato aminotransferase AST; Bilirrubina e Albumina.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da espécie *Swiss* machos (20-30g), provenientes do Biotério Geral da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Para os experimentos foi necessário um número de 8 animais por grupo (n=8). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12h) controlados, permanecendo com ração apropriada e água *ad libitum*. Todos os procedimentos e tratamentos realizados estão de acordo com o Guia de Cuidados de Uso de Animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Bem como, no presente projeto a eutanásia foi realizada com base nos princípios e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de acordo com a resolução normativa nº 37 de 15.02.2018. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba- UFDPAr sob número de Protocolo Nº 10/2021.

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1. Indução experimental da lesão hepática por nimesulida

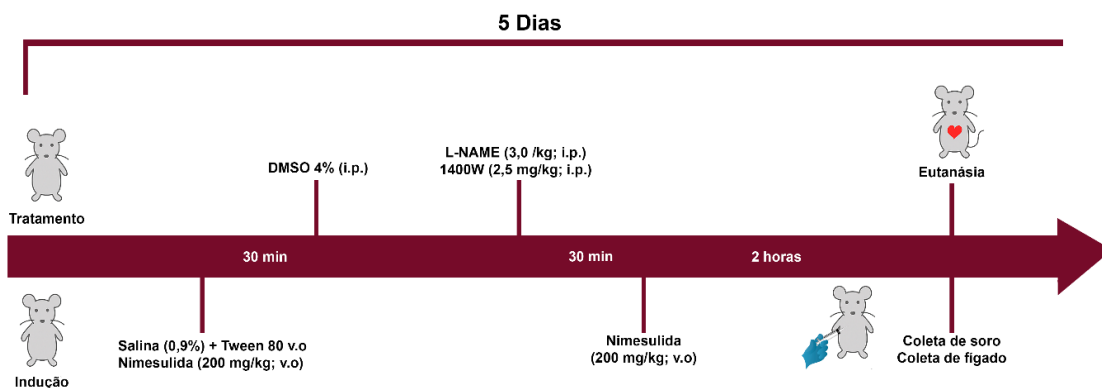
Inicialmente, a indução da hepatotoxicidade em camundongos foi realizada por meio do modelo de overdose induzida por nimesulida, conforme relatado na literatura (Singh *et al.*, 2012; Dias Junior *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2021). Os animais foram divididos em 4 grupos:

1. Salina (0,9%) + Tween 80 (v.o.);
2. Grupo Nimesulida 200 mg/kg (v.o.) + DMSO 4% (i.p.);
3. Grupo 1400W 2,5 mg/kg (i.p.) + Nimesulida 200 mg/kg (v.o.);
4. Grupo L-NAME 3,0 mg/kg (i.p.) + Nimesulida 200 mg/kg (v.o.).

A indução da hepatotoxicidade e o tratamento foi realizado conforme a divisão dos animais em quatro grupos distintos por 5 dias consecutivos como demonstrado na figura 5. O grupo controle recebeu apenas 150 µL de solução salina (0,9%) + Tween 80 por via oral. O grupo nimesulida (200 mg/kg) + DMSO 4% recebeu 150 µL de solução por via intraperitoneal de DMSO 4% e foi administrada 150 µL por via oral de nimesulida, uma vez ao dia, durante os cinco dias. Os animais dos grupos 1400W

receberam o antagonista específico da isoforma iNOS na dose de 2,5 mg/kg. Os animais do grupo L-NAME receberam o antagonista não específico da isoforma iNOS na dose de 3,0 mg/Kg. Em todos os casos, o antagonista foi dissolvido em solução salina estéril e administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução com nimesulida.

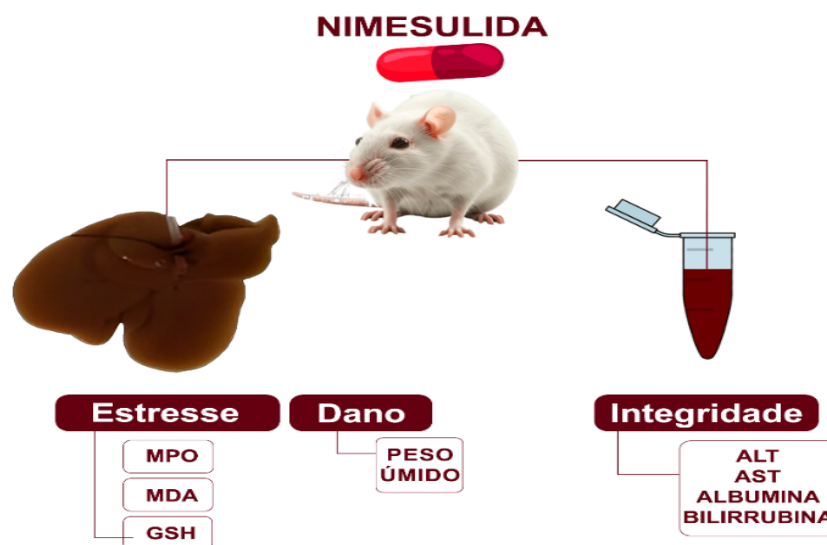
Figura 5 - Cronograma experimental lesão hepática.



Fonte: Autoria própria.

No quinto dia, duas horas após o último tratamento e indução os animais foram eutanasiados com uma dose letal de quetamina (240mg/kg) + xilazina (30mg/kg) realizada pela médica veterinária responsável técnica da UFDPAr. Em seguida foi realizado a coleta de sangue total por punção cardíaca para análises bioquímicas das enzimas hepáticas. Posteriormente como demonstrado na figura 6, as cavidades abdominais dos animais foram abertas e retirado o fígado, o tecido foi dividido em amostras e estocado tubos do tipo eppendorf, armazenado a -80°C para se realizar posteriormente as dosagens bioquímicas cabíveis.

Figura 6 - Coleta para dosagens.



Fonte: Autoria própria.

4.2.2. Avaliação da relação peso do fígado/peso do animal com ou sem lesão

Para avaliação peso fígado/peso do animal os animais foram pesados antes da eutanásia e, em seguida, aqueles com ou sem lesão, tratados com 1400W e L-NAME, tiveram o fígado removido. Posteriormente, o órgão foi pesado, e os resultados foram expressos com base na relação entre o peso do fígado e o peso corporal do animal.

4.3. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

4.3.1. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

Para a avaliação da atividade da MPO no tecido hepático de animais, frações do fígado foram retiradas e processadas, a análise dessa enzima seguiu o protocolo estabelecido por Bradley e colaboradores (1982). A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo indireto da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração dessa enzima, foram pesados de 20 a 25 mg do tecido hepático e adicionado tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Posteriormente, foram homogeneizados num Polytron (13000 rpm) e centrifugados por 20 minutos á, (4500 rpm), em uma centrífuga refrigerada (4°C). Logo em seguida, o sobrenadante foi pipetado numa placa (10 µL) posteriormente foram acrescentados nessa placa 200 µL da solução de leitura (27 ml de H₂O + 5 mg de O-dianisidina em

3 mL de fosfato de potássio + 15 µL de peróxido de hidrogênio H₂O₂). Em seguida a placa foi lida em um leitor de ensaio imunoenzimático (ELISA) a 450 nm. Os resultados foram expressos em UMPO/mg de tecido.

4.3.2. Determinação de malonaldeído (MDA) no tecido hepático

Para a análise dos níveis de MDA no tecido hepático, determinados pelo método de Dutra e colaboradores (2021); Mihara & Uchiyama (1978). As amostras de tecido foram homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) na proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de KCl a 0,15 M, em seguida foram retirados 250 µL do homogenato e acrescentado 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄ 1%) e 0,5 mL de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico (0,6%). Os tubos foram aquecidos por 45 minutos em banho maria e a mistura reacional foi então resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 2 mL de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1 minuto com um misturador "vortex" e depois centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e a absorbância da camada orgânica mensurada em 520 e 535 nm. Os resultados estão expressos em mol de MDA/g de tecido.

4.3.3. Análise dos níveis de glutathiona (GSH) no tecido hepático

O método de Sedlak e Lindsay (1968) foi utilizado para análise de GSH nas amostras. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não proteicos, amostras pesando entre 50 a 100mg do tecido hepático dos animais foram homogeneizada em 1mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0.02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 µL do homogenato foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4° C. A um total de 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de Ácido 5,5'-Ditiobis-(2- nitrobenzoico) (DTNB, reagente de Ellman) 0,01 M. A mistura foi então agitada por três minutos e a absorbância lida a 412 nm no espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-proteicos foram expressas em µg de GSH/g de tecido.

4.3.4. Determinação de níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina e albumina

A medição dos níveis de ALT, AST, bilirrubina e albumina no plasma foram determinadas utilizando Kits comerciais da marca LABtest® - MG/Brasil para avaliação, seguindo o protocolo do fabricante.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

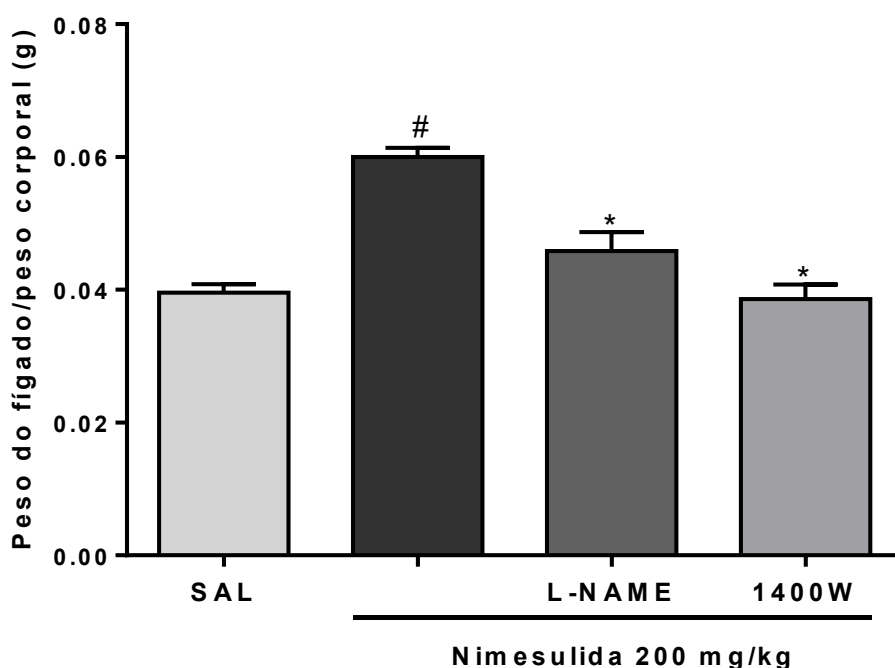
Para a análise estatística os dados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). A análise estatística será feita usando o teste one-way ANOVA, seguida do teste de Newman-keuls. A significância estatística será considerada $p < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos será utilizado o *software Prism* versão 6.0 da *GraphPad Software*

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO/PESO DO ANIMAL COM OU SEM LESÃO

Conforme apresentado na Figura 7, o grupo que recebeu nimesulida associada ao DMSO a 4% (200 mg/kg) para indução de lesão hepática apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na razão peso do fígado/peso corporal ($0,060 \pm 0,001$ g), em comparação com o grupo controle tratado com solução salina ($0,039 \pm 0,001$ g). Esse aumento sugere um processo inflamatório induzida pela nimesulida. Por outro lado, os grupos pré-tratados com os inibidores de óxido nítrico L-NAME ($0,045 \pm 0,002$ g) e 1400W ($0,038 \pm 0,002$ g) apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo nimesulida + DMSO, indicando um efeito protetor desses compostos na preservação da integridade hepática.

Figura 7 - Relação peso fígado e peso corporal.



Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL; (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

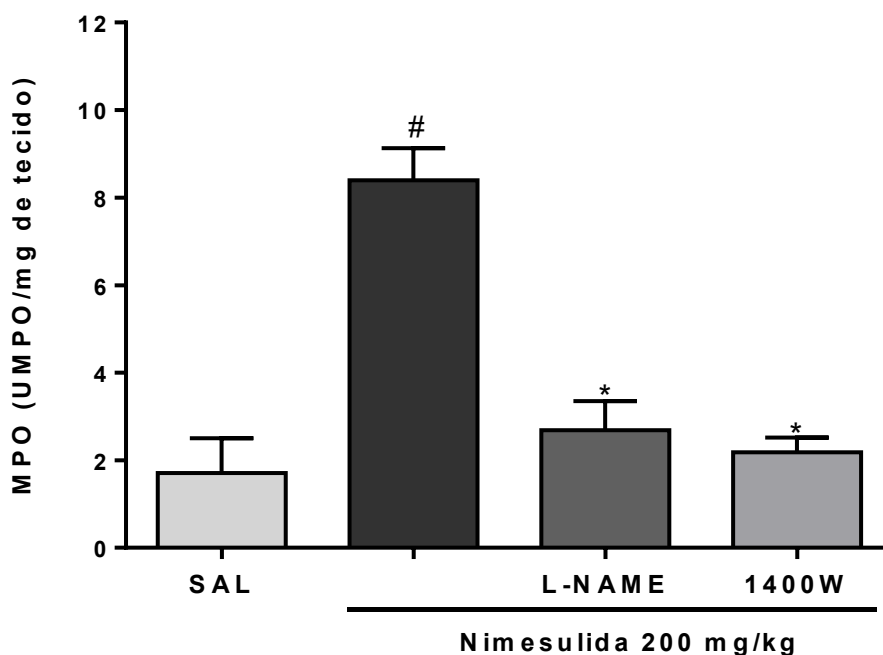
5.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE NO TECIDO HEPÁTICO

Na Figura 8, observa-se que o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% (200 mg/kg) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade

do MPO, atingindo o valor ($8,394 \pm 0,734$ UMPO/mg de tecido), em comparação com o grupo controle tratado com solução salina ($1,712 \pm 0,787$ UMPO/mg de tecido). Esse aumento expressivo sugere uma intensificação da infiltração de neutrófilos e, portanto, uma resposta inflamatória exacerbada no tecido hepático.

Por outro lado, os grupos pré-tratados com os inibidores de iNOS apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da atividade de MPO quando comparados ao grupo nimesulida + DMSO. O grupo tratado com L-NAME apresentou valores de ($2,686 \pm 0,665$ UMPO/mg de tecido), enquanto o grupo 1400W apresentou ($2,181 \pm 0,339$ UMPO/mg de tecido). Esses dados indicam um papel modulador da via do óxido nítrico na inflamação hepática induzida pela nimesulida, evidenciando um efeito protetor desses inibidores sobre a resposta inflamatória observada.

Figura 8 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de mieloperoxidase.



Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL; (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

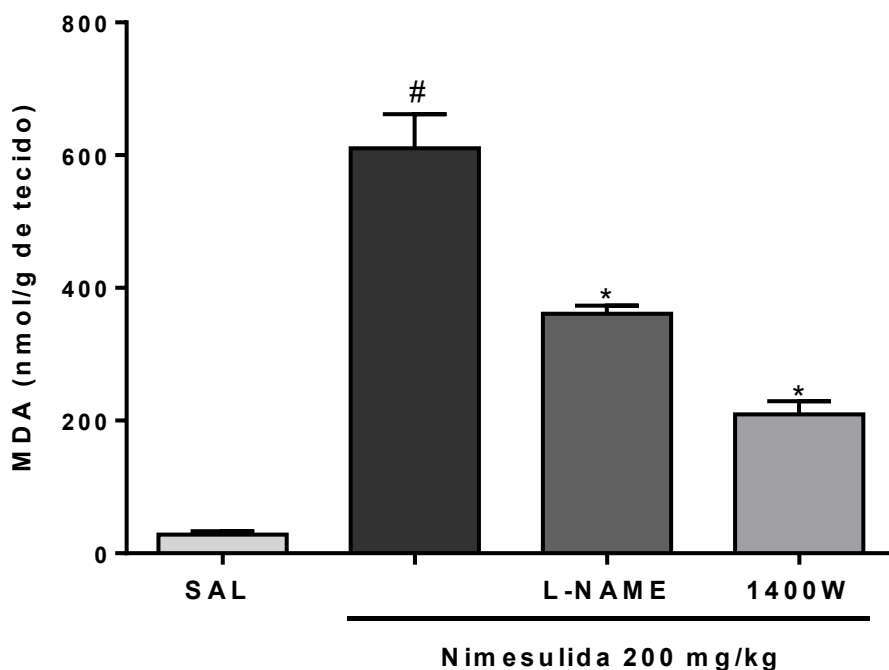
5.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE MALONALDEÍDO NO TECIDO HEPÁTICO

Na Figura 9, observa-se que o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% (200 mg/kg) para indução da lesão hepática apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de MDA ($610,13 \pm 51,61$ nmol/g de tecido), em comparação com o grupo controle tratado com solução salina ($28,12 \pm 5,35$ nmol/g de

tecido). Esse achado indica um elevado grau de peroxidação lipídica e estresse oxidativo no tecido hepático como consequência do tratamento com nimesulida.

Os grupos pré-tratados com os inibidores da síntese de óxido nítrico, L-NAME (3,0 mg/kg) e 1400W (2,5 mg/kg), apresentaram uma redução significativa nos níveis de MDA em relação ao grupo nimesulida + DMSO, com valores de $(360,90 \pm 12,50 \text{ nmol/g})$ e $(209,50 \pm 19,83 \text{ nmol/g})$ de tecido, respectivamente. Notavelmente, o grupo tratado com 1400W demonstrou níveis significativamente menores de MDA quando comparado ao grupo L-NAME, sugerindo que a inibição seletiva da iNOS (óxido nítrico sintase induzível) é mais eficaz na atenuação do estresse oxidativo hepático induzido pela nimesulida do que a inibição não seletiva de NOS promovida pelo L-NAME.

Figura 9 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de malondialdeído.



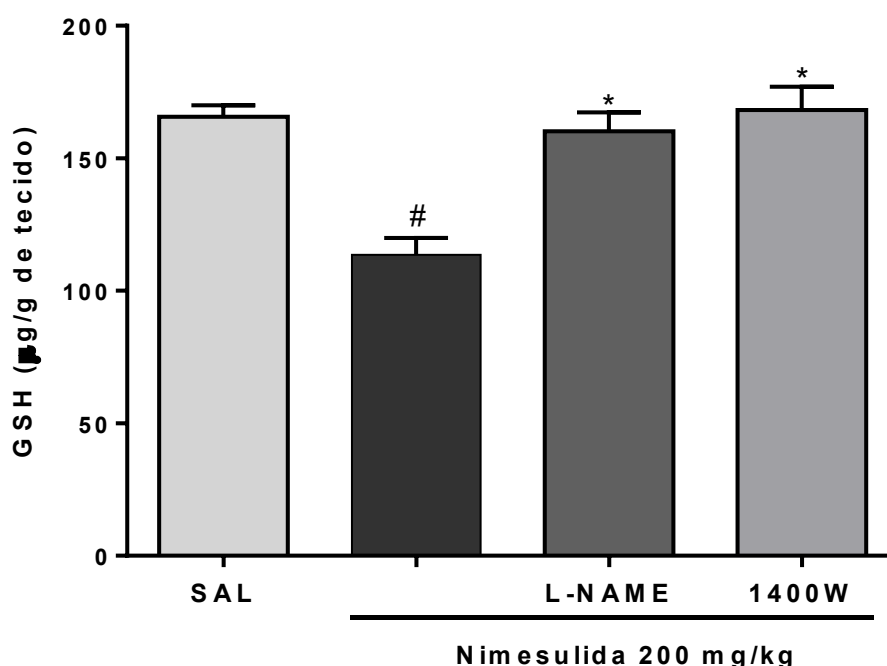
Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL. (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

5.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA NO TECIDO HEPÁTICO

Conforme mostrado na Figura 10, observa-se que o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos níveis de GSH ($113,6 \pm 6,3 \mu\text{g/g}$ de tecido), em comparação com o grupo controle tratado com solução salina ($165,6 \pm 4,3 \mu\text{g/g}$ de tecido). Esse resultado indica uma redução na capacidade antioxidante do tecido hepático em resposta à indução

da lesão. No entanto, os grupos que receberam L-NAME ($160,2 \pm 7,0 \mu\text{g/g}$ de tecido) e 1400W ($168,2 \pm 8,8 \mu\text{g/g}$ de tecido) mantiveram níveis de GSH próximos aos observados no grupo controle, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo nimesulida + DMSO. Esses achados sugerem que ambos os inibidores foram capazes de preservar a defesa antioxidante hepática, com o grupo 1400W demonstrando um efeito ainda mais próximo ao controle negativo.

Figura 10 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de glutathiona.



Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL. (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

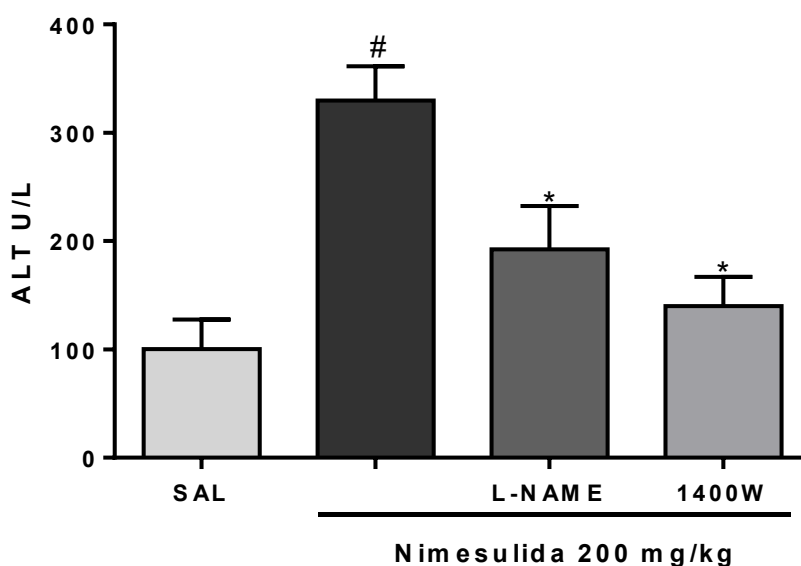
5.5 ANÁLISE NÍVEIS DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT), ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), BILIRRUBINA E ALBUMINA

5.5.1 Alanina aminotransferase (ALT)

Segundo os dados apresentados na Figura 11, observa-se que o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de alanina aminotransferase (ALT), atingindo ($329,8 \pm 31,5 \text{ U/L}$), quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina ($100,4 \pm 27,1 \text{ U/L}$). Esse aumento indica lesão hepática induzida pela nimesulida, uma vez que a elevação de ALT é um marcador clássico de dano hepatocelular. Por outro lado, os

grupos que receberam tratamento com L-NAME ($192,3 \pm 40,1$ U/L) e 1400W ($139,9 \pm 26,9$ U/L) apresentaram uma redução significativa nos níveis dessa enzima em comparação ao grupo nimesulida + DMSO, sugerindo um efeito hepatoprotetor desses inibidores, com destaque para o grupo 1400W, cujos valores se aproximaram mais do grupo controle.

Figura 11 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de alanina aminotransferase.

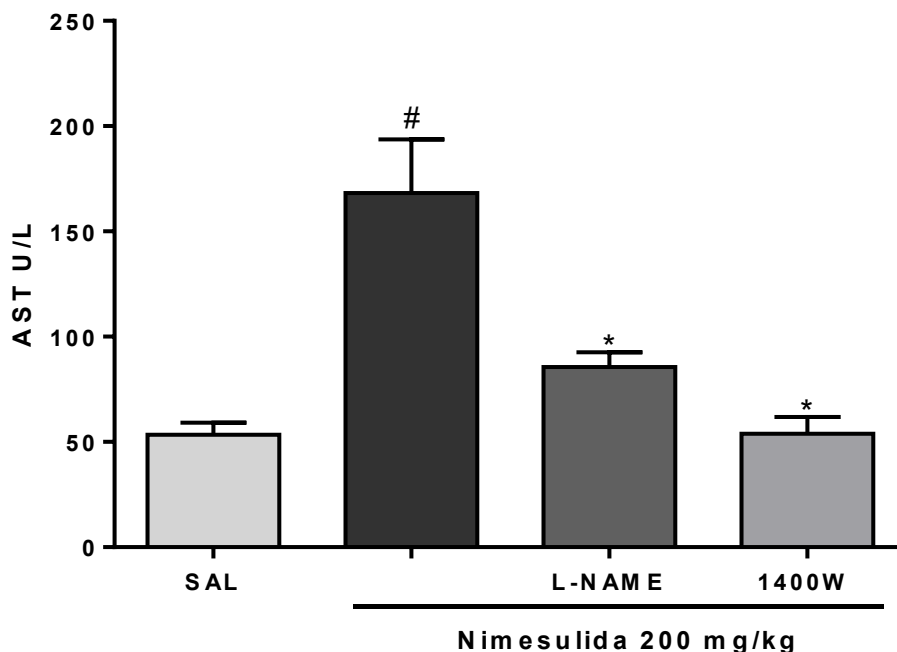


Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL; (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

5.5.2 Aspartato aminotransferase (AST)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) no grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4%, atingindo ($168,2 \pm 25,5$ U/L), em comparação ao grupo controle tratado com solução salina ($53,37 \pm 5,7$ U/L). Esse aumento reflete um quadro de lesão hepática induzida. Ainda assim, os grupos que receberam L-NAME ($85,6 \pm 7,0$ U/L) e 1400W ($53,8 \pm 8,0$ U/L) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de AST em relação ao grupo nimesulida, com o grupo 1400W demonstrando valores bastante próximos ao controle negativo, o que sugere um efeito hepatoprotetor mais eficaz.

Figura 12 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de asparto aminotransferase.

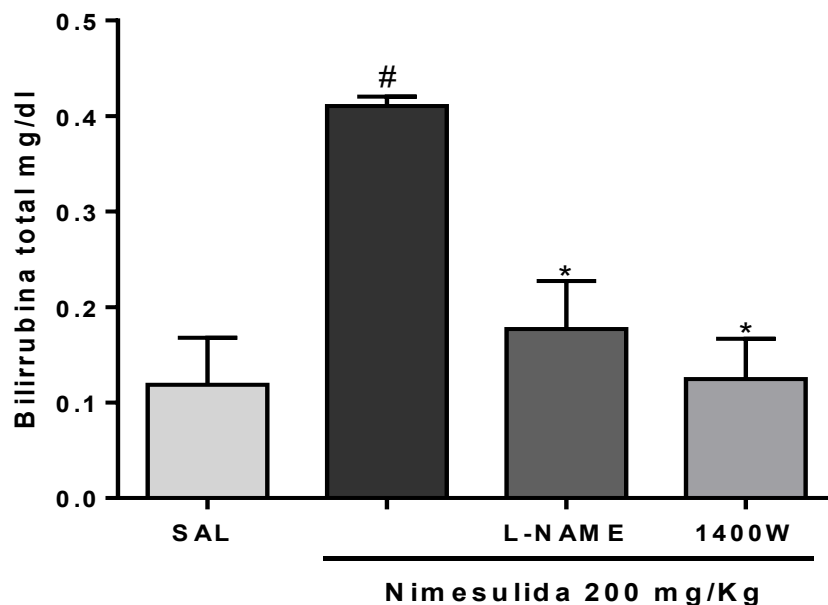


Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

5.5.3 Bilirrubina

Verifica-se na Figura 13, que o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de bilirrubina total ($0,410 \pm 0,009$ mg/dL) em comparação ao grupo controle tratado com solução salina ($0,118 \pm 0,049$ mg/dL). Por outro lado, os grupos tratados com L-NAME ($0,177 \pm 0,050$ mg/dL) e 1400W ($0,124 \pm 0,041$ mg/dL) apresentaram níveis significativamente reduzidos em relação ao grupo nimesulida + DMSO, com o grupo 1400W exibindo valores bastante próximos ao controle, sugerindo uma ação protetora contra a colestase induzida.

Figura 13 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de bilirrubina.

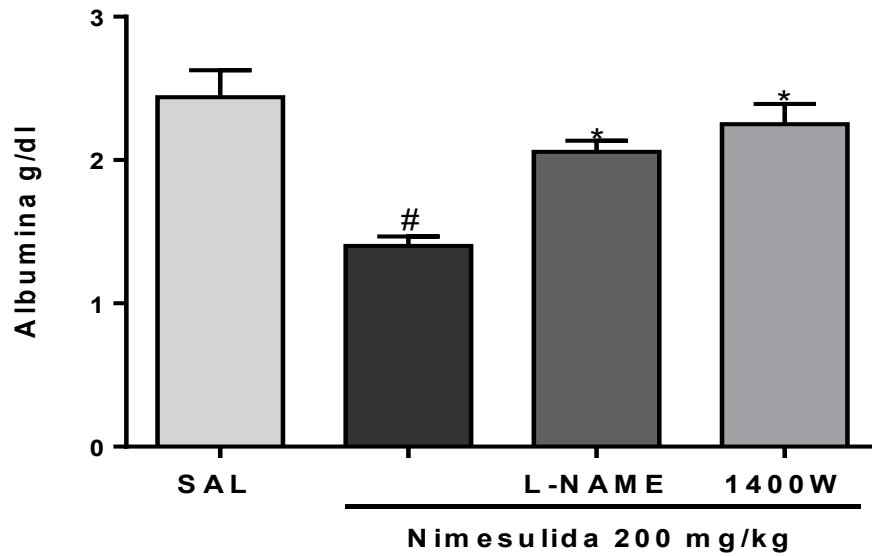


Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL. (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

5.5.4. Albumina

De acordo com os dados apresentados na Figura 14, o grupo tratado com nimesulida associada ao DMSO a 4% apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de albumina ($1,402 \pm 0,065$ g/dL) em comparação ao grupo controle tratado com solução salina ($2,440 \pm 0,185$ g/dL). Por outro lado, os grupos que receberam L-NAME ($2,057 \pm 0,078$ g/dL) e 1400W ($2,250 \pm 0,142$ g/dL) demonstraram uma preservação dos níveis de proteína total, com valores superiores ao grupo nimesulida e mais próximos ao controle, indicando um efeito protetor desses tratamentos sobre a integridade hepática.

Figura 14 - Efeito dos inibidores de iNOS nos níveis de albumina.



Os resultados são expressos como média \pm erro de 8 animais por grupo. (#) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) comparado com SAL; (*) indica um resultado significativo ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo Nimesulida. Legenda: SAL= Salina.

6. DISCUSSÃO

O fígado é um dos principais órgãos envolvidos na metabolização de substâncias endógenas e exógenas provenientes da circulação sanguínea. Nesse contexto, a biotransformação de xenobióticos, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), representa um desafio fisiológico relevante, tendo em vista que o metabolismo desses compostos pode resultar na formação de metabólitos reativos capazes de desencadear estresse oxidativo e, conseqüentemente, danos celulares e teciduais (Chaves; Ribeiro, 2022).

A nimesulida destaca-se entre os AINEs devido à sua eficácia no tratamento de processos inflamatórios e dolorosos de origem muscular e tecidual. No entanto, estudos demonstram que seu uso está associado à indução de hepatotoxicidade, decorrente da ativação de vias pró-inflamatórias e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), como superóxidos e peróxidos. Esses mecanismos levam à oxidação de lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a integridade estrutural e funcional das células hepáticas (Freitas, 2004; Chaves; Ribeiro, 2022).

Adicionalmente, pesquisas indicam que a nimesulida pode promover disfunções mitocondriais, como a perda do potencial de membrana e a liberação de cálcio, eventos que favorecem a necrose ou apoptose hepatocelular (Freitas *et al.*, 2004). Essas alterações também estão relacionadas à indução da iNOS e à produção exacerbada de NO, substância que, em concentrações elevadas, atua sinergicamente com as espécies reativas, potencializando a lesão hepática.

Diante desse contexto, o presente trabalho propõe-se a investigar o papel do óxido nítrico e da enzima óxido nítrico sintase na hepatotoxicidade induzida pela nimesulida. Para isso, foram utilizados modelos experimentais que avaliem a inflamação e a função hepática por meio de análises como: relação fígado/peso corporal, GSH, MDA, MPO, ALT, AST, bilirrubina total e albumina. Essas análises buscam ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na lesão hepática pela nimesulida, contribuindo para o conhecimento dos riscos dos AINEs e para a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

A relação peso fígado/peso corporal é um indicador morfofuncional, no qual é amplamente utilizado em trabalhos experimentais de hepatotoxicidade que indica que o fígado pode ter disposto inchaço e inflamação. Sendo assim, o aumento significativo da razão peso do fígado/peso corporal no grupo tratado com nimesulida + DMSO

sugere hepatomegalia, frequentemente relacionada à infiltração celular, edema e proliferação celular em resposta ao dano tecidual (Jaeschke *et al.*, 2012). Esse achado é consistente com estudos que demonstram que a nimesulida pode causar lesão hepática idiossincrática (Giannini *et al.*, 2005).

A análise da atividade do MPO, enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, revelou aumento expressivo em animais tratados com nimesulida. Entretanto, os grupos L-NAME e 1400W teve uma diminuição da atividade da MPO indicando que houve menor infiltração de neutrófilos no fígado desses animais, sugerindo um efeito anti-inflamatório do bloqueio da síntese de óxido nítrico especialmente pela via induzida (iNOS). Um aumento no grupo da nimesulida sugere uma resposta inflamatória exacerbada, com intenso recrutamento de neutrófilos para o tecido hepático. A infiltração neutrofílica é um marcador precoce de inflamação hepática e pode contribuir para danos adicionais através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteases (Gao e Tsukamoto, 2016). Estudos apontam que a iNOS contribui para o recrutamento de células inflamatórias e geração de radicais livres, exacerbando o dano tecidual. Assim, sua inibição pode atenuar a inflamação hepática.

A elevação dos níveis de MDA, um marcador de peroxidação lipídica, evidencia que a administração de nimesulida induz estresse oxidativo. Os grupos pré-tratados com os inibidores de óxido nítrico: L-NAME (inibidor não seletivo de iNOS) apresentaram uma redução significativa nos níveis de MDA. 1400W (inibidor seletivo da iNOS) apresentaram uma redução ainda maior nos níveis de MDA, com valores mais próximos do grupo controle do que o grupo L-NAME. No qual ambos os inibidores foram capazes de atenuar o estresse oxidativo hepático, ou seja, diminuíram a quantidade de danos oxidativos aos lipídios celulares causados pela nimesulida.

No entanto, o efeito foi mais eficaz com o 1400W, o que sugere que a iNOS desempenha um papel chave na geração de radicais livres e danos oxidativos no fígado. A peroxidação de lipídios é um mecanismo central na toxicidade hepática induzida por AINEs, especialmente quando envolvem vias de bioativação hepática que geram radicais livres (Gupta *et al.*, 2015). O grupo tratado com nimesulida + DMSO a 4% apresentou um aumento expressivo dos níveis de MDA em comparação ao grupo controle (salina), indicando que a nimesulida promoveu intenso estresse oxidativo no fígado.

A GSH reduzida é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, existente em praticamente todas as células de mamíferos. Ela exibe muitas funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos deletérios de radicais livres endógenos ou metabólitos tóxicos (Meister, 1991). Além disso, a redução nos níveis de GSH, um dos principais antioxidantes endógenos, reforça o papel do desequilíbrio redox como mecanismo de lesão.

O grupo nimesulida + DMSO apresentou uma redução significativa nos níveis de GSH em relação ao grupo controle (Salina), indicando que a nimesulida promoveu consumo acentuado dos sistemas antioxidantes celulares, levando a estresse oxidativo. Por outro lado, o grupo L-NAME apresentou níveis mais elevados, no qual, promoveu uma atenuação parcial do estresse oxidativo, protegendo parcialmente a reserva antioxidante hepática. O 1400W apresentou níveis de GSH significativamente mais altos que o grupo nimesulida e próximos ao grupo controle, sugerindo uma proteção mais eficaz contra o consumo de glutathione. A depleção de GSH compromete a capacidade do fígado de neutralizar peróxidos e xenobióticos reativos, amplificando o dano celular (Lu Sc *et al.*, 2009).

A nimesulida é conhecida por causar hepatotoxicidade, especialmente por indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Kwon *et al.*, 2019). Os níveis elevados de ALT e AST indicam necrose ou dano hepatocelular, conforme citado anteriormente. O grupo nimesulida + DMSO 4% apresentou elevação significativa dos níveis séricos de ALT e AST em comparação ao grupo controle (salina). Isso é indicativo de lesão hepatocelular, já que essas enzimas são liberadas na corrente sanguínea quando há dano à membrana dos hepatócitos. Diante disso o grupo L-NAME promoveu uma atenuação parcial da lesão hepática, provavelmente ao reduzir a produção de NO e, por consequência, diminuir a formação de peroxinitrito, um agente altamente citotóxico para as células hepáticas. Já o grupo 1400W apresentou níveis mais baixos indicando que o promoveu uma proteção significativa contra a lesão hepática induzida pela nimesulida, reforçando o papel da iNOS na mediação da citotoxicidade hepática.

A elevação da bilirrubina total reflete disfunção na excreção biliar ou lesão aos canalículos biliares, compatível com colestase induzida por fármacos (Zimmerman *et al.*, 1999). É considerado um marcador importante da função hepática e da integridade

da excreção biliar. Alterações nos níveis séricos de bilirrubina total e direta geralmente indicam dano hepatocelular, colestase ou hemólise. O grupo nimesulida + DMSO 4% apresentou aumento significativo da bilirrubina total, direta e indireta em comparação ao grupo controle indicando uma disfunção na excreção biliar, levando ao acúmulo de bilirrubina no sangue.

O grupo L-NAME Apresentou redução parcial nos níveis de bilirrubina em comparação ao grupo nimesulida, embora ainda acima dos níveis basais. Isso indica que o bloqueio de todas as formas de óxido nítrico sintase (NOS) promoveu certa atenuação da disfunção hepática, provavelmente ao reduzir a produção de NO e seus derivados tóxicos, como o peroxinitrito. O grupo 1400W (inibidor seletivo da iNOS) teve os níveis de bilirrubina próximos aos do grupo controle, significativamente menores que o grupo nimesulida. Isso indica proteção hepática efetiva, com preservação da função de conjugação e excreção de bilirrubina, reforçando o papel da iNOS como mediadora do dano hepático induzido por AINEs como a nimesulida.

A albumina é uma proteína plasmática sintetizada exclusivamente pelo fígado. Seus níveis refletem a capacidade funcional hepática, especialmente a síntese proteica. Reduções nos níveis séricos de albumina indicam dano hepático significativo, geralmente associado à inflamação crônica, necrose hepatocelular ou insuficiência hepática (Ozer *et al.*, 2008). O grupo nimesulida + DMSO 4% apresentou redução significativa nos níveis séricos de albumina em relação ao grupo controle negativo. Esse resultado indica o comprometimento da função hepática sintética, pois a hepatotoxicidade da nimesulida está bem documentada, envolvendo mecanismos de estresse oxidativo, mitocondriopatia e ativação de vias inflamatórias (como NF- κ B), que inibem a expressão de proteínas como a albumina.

O grupo L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) mostrou uma melhora parcial nos níveis de albumina em relação ao grupo nimesulida, mas ainda abaixo do controle negativo. Isso sugere que a redução global da produção de NO promoveu algum grau de proteção aos hepatócitos, embora o bloqueio da eNOS (forma constitutiva e protetora) possa ter limitado esse efeito. Enquanto isso, o Grupo 1400W (inibidor seletivo de iNOS) manteve os níveis de albumina, no qual, ficaram próximos ao grupo controle negativo, significativamente maiores que no grupo nimesulida indicando preservação da capacidade de síntese hepática.

A administração de L-NAME e 1400W reduziu significativamente os marcadores de inflamação, estresse oxidativo e disfunção hepática. Esses resultados sugerem que a via do NO, especialmente através da iNOS, está implicada na mediação da lesão hepática induzida pela nimesulida. Obteve-se uma maior eficácia do inibidor seletivo da iNOS (1400W) em comparação ao L-NAME, que bloqueia todas as isoformas de NOS, destaca a importância da iNOS como principal fonte de NO citotóxico na hepatotoxicidade induzida por nimesulida. Além disso, a seletividade evita bloquear o NO constitutivo (eNOS), que possui funções vasoprotetoras e anti-inflamatórias (Coletta *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos com a realização desse trabalho demonstram os mecanismos moleculares envolvidos na hepatotoxicidade induzida por nimesulida, destacando a importância do uso de inibidores seletivos da iNOS como agentes hepatoprotetores. Tal mecanismo pode ser observado nos resultados dispostos nesse trabalho, evidenciando que a lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos promoveu alterações morfofuncionais, inflamatórias, oxidativas e de parâmetros bioquímicos.

Foi observado que o pré-tratamento com os inibidores do óxido nítrico L-NAME (inibidor não seletivo de NOS) e 1400W (inibidor seletivo da iNOS) foram eficazes em atenuar os efeitos hepatotóxicos induzidos pela nimesulida, tais como: redução da atividade do MPO e dos níveis de MDA, bem como preservação dos níveis de GSH, redução das enzimas ALT e AST, redução dos níveis de bilirrubina, bem como a preservação dos níveis de albumina. Demonstrando um mérito significativo no estudo do efeito hepatoprotetor utilizando os inibidores seletivos da iNOS na lesão hepática induzida por nimesulida, no qual esses achados podem servir para novas abordagens terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITHAL, G. P.; DAY, C. P. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug–Induced Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 563–575, ago. 2007.
- AITHAL, G. P. et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 6, p. 806–815, 2007.
- ALMEIDA, D. J. C. de; MENDONÇA, L. A. de. Uso irracional dos AINES, a automedicação problema de saúde pública brasileira. **COGNITIONIS Scientific Journal**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. e475, 2024.
- AKBARI, S. et al. Robust, Long-Term Culture of Endoderm-Derived Hepatic Organoids for Disease Modeling. **Stem Cell Reports**, v. 13, n. 4, p. 627–641, out. 2019.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- Bañuelos, J. F., et al. Nitric oxide in liver injury and fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 16, no. 35, 2010, pp. 4369-4375.
- BASIT, H.; TAN, M. L.; WEBSTER, D. R. **Histology, Kupffer Cell**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493226/>>.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
- Bessone F, Fay F, Vorobioff J, Passamonti ME, Godoy A, Tanno H. Hepatotoxicidade da nimesulida: Evidências de seis casos. **Hepatologia**. 1997;26:483A.
- BESSONE, F. et al. Drug-Induced Liver Injury in Latin AmericaBekmBCa: 10-year experience of the Latin American DILI (LATINDILI) Network Drug-induced liver injury in Latin America. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 1 jul. 2024.
- BERNARDES, S. S. et al. Insuficiência hepática aguda fatal induzida por nimesulida em uma mulher idosa com adenocarcinoma biliar metastático. Um relato de caso. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, p. 371–376, 19 set. 2014.
- BERNAREGGI, A. Clinical Pharmacokinetics of Nimesulide. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 4, p. 247–274, 1998.
- BITENCOURT, LS.; ALEXANDRE ALVES, L. Perfil da dispensação de anti-inflamatórios não esteroidais em uma farmácia do interior da Bahia. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 10, n. 16, p. 2021.
- BJÖRNSSON, E. Drug-induced liver injury: Recent advances in diagnosis and risk assessment. **LiverTox Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2023.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60 n.3, p. 618-622, 1982.
- BOELSTERLI, U. A. Mechanisms of NSAID-Induced Hepatotoxicity. **Drug Safety**, v. 25, n. 9, p. 633–648, 2002.

BOELSTERLI, U. A.; LIM, P. L.; LEE, K. K. Mitochondrial dysfunction and toxicological mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 455, p. 116253, 2022.

CASTRO, Thamiris da Silva Correia; ANDRADE, Leonardo Guimarães de. USO INDISCRIMINADO DE NIMESULIDA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 3283–3293, 2023.

Chalasani NP, Maddur H, Russo MW, Wong RJ, Reddy KR. Diretriz clínica da ACG: diagnóstico e tratamento de lesão hepática idiossincrática induzida por medicamentos. **Am J Gastroenterol**. 2021;116:878–98.

CHALASANI, N. P. et al. ACG Clinical Guideline: Diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *American Journal of Gastroenterology*, v. 116, n. 5, p. 878–898, 2021.

CHEN, C. B. et al. Overview of Albumin Physiology and its Role in Pediatric Diseases. **Current Gastroenterology Reports**, v. 23, n. 8, 2 jul. 2021.

Choi BM, Pae HO, Jeong YR, et al. Overproduction of NO and depletion of GSH induced by peroxynitrite in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2002;277(3):271–278.

Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012;109(23):9161–9166.

COSTA, I. A. F.; OLIVEIRA, F. S. Fármacos hepatotóxico e hepatoprotetores: uma revisão de literatura. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 1, 2021.

CORSO, C. O. et al. BLOQUEIO DO ÓXIDO NÍTRICO COM L-NAME COMPROMETE A MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA DURANTE ENDOTOXINEMIA. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 87–90, 1 abr. 1999.

CULLEN, J. M.; STALKER, M. J. Liver and Biliary System. **Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2**, v. 2, p. 258-352.e1, 2016.Akbar

DE ANDRADE AOYAMA, Elisângela; DELMÃO, Fabricio Mendes. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDES (AINES) MAIS VENDIDOS EM FARMÁCIAS COMUNITÁRIAS-REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde-ReBIS**, v. 3, n. 2, 2021.

DELEVE, L. D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. **Hepatology**, v. 61, n. 5, p. 1740–1746, 23 mar. 2015.

DIAS JÚNIOR, G. J.; LEMOS, S. I. A.; BRITO, T. V. et al. Macromolecule extracted from *Gracilaria caudata* reduces inflammation and restores hepatic function in nimesulide-induced hepatic damage. **Journal of Applied Phycology**, 32, 1511–1520, 2020.

DUTRA, N. L. S. et al. Sulfated polysaccharide extracted from seaweed *Gracilaria caudata* attenuates acetic acid-induced ulcerative colitis. **Food Hydrocolloids**, v. 111, p. 106221, 2021.

DOMINGUES, Fagner Simões et al. Riscos do uso indiscriminado do anti-inflamatório nimesulida. **XIV Jornada Científica Faculdades Integradas de Bauru–FIB**, 2019.

FANG, L. et al. Role of nitric oxide in liver ischemia-reperfusion injury: mechanisms and therapeutic strategies. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 9, p. 848–866, 2021.

FREITAS, Clayton da Silva. Estudo dos efeitos da hidroxi-nimesulida em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. 2004. 103 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

FONSECA, Gustavo Soares Gomes Barros et al. Cirrose hepática e suas principais etiologias: **Revisão da literatura. E-Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. e8332249-e8332249, 2022.

Gao B, Tsukamoto H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? **Gastroenterology**. 2016;150(8):1704–1709.

Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**. 2005;172(3):367-79.

Gupta A, et al. Mechanisms of nimesulide-induced hepatotoxicity: an update. **Eur J Pharmacol**. 2015;750:1–7.

HERGET, T. et al. The Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate (MARCKS) is Sequentially Phosphorylated by Conventional, Novel and Atypical Isoforms of Protein Kinase C. **European Journal of Biochemistry**, v. 233, n. 2, p. 448–457, 1 out. 1995.

HOOFNAGLE, J. H. et al. Drug-Induced Liver Injury: Role of Host and Environmental Factors. *Hepatology*, v. 74, n. 1, p. 275–291, 2021.

ILUZ-FREUNDLICH, D. et al. The relative expression of hepatocellular and cholestatic liver enzymes in adult patients with liver disease. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 204–208, mar. 2020.

IWAKIRI, Y.; KIM, M. Y. Óxido nítrico em doenças hepáticas. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 8, p. 524–536, ago. 2015.

Jaeschke H, Ramachandran A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. **J Hepatol**. 2012;55(1):227–228.

JUNIOR, Cleber Henrique da Silva; FURST, Cassio Fedosi. O USO DA NIMESULIDA E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS. **Revista Científica Unilago**, [S. l.], v. 1, n. 1, 2022.

KAMM, D. R.; MCCOMMIS, K. S. Células estreladas hepáticas em fisiologia e patologia. **The Journal of Physiology**, v. 600, n. 8, p. 1825–1837, 30 mar. 2022.

KEERL, C.; BERNISMEIER, C. [Elevated liver function tests - as incidental finding in general practice]. **Therapeutische Umschau. Revue Therapeutique**, v. 77, n. 8, p. 371–378, 2020.

KIM, J. H. et al. Nitric oxide in liver diseases: balancing hepatoprotection and cytotoxicity. **Journal of Hepatic Research**, v. 35, n. 4, p. 215–230, 2024.

Kullak-Ublick, G. A., Andrade, R. J., Merz, M., End, P., Benesic, A., Gerbes, A. L., & Galle, P. R. (2017). Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*, 66(6), 1154–1164.

KWON, J. et al. Nimesulide-induced hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v. 14, n. 1, p. e0209264, 2019.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. **Mol Aspects Med.** 2009;30(1–2):42–59.

MarquesA. A.; PinheiroA. O.; VianaE. A. C.; SoaresP. V. C.; MarquesM. S. Impactos do uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) na saúde cardiovascular: revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 11, p. e11189, 1 nov. 2022.

Mederacke, I., Dapito, D., Affò, S. et al. Isolamento de alto rendimento e alta pureza de células estreladas hepáticas de fígados normais e fibróticos de camundongos. **Nat Protoc** 10 ,305–315 (2015).

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 51, n. 2, p. 155-194, 1991.

MEUNIER, L.; LARREY, D. Recent Advances in Hepatotoxicity of Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs. **Annals of Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 187–191, mar. 2018.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86 n.1, p. 271-278, 1978.

NURBAEVA, M. K. et al. Evidence That Calcium Entry Into Calcium-Transporting Dental Enamel Cells Is Regulated by Cholecystokinin, Acetylcholine and ATP. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2 jul. 2018.

Ozer J, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. 2008;245(3):194–205.

PAUTA, M. et al. Impaired liver regeneration in Ldlr–/– mice is associated with an altered hepatic profile of cytokines, growth factors, and lipids. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 731–737, out. 2013.

PEREIRA, C. M. C.; DIAS JÚNIOR, G. J.; LIMA, J. V.N. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma participates in nimesulide-induced hepatic damage. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, V. 73, 496–504, 2021.

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, 28 nov. 2006.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165–168, 2009.

SANTOS, R. A. et al. Óxido nítrico e a progressão da doença hepática: implicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Hepatologia Experimental**, v. 10, n. 2, p. 99–110, 2023.

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

SHAH, Vijay et al. As células endoteliais sinusoidais do fígado são responsáveis pela modulação da resistência por óxido nítrico nos sinusoides hepáticos. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2923-2930, 1997

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, dez. 2007.

SILVA, A. de J.; SILVA, ML.; TEIXEIRA, HS. Uso de anti-inflamatórios não esteroidais sendo utilizados indiscriminadamente por moradores de um município do interior da Bahia – Brasil. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 11, n. 16, p. e475111638441, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38441.

SI-TAYEB, K.; LEMAIGRE, F. P.; DUNCAN, S. A. Organogenesis and Development of the Liver. **Developmental Cell**, v. 18, n. 2, p. 175–189, fev. 2010.

SINGH, B. K. et al. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.

SUSA, S. T.; PREUSS, C. V.; HUSSAIN, A. **Metabolismo de Medicamentos**. StatPearls, StatPearls Publishing, PMID: 28723052, 17 August 2023.

TESCHKE, R. Idiosyncratic DILI: Analysis of 46,266 Cases Assessed for Causality by RUCAM and Published From 2014 to Early 2019. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 23 jul. 2019.

Teschke, R., Wolff, A., Frenzel, C., Schulze, J., & Eickhoff, A. (2013). Herbal hepatotoxicity: a critical review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 630-636.

TIWARI, V. et al. Insights into medication-induced liver injury: Understanding and management strategies. **Toxicology Reports**, v. 14, p. 101976, 1 mar. 2025.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. O fígado. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, nov. 2017.

TRIVIÑO, T.; ABIB, S. DE C. V. Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 407–414, out. 2003.

TUJIOS, S. R.; LEE, W. M. Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs: Challenges in diagnosis and therapy. **Liver International**, v. 38, n. 1, p. 6–14, 18 set. 2017.

VILLANUEVA-PAZ, M. et al. Oxidative Stress in Drug-Induced Liver Injury (DILI): From Mechanisms to Biomarkers for Use in Clinical Practice. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, 5 mar. 2021.

Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver. 2nd ed. **Lippincott Williams & Wilkins**; 1999.

ANEXO I – Carta de Aprovação do CEUA – UFDPAr.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO DELTA
DO PARNAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS

Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Av. São Sebastião, 2819, Parnaíba, Piauí, Brasil; CEP: 64202-020.
E-mail: ceua.ufdpar@gmail.com

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do papel do óxido nítrico na lesão hepática induzida por nimesulida em camundongos**”, registrada sob protocolo Nº **010/2021**, de a responsabilidade da **Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa** do **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia** da **Universidade Federal do Delta do Parnaíba/UFDPAr**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica e/ou Ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (CEUA/UFDPAr), em Reunião na presente data **10/04/2024**.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Junho/ 2024 a dezembro/ 2026	
Espécie/Linhagem/raça:	Mus musculus / Camundongos Isogênico / Balb/c	
Nº de Animais:	186	
Peso/ Idade:	20-30g	
Sexo:	Machos	
Origem:	Biotério da Universidade Federal do Piauí	

Parnaíba, 10 de Abril de 2024.

Documento assinado digitalmente
ROSA HELENA REBOUÇAS
Data: 03/05/2024 15:56:33-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Pro^{fa}. Dr^a. Rosa Helena Rebouças
Coordenador da CEUA/UFDPAr