



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

**RENATO MAZON LIMA VERDE LEAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA N-ACETILCISTEÍNA NO MODELO DE  
ESTEATOHEPATITE INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA-CE**

**2014**

**RENATO MAZON LIMA VERDE LEAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA N-ACETILCISTEÍNA NO MODELO DE  
ESTEATOHEPATITE INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Comportamento biocelular em neoplasias

Orientador (a):

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

**FORTALEZA-CE**

**2014**

Dedico este trabalho à minha esposa Sara pelo incondicional apoio em todos os momentos da minha vida, e aos meus filhos Tiago e Murilo, por me inspirarem a querer tornar-me uma pessoa melhor.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pelo acolhimento no LAFICA e por sua exímia competência que me proporcionaram o desenvolvimento e realização dessa dissertação;

À minha co-orientadora Karoline Sabóia Aragão pela parceria e preciosa ajuda, indispensáveis em todas as fases do projeto.

Ao Prof. Paulo Roberto, pela disponibilidade e importante contribuição nas avaliações histopatológicas desse trabalho.

Ao Prof. Roberto César Pereira Lima Júnior pelas dicas e palavras de conforto e otimismo dispensadas a mim.

À colega Venúcia Magalhães pela colaboração fundamental na realização e organização dos experimentos.

Ao aluno de iniciação científica Diego Holanda pelo seu apoio e iniciativa que se somaram nesta pesquisa.

Aos meus pais Wanda e Reginaldo, pelo amor, exemplo e incentivo nas decisões da minha vida.

Aos meus irmãos, Cláudio e Alice, pela confiança que sempre depositaram em mim na realização dos meus projetos profissionais.

Às técnicas Socorro França (Morfologia) e Vandinha França Pinheiro (LAFICA) pela simpatia e presteza nos momentos de solicitações.

Às secretárias Magda e Luciene pelas orientações e apoio junto à pós-graduação de cirurgia.

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

**Introdução:** O câncer colorretal (CCR) é um dos mais comuns tumores malignos atualmente. Na evolução natural da doença, o fígado é o principal sítio de metástases. Regimes à base de irinotecano (IRI) têm sido utilizados no tratamento do CCR metastático, permitindo muitas vezes a conversão de metástases hepáticas irrissecáveis em ressecáveis. Contudo, tais regimes estão associados ao surgimento de esteatohepatite não alcoólica (NASH), muitas vezes limitante do tratamento. A patogênese da NASH por IRI ainda é desconhecida. Recentemente, nosso grupo desenvolveu um modelo inédito de NASH induzida por IRI. N-acetilcisteína (NAC) é um derivado acetilado da L-cisteína que apresenta na sua estrutura química o grupo sulfidril(-SH), o qual pode reagir e neutralizar radicais livres, além de restabelecer os protetores celulares do estresse oxidativo, como a glutathione. NAC é utilizada na prática clínica para o tratamento da lesão hepática induzida por acetaminofen. **Objetivos:** Avaliar o efeito protetor da NAC sobre a NASH induzida por IRI. **Métodos:** Camundongos Swiss machos (25g, n=8) receberam salina (5 mL/Kg, i.p), NAC (1000 mg/Kg, s.c), IRI (50 mg/Kg, i.p) ou NAC (10, 100 ou 1000mg/Kg)+IRI 3x/semana/7semanas. Avaliou-se a variação ponderal e a sobrevida. Ao final do tratamento, o sangue foi coletado para dosagem sérica de ALT e AST (U/L) e realizou-se o sacrifício dos animais para coleta do fígado e pesagem (mg/30g de animal), análise histopatológica de acordo com os Critérios de Kleiner para NASH (inflamação lobular[0-3],esteatose[0-3] e vacuolização[0-3]), mensuração da atividade da citocina Interleucina-1 (IL-1 $\beta$ , pg/mL), e ensaio imunistoquímico (IMQ) para IL-1 $\beta$ , Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS) e nitrotirosina. Na análise estatística utilizou-se ANOVA/Student Newman Keul ou Kruskal Wallis/Dunn. Um nível de significância menor que 5% foi aceito (p<0,05). (CEPA 21/12). **Resultados:** O IRI induziu uma significativa (p<0,05) redução de sobrevida (44%), um marcante aumento das concentrações séricas de ALT (48,99 $\pm$ 13,4), AST (90,55 $\pm$ 19,7), da citocina IL1- $\beta$  (288,5 $\pm$ 35,86), do peso do fígado (1814 $\pm$ 159,3) e aumento dos escores de Kleiner [5,5 (4 - 7)] vs o grupo salina (sobrevida: 100%; ALT: 17,31 $\pm$ 5,2; AST: 44,58 $\pm$ 5,4; citocina IL1- $\beta$  (104 $\pm$ 36,9); peso hepático: 1425 $\pm$ 39,5; Kleiner: 0(0-0). Tais alterações, foram prevenidas (p<0,05) pelo tratamento com NAC. NAC aumentou a sobrevida de animais injetados com IRI (10 mg/kg: 90%; 100 mg/kg: 80%). NAC 10 mg/Kg preveniu a elevação das enzimas

ALT:  $26,95 \pm 7$  e AST:  $56,42 \pm 4,8$ ; NAC (10mg/Kg e 1000mg/Kg) inibiram o aumento da IL-1 em ( $152 \pm 23,92$  e  $149 \pm 17,21$ , respectivamente); NAC (10mg/Kg e 100mg/Kg) reverteram o aumento do peso hepático ( $1375 \pm 68,2$  e  $1467 \pm 28,6$ , respectivamente) e NAC 1000mg/Kg reverteu o aumento dos escores de inflamação lobular (1[1-3]) vs o grupo IRI. Na IMQ do grupo IRI, observou-se um significativo aumento da imunomarcção para IL-1(3[2-3]), iNOS(3[3-3]) vs o grupo salina (IL-1: 2[0-2]; iNOS: 1[1-3]); NAC na dose de 10mg/Kg previne o aumento da imunomarcção (IL-1: 1,5[0-3]; iNOS: 2[1-3]) vs o grupo IRI. **Conclusão:** NAC na dose de 10mg/kg previne as alterações dos parâmetros clínicos, histopatológicos e bioquímicos no modelo de NASH induzida por IRI. Estudos adicionais estão sendo realizados para identificar os mecanismos envolvidos nessa proteção.

**“Palavras-chave”:** esteatohepatite, irinotecano, n-acetilcisteína, citocinas, óxido nítrico

## ABSTRACT

**Background:** Colorectal cancer (CRC) is currently one of the most common cancers worldwide. The liver is the main site of metastasis in advanced CRC. Regimens based on irinotecan (IRI) have been used for the treatment of metastatic CRC, usually resulting in the conversion of unresectable liver metastases into resectable metastases. However, these regimens are associated with the occurrence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which often limits the treatment. The pathogenesis of NASH caused by IRI remains unclear. Recently, our group developed a novel IRI-induced mouse NASH model. N-acetylcysteine (NAC) is an acetylated derivative of L-cysteine that carries a thiol (-SH) group that reacts and neutralizes free radicals, as well as restores cellular antioxidants such as glutathione. NAC is used in clinical practice for the treatment of liver damage induced by paracetamol. **Objectives:** To assess the protective effect of NAC on IRI-induced NASH. **Methods:** Male Swiss mice (25 g, n = 8) received saline (5 mL/kg, i.p), NAC (1,000 mg/kg, s.c), IRI (50 mg/kg, i.p), or NAC (10, 100, or 1000 mg/kg) + IRI 3 x/week for 7 weeks. Weight variation and survival were assessed. At the end of the treatment, blood was collected for the determination of serum levels of ALT and AST (U/L), and the animals were sacrificed for liver collection and weighing (mg/30 g of animal). Histopathological analysis was performed according to Kleiner's criteria for NASH (lobular inflammation [0–3], steatosis [0–3], and vacuolization [0–3]), as well as measurement of IL-1 $\beta$  production (pg/mL) and immunohistochemical analysis (IHC) of IL-1 $\beta$ , iNOS and nitrotyrosine. For statistical analysis, ANOVA/student's Newman Keul test or the Kruskal Wallis/Dunn test was used. The level of significance was set at  $P < 0.05$ . (CEPA 1/12). **Results:** IRI induced a significant ( $P < 0.05$ ) reduction in survival (44%), a marked increase in the serum concentrations of ALT ( $48.99 \pm 13.4$ ), AST ( $90.55 \pm 19.7$ ), cytokine IL1- $\beta$  ( $288.5 \pm 35.86$ ), liver weight ( $1,814 \pm 159.3$ ), and an increase in Kleiner scores [5.5 (4–7)] vs. the saline group (survival: 100%; ALT:  $17.31 \pm 5.2$ ; AST:  $44.58 \pm 5.4$ ; cytokine IL1- $\beta$  ( $104 \pm 36.9$ ); liver weight:  $1,425 \pm 39.5$ ; Kleiner: 0 (0–0)). These changes were prevented ( $P < 0.05$ ) by treatment with NAC. NAC increased the survival of animals injected with IRI (10 mg/kg: 90%; 100 mg/kg: 80%). NAC 10 mg/kg prevented the increase of the enzymes ALT:  $26.95 \pm 7$  and AST:  $56.42 \pm 4.8$ ; NAC (10 mg/kg and 1,000 mg/kg) inhibited the increase in the levels of cytokine IL-1 ( $152 \pm 23.92$  and  $149 \pm 17.21$ , respectively); NAC (10 mg/kg and 100

mg/kg) reversed the increase in liver weight ( $1,375 \pm 68.2$  and  $1,467 \pm 28.6$ , respectively), and NAC 10 mg/kg reversed the increase in Kleiner scores: 2 [1–4]) vs. the IRI group. The IHC of the IRI group showed a significant increase in immunostaining for IL-1 (3[1–3]), iNOS (3[3–3]) compared to the saline group (IL-1: 0[0–1]; iNOS: 1[1–2]); and NAC at a dose of 10 mg/kg prevented the increase in immunostaining (IL-1: 1[1–1]; iNOS: 2[1–2]) vs. the IRI group. **Conclusion:** NAC at a dose of 10 mg/kg prevented changes in the clinical, histopathological, biochemical, and inflammatory parameters of the IRI-induced NASH model. Current studies are focused on identifying the mechanisms involved in this protective effect.

**“Key words”:** irinotecan, steatohepatitis, N-acetylcysteine, cytokines, nitric oxide

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1. Estrutura da N-acetilcisteína	21
Figura 2. Estrutura do irinotecano	23
Figura 3. Metabolismo do Irinotecano	24
Figura 4. Modelo dos “dois eventos” de esteatohepatite	29
Figura 5. Esquema de tratamento	41
Figura 6. Curva de sobrevivência	47
Figura 7. Peso corporal	49
Figura 8. Concentrações plasmáticas de ALT	51
Figura 9. Concentrações plasmáticas de AST	52
Figura 10. Peso hepático líquido	53
Figura 11. Contagem de leucócitos totais no sangue	54
Figura 12. Dosagem de malonaldeído no tecido hepático	55
Figura 13. Dosagem de IL-1 no tecido hepático	56
Figura 14. Dosagem de TNF- $\alpha$ no tecido hepático	57
Figura 15. Dosagem de lipídios totais no tecido hepático	58
Figura 16. Aspecto macroscópico do fígado	59
Figura 17. Fotomicrografias do fígado	61
Figura 18. Imunoexpressão de IL-1 $\beta$ no fígado	65
Figura 19. Imunoexpressão de iNOS no fígado	66
Figura 20. Imunoexpressão de Nitrotirosina no fígado	67

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Escores de atividade de NASH	62
Tabela 2. Escores imunoistoquímicos	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Adenosina monofosfato quinase
APC	7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]- carboniloxicamptotecina
AP-1	Proteína 1 ativada
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CCR	Câncer colorretal
CE	Carboxiesterase
CPT-11	Irinotecano
CREBP	Proteína de ligação do elemento de resposta ao carboidrato
CYP1A1/2	Citocromo P450 1A1/2
CYP3A4:	Citocromo P450 3A4
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GSH	Glutathiona reduzida
HNE	Hidroxinonenal
HOMA-IR	Avaliação do modelo de homeostase-resistência à insulina
HSC	Células esteladas do fígado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-1R1	Receptor 1 de interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
INCA	Instituto Nacional do Câncer
i.p.	Intraperitoneal

IRAK	Cinase associada ao receptor de IL-1
IRI	Irinotecano
LBP	Proteína de ligação do LPS
LDH	Desidrogenase láctica
LPS	Lipopolissacarídeo
LOOH	Hidroperóxido reativo de ácido graxo
M	Molar
MDA	Malonaldeído
MDC	Células dendríticas mielóides
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOM	Membrana externa da mitocôndria
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MyD-88	Proteína de resposta primária 88 de diferenciação mielóide
NAC	N-acetilcisteína
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NAS	Escore de atividade de NASH
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NASH CRN	Rede de pesquisa clínica cooperativa multicêntrica para NASH
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NIDDK	National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases
NIH	National Institute of Health
NO	Óxido nítrico
NPC	7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina
OH-	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
O <sub>2</sub> -	Superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCB 126	Polifenol policlorado 126
QUICKI	Índice de checagem da sensibilidade quantitativa de insulina

RC	Cadeia respiratória
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RSNO	S-nitrosotiol
s.c.	Subcutânea
SNAC	S-nitroso-N-acetilcisteína
SN-38	Metabólito ativo do irinotecano
SN-38G	Glicuronídios de SN-38
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1c
TAK 1	Proteína quinase ativada do fator de crescimento transformado beta
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLR-4	Receptor Toll like 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptores de TNF
UGT1A1	polipeptídio A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. Câncer colorretal</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2. N-acetilcisteína</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3. Irinotecano</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4. Quimioterapia pré-operatória</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5. NASH e NAFLD</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6. Mediadores pró-inflamatórios</b> .....	<b>30</b>
<b>1.6.1. Interleucina-1</b> .....	<b>30</b>
<b>1.6.2. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	<b>31</b>
<b>1.6.3. Óxido nítrico</b> .....	<b>32</b>
<b>1.7. Peroxinitrito e 3-nitrotirosina</b> .....	<b>33</b>
<b>1.8. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1. Material utilizado</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.1. Soluções, reagentes e fármacos</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.2. Equipamentos</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2. Animais</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3. Indução da esteatohepatite e tratamento com NAC</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3.1. Dosagens das concentrações plasmáticas de alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST)</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.2. Avaliação histopatológica do fígado</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.3. Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.4. Determinação de lipídios no tecido hepático</b> .....	<b>43</b>

3.3.5. Reação Imunoistoquímica para iNOS, IL-1 $\beta$ e 3-Nitrotirosina .....	43
3.3.6. Determinação de IL-1 e TNF- $\alpha$ no tecido hepático .....	44
3.4. <i>Análise estatística</i> .....	45
4. RESULTADOS .....	46
4.1. <i>Curva de sobrevida</i> .....	46
4.2. <i>Curva de peso corporal</i> .....	48
4.3. <i>Dosagem das concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ALT e AST)</i> .....	50
4.4. <i>Peso úmido do fígado</i> .....	53
4.5. <i>Contagem de leucócitos totais no sangue</i> .....	54
4.6. <i>Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)</i> .....	55
4.7. <i>Dosagem de IL-1 no tecido hepático</i> .....	56
4.8. <i>Dosagem de TNF-<math>\alpha</math> no tecido hepático</i> .....	57
4.9. <i>Dosagem de lipídios totais no fígado</i> .....	58
4.10. <i>Avaliação macroscópica do fígado</i> .....	59
4.11. <i>Avaliação histopatológica do fígado</i> .....	60
4.12. <i>Escores de Kleiner</i> .....	62
4.13. <i>Reação imunoistoquímica para IL-1, iNOS e Nitrotirosina.</i> .....	63
5. DISCUSSÃO .....	68
6. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência das neoplasias vem aumentando ao longo dos anos, e juntamente com ela, vem se intensificando a corrida pela melhoria do tratamento e das taxas de cura, na tentativa de acompanhar a explosão do aparecimento de novos casos.

Muito tem se progredido nas inúmeras terapêuticas desta doença, com o refinamento das técnicas cirúrgicas, novas modalidades de radioterapia, desenvolvimento de terapias alvo e combinações de novos e antigos quimioterápicos, com resultados estimulantes. Entretanto um dos fatores limitantes do tratamento, em especial com antineoplásicos, é seu conjunto de efeitos colaterais, incluindo diarreia, vômitos, toxicidade renal, neurológica, cardíaca e hepática, entre vários outros, muitas vezes levando à redução da dose do quimioterápico, suspensão temporária e até mesmo definitiva do tratamento.

Com o objetivo de obter resposta terapêutica máxima dessas drogas e diminuir seus efeitos colaterais, muitos estudos tem procurado compreender melhor os seus mecanismos farmacológicos de toxicidade, através do desenvolvimento de modelos experimentais na tentativa de elaboração de meios de redução ou mesmo inibição desses efeitos adversos. Algumas toxicidades são bem conhecidas, assim como a sua forma de proteção. No entanto alguns efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade por alguns quimioterápicos, ainda permanecem obscuros à procura do entendimento.

### 1.1. Câncer colorretal

As estatísticas mostram que, em 2013, o câncer colorretal (CCR) foi responsável por 142.820 novos casos e 50.830 óbitos nos Estados Unidos, tornando-se o quarto tumor mais incidente entre as neoplasias neste país (NCCN 2014). No Brasil, estima-se que, em 2014, teremos cerca de 33.000 novos casos de CCR, ocupando o segundo lugar em incidência entre as mulheres e o terceiro lugar entre os homens (INCA, 2014). Infelizmente metade dos casos será diagnosticada em estádios avançados da doença onde a poliquimioterapia, à base de 5-fluorouracil

(5-FU), irinotecano (CPT-11) e oxaliplatina, associado ou não à terapia molecular será de extrema importância na proposta terapêutica (CHEN et al., 2011).

Quase 50% dos pacientes com CCR irão eventualmente desenvolver metástases hepáticas durante o curso natural da doença e 25% desses pacientes já abrem o quadro com doença metastática no diagnóstico da doença. Um terço dos pacientes com metástases hepáticas possuem um sítio metastático isolado limitado ao fígado, e a sobrevida dessa população específica é diretamente relacionada à progressão das lesões hepáticas (WANG e LI, 2012).

O objetivo maior do tratamento para pacientes com metástases hepáticas limitadas é remover toda a doença para uma melhor sobrevida ou mesmo cura. Historicamente apenas uma minoria dos pacientes (10-15%) é candidata a ressecção cirúrgica, com sobrevida global em 5 anos variando de 25 a 40% (FONG et al, 1997).

Embora algum tempo atrás a doença colorretal metastática fosse considerada incurável, na atualidade, com a combinação de quimioterapia sistêmica e terapia alvo, associada à possibilidade de ressecção completa das lesões, estudos relatam taxas de sobrevida global em cinco anos semelhantes à EC III tratado (VAN CUTSEM et al., 2009; HURWITZ et al, 2004).

A abordagem terapêutica multimodal para pacientes com doença metastática tem resultado em mais pacientes candidatos à ressecção cirúrgica. E melhores resultados têm sido alcançados, pois a taxa de ressecção aumentou para 20-30%, a taxa de sobrevida em 5 anos aumentou para 50% e 25% dos pacientes tem sobrevivido não menos que 10 anos (TOMLINSON et al, 2007).

Atualmente indica-se quimioterapia sistêmica para o CCR como tratamento adjuvante, paliativo, neoadjuvante em combinação com radioterapia para tumores de reto médio e inferior, “neoadjuvante” para ressecção de metástases e de conversão naqueles casos em que inicialmente a lesão metastática apresenta-se irressecável e com a quimioterapia tenta-se convertê-la em ressecável (NCCN 2014).

A poliquimioterapia contendo irinotecano e/ou oxaliplatina tem mostrado resultados significativos nessa taxa de conversão. No entanto, como efeito adverso desses quimioterápicos no fígado, podemos citar a congestão sinusoidal e a esteatohepatite, respectivamente.

## 1.2. N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um derivado acetilado do aminoácido L-cisteína de peso molecular de 163,2 que contem o radical sulfidríla cuja fórmula química é  $C_5H_9NO_3S$  (ZIMENT et al, 1988) (**Figura 1**). Apesar de rapidamente absorvido por via oral, apenas uma pequena percentagem dela intacta chega ao plasma e conseqüentemente nos tecidos (DE CARO et al 1989). É desacetilado e metabolizado nos intestinos e fígado.

Seu pico de concentração plasmática é atingido em menos de uma hora após ingestão oral e sua meia vida livre gira em torno de 2,15 horas, tornando-se indetectável de 10 a 12 horas após a administração. O grupo sulfidríla é responsável por uma grande parte da atividade metabólica da NAC, enquanto que o grupo amino substituído do acetil torna a molécula mais estável contra a oxidação.

Dos três componentes aminoácidos da glutatona (glutamato, glicina e cisteína) a cisteína tem a menor concentração intracelular. Como o reabastecimento de glutatona é feito através da síntese “de novo”, a disponibilidade de cisteína pode limitar a sua síntese durante período de stress oxidativo (DEKHUIJZEN et al, 2004).

A maioria dos efeitos benéficos da NAC administrada oralmente decorre de sua capacidade teórica de reduzir cistina extracelular em cisteína, ou de ser uma fonte de metabólitos SH, estimulando a síntese de Glutaciona reduzida (GSH), aumentando a atividade da glutaciona-S-transferase, promovendo detoxicação e agindo diretamente como scavengers de radicais livres (DE VRIES et al 1993). Essa qualidade permite que a mesma seja utilizada como antídoto em intoxicações por acetoaminofen.

Embora a NAC não pareça afetar as concentrações dos citocromos p450 em microsomas hepáticos e pulmonares, ela pode estimular as atividades de enzimas citosólicas envolvidas na redução da NADP (glicose 6-fosfato deidrogenase e 6-fosfogluconato deidrogenase), na redução da glutaciona (GSSG-redutase) e na detoxicação redutiva de xenobióticos (DE FLORA et al 1985, DICKINSON et al 2003). Evidências, tanto in vivo quanto in vitro indicam que a NAC é capaz de aumentar a biossíntese intracelular de GSH (KELLY G S 1998). Associado à sua ação antioxidante, a NAC age como um vasodilatador, facilitando a produção e ação do óxido nítrico (ARDISSINO et al 1997).

O NAC tem sido historicamente utilizado como mucolítico em patologias respiratórias. Entretanto parece ter efeito benéfico em situações de redução do GSH ou stresses oxidativos, como infecção pelo hiv, câncer, patologias cardíacas, hepatotoxicidade por acetaminofen e tabagismo.

Sua ação na DPOC tem se mostrado positiva como mucolítica, por diminuir a viscosidade do muco, facilitando sua expectoração (TATTERSALL et al, 1983) e prevenindo exacerbações (STEY et al, 2000). Seu grupo sulfidril interage com títulos dissulfito, quebrando o muco em unidades menores e menos viscosas. A NAC age também como expectorante estimulando a ação ciliar e o reflexo vagal gastro-pulmonar.

Na nefropatia induzida por contraste, a NAC mostrou-se benéfica na prevenção do evento (TEPEL et al 2000; MARENZI et al, 2006). Na infecção por influenza, pacientes que fizeram uso de NAC, tiveram menor chance de apresentar sintomas clínicos da doença, e menos severidade quando presentes, apesar das taxas semelhantes de soroconversão comparados ao grupo placebo (DE FLORA et al, 1997).

Em pacientes HIV positivos, costumamos detectar níveis reduzidos de cisteína e GSH, sugerindo possíveis efeitos benéficos do uso de NAC na redução da diminuição da contagem de CD4+ (AKERLUND et al 1996), na capacidade de aumentar a imunidade de células T estimulando a formação de colônias de células T e bloqueando a expressão da NF- $\kappa$ B (BREITHAUPT et al 1996).

A administração de NAC também parece ter papel terapêutico na doença cardiovascular, através da diminuição dos níveis de lipoproteína e homocisteína, protegendo contra danos de isquemia e reperfusão e aumentando a efetividade da nitroglicerina (Bostom AG et al 1996, CECONI et al, 1988).

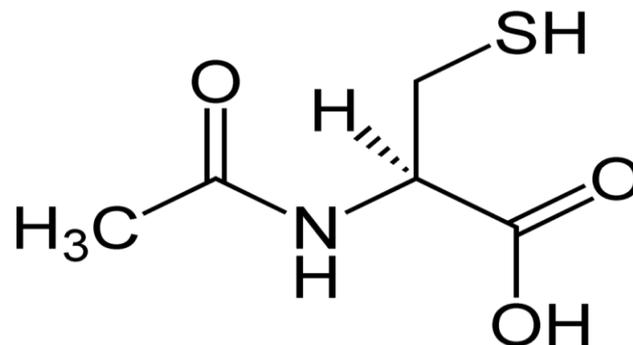
Na hepatotoxicidade por overdose de acetaminofen (>10g), os efeitos maléficos ocorrem dentro de horas após a ingestão, como resultado da oxidação do acetaminofen em metabólitos tóxicos, como o N-acetilbenzoquinonimina. Estes metabólitos depletam os estoques hepáticos intracelulares de GSH e subsequentemente causam dano ao fígado (KELLY et al, 1998).

Outras ações da NAC são diminuição da deterioração da função pulmonar na Fibrose pulmonar idiopática (DEMEDTS et al, 2005), aumento da ovulação e gravidez com o uso combinado de Clomifeno em mulheres com Síndrome de ovários policísticos (RIZK et al, 2005), supressão de pólipos colônicos (ESTENSEN et al,

1999), efeito aditivo ao tratamento de erradicação do *Helicobacter pylori* (GURBUZ 2005), efeito quelante no envenenamento por metais pesados, nos sintomas oculares da Síndrome de Sjogren e na epilepsia mioclônica (KELLY et al, 1998).

A NAC é geralmente segura e bem tolerada, mesmo em altas doses. Como reações adversas, podemos ter náuseas, vômitos, diarreia, rash cutâneo, flushing, dor epigástrica e constipação. Em casos de overdose (>1200 mg 2x/dia) o paciente poderá apresentar quadro de cefaleia, zumbido, urticária, rash, calafrio, febre e reação anafilactóide. A NAC potencializa fortemente o efeito na nitroglicerina. A DL50 em camundongos é de 7888mg/Kg e maior que 6000mg/Kg em ratos com doses orais.

A dose oral como mucolítico é de 600-1500mg/dia, dividida em três doses. No envenenamento por acetaminofen a dose inicial é de 140mg/Kg e 17 doses subsequentes de 70mg/Kg a cada quatro horas.



**Figura 1. Estrutura da N-acetilcisteína**

### 1.3. Irinotecano

O irinotecano é um derivado semissintético da camptotecina, um alcaloide extraído da camptotheca ou sintetizado quimicamente. Esta substância foi inicialmente isolada por WALL em 1966 a partir de uma planta nativa da China e do Tibet, a *Camptotheca acuminata* (WALL et al, 1966) (**Figura 2**). É um agente antineoplásico inibidor seletivo da topoisomerase I, enzima que mantém a conformação tridimensional adequada do DNA através da indução reversível da quebra de cadeias simples.

A topoisomerase I é uma enzima que atua sobre a dupla fita do DNA relaxando a supertorção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (WANG, 1996). O irinotecano e seu metabólito ativo, o SN-38, ligam-se ao complexo DNA-topoisomerase I e impedem a religação dessa cadeia simples. A citotoxicidade do irinotecano deve-se ao dano no DNA de cadeia dupla produzido durante a síntese de DNA (fase S), quando as enzimas de replicação do DNA interagem com o complexo ternário do irinotecano ou do SN-38, com o DNA e a topoisomerase I.

O irinotecano é um precursor hidrossolúvel do metabólito lipofílico SN-38. O SN-38 é formado por clivagem da ligação carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina, mediada pela carboxilesterase. Essa conversão ocorre principalmente no fígado. Possui potência 1000 vezes maior que o irinotecano. (KOIZUMI et al., 2006). 95% do SN-38 se ligam às proteínas plasmáticas (principalmente a albumina), comparado a aproximadamente 50% do irinotecano. O SN-38 é conjugado formando um metabólito glicuronídeo (SN-38-glicuronídeo) (**figura 3**).

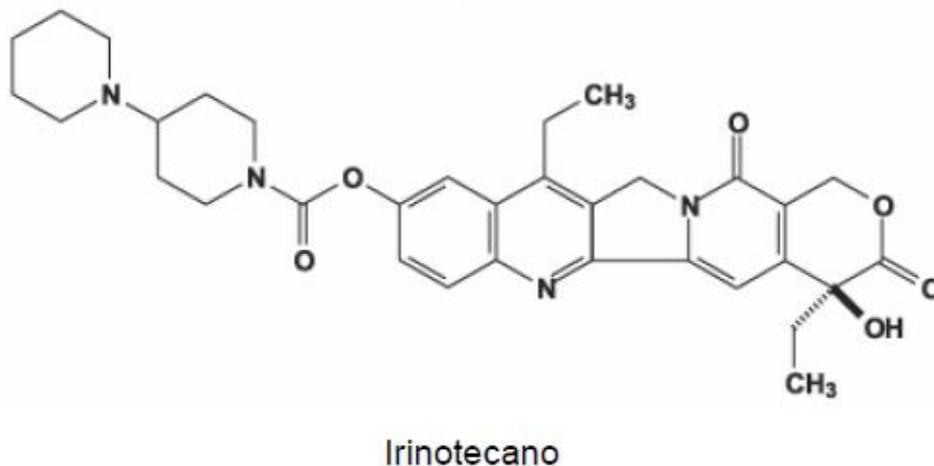
O irinotecano está indicado no tratamento único ou combinado do câncer colorretal, neoplasia pulmonar de pequenas células e não pequenas células, neoplasia de colo uterino, ovário, neoplasia gástrica recidivada, câncer de mama irrissecável ou recidivado, carcinoma epidermóide de pele e linfoma, entre outros (SALTZ et al., 2000, CHESTER et al., 2003).

O efeito colateral mais comumente encontrado pelo uso do irinotecano é a mucosite intestinal (IKUNO et al., 1995; FREITAS, 2007), decorrente uma destruição celular gastrointestinal por diminuição da proliferação celular, atrofia e levando a um quadro de disabsorção e distúrbios eletrolíticos, principalmente do Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, e diarreia, com potencial de translocação bacteriana (KEEFE, 2007).

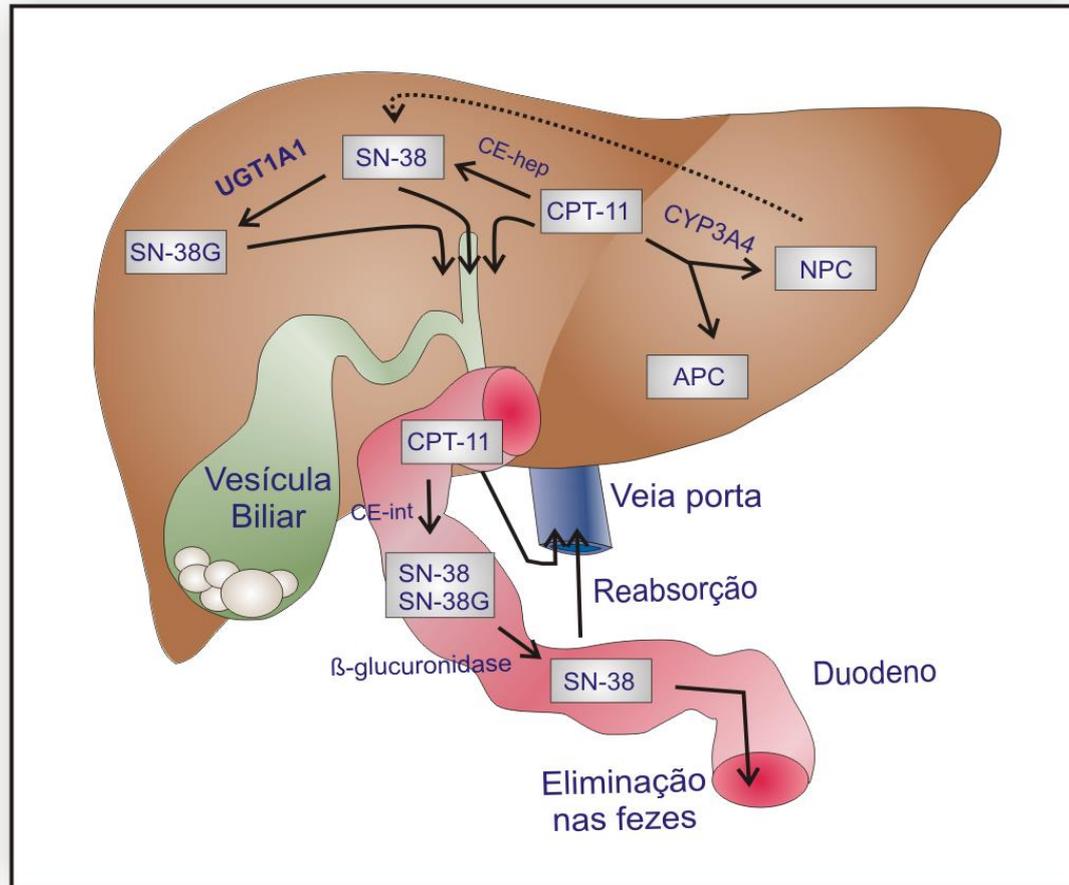
Outro efeito colateral de importante impacto clínico do irinotecano é o risco aumentado de esteatohepatite, que também aumenta significativamente a morbimortalidade dos pacientes que necessitam de ressecções hepáticas no seu tratamento, ou até mesmo tornando o tratamento cirúrgico do fígado proibitivo pelo risco de insuficiência hepática (VAUTHEY et al., 2006).

O irinotecano possui uma meia vida média de 6 horas após infusão intravenosa. Já a meia vida média de eliminação do SN-38 é de 10 horas. As concentrações máximas do SN-38 são atingidas geralmente dentro de 1 hora após o término de infusão de 90 minutos do produto.

Estudos em animais mostraram que a DL50 do irinotecano é de 132 a 134mg/Kg em camundongos, 84-85mg/Kg em ratos e 40-80mg/Kg em cães.



**Figura 2. Estrutura do irinotecano**



**Figura 3. Metabolismo do Irinotecano.** No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxiesterase (CE) em SN-38. A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile através das proteínas de transporte MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) e MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, o CPT-11 pode ser clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação êntero-hepática (TAKASUNA et al., 1996; CHESTER et al., 2003; TALLMAN, 2005).

#### 1.4. Quimioterapia pré-operatória

Embora comumente administrado pós-operatoriamente no CCR, a quimioterapia sistêmica tem sido utilizada com cada vez mais frequência no contexto pré-operatório antes de ressecções hepáticas (ADAM et al, 2004; 2004a), por conta de algumas vantagens teóricas: causar downstaging tumoral, aumentar as taxas de ressecção curativas e aumentar conversão de doença irressecável em ressecável. O uso pré-operatório da quimioterapia em pacientes com alto risco de recorrência pode servir como identificador dos possíveis respondedores para o uso pós-operatório baseado em sua resposta prévia. Além do mais, pacientes que progridem doença em vigência de quimioterapia podem ser poupados de uma ressecção cirúrgica não terapêutica (ALLEN et al, 2003).

A quimioterapia pré-operatória tem mostrado alterações patológicas no parênquima hepático, com um aumento da incidência de esteatose, esteatohepatite e congestão sinusoidal, causando aumento da morbimortalidade, traduzido em resultados clínicos adversos após a cirurgia hepática (FERNANDEZ et al, 2005).

O estudo de Vauthey e colaboradores foi o primeiro a não só quantificar o risco, mas identificar as toxicidades específicas dos quimioterápicos utilizados nas neoplasias colorretais com um aumento da mortalidade pós-operatória (VALTHEY et al, 2006). Esse estudo associou o uso do irinotecano com o risco aumentado da esteatohepatite e aumento da morbimortalidade de pacientes submetidos, principalmente a grandes ressecções hepáticas. Apesar de associado a aumento da congestão sinusoidal e não à esteatohepatite, o uso da oxaliplatina não foi associado a aumento da taxa de morbimortalidade.

Estudos tem sugerido a realização de biópsia hepática pré-operatoriamente à ressecção para quantificação da NASH (FERNANDEZ et al, 2005). Entretanto problemas com erros de amostras não representativas ou alterações de interpretação dos laudos histopatológicos em relação aos critérios de esteatohepatite (FIORINI et al, 2004) fazem com que esta técnica não seja de todo aceita.

## 1.5. NASH e NAFLD

Doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) tem emergido como a causa mais importante de doença hepática crônica relacionada ao aumento da incidência de obesidade e diabetes tipo 2 na população. A NAFLD é caracterizada pela ausência de uma história de uso significativo de álcool ou de outra doença hepática conhecida. Esteatohepatite não alcoólica (NASH) é a forma progressiva de NAFLD. Outras causas de NAFLD são secundárias ao uso de drogas antirretrovirais, ganho rápido de peso, nutrição parenteral total e recentemente, ao uso de agentes antineoplásicos como o irinotecano, causando complicações como insuficiência hepática e restrições ao tratamento cirúrgico desses pacientes (SOLÍS HERRUZO et al, 2006; VAUTHEY et al, 2006).

A NAFLD se refere a um amplo espectro de danos ao parênquima hepático, desde esteatose simples ou acúmulo de triglicerídeo intracelular até esteatohepatite não alcoólica (NASH), fibrose e cirrose (ADAMS et al, 2005).

Suas implicações clínicas são principalmente decorrentes da crescente incidência na população e do seu potencial de progressão para cirrose e insuficiência hepática. A NAFLD é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica, com uma prevalência de 15-20% na população geral. Em paciente obesos com diabetes tipo 2 a incidência de esteatose pode chegar em até 90% dessa população (FRACANZANI et al, 2008). Embora alterações laboratoriais e achados radiológicos possam ser sugestivos, a avaliação histológica hepática é o exame padrão ouro para o diagnóstico de NAFLD, pois este é o único método de diferenciar entre simples esteatose, NASH e graus de fibrose (Brunt, 2004).

A despeito da hepatite crônica, a qual pode ser adequadamente graduada e estadiada através da caracterização da inflamação e fibrose, a caracterização histológica da NAFLD e NASH, por definição inclui a descrição de esteatose e dano celular, somadas à inflamação e fibrose. Essas características histológicas não são específicas e podem ser encontradas em outras doenças hepáticas. (BAUMGARDER et al, 2008)

Ao contrário da esteatose, a esteatohepatite é um padrão de dano hepático específico que pode ser reconhecido mesmo que uma segunda doença hepática esteja presente. A presença de balonização é a chave para o diagnóstico

de NASH. Precocemente na doença as células balonizadas são vistas com mais frequência na zona 3, próxima às veias hepáticas. Nas fases mais tardias ou mais severas elas podem perder essa distribuição por zonas. Embora o termo esteatohepatite implique que a esteatose e a inflamação sejam partes importantes do dano, esses componentes podem variar em grau de intensidade. Uma biópsia que evidencia balonização, mas com pouco grau de esteatose ou inflamação, pode ainda ser classificado como esteatohepatite. Embora não necessário para o diagnóstico de esteatohepatite, a presença de fibrose pode ser muito útil (BRUNT, 2011).

O termo *borderline* para esteatohepatite denota um padrão sugestivo, porém não confirmativo (NEUSCHWANDER-TETRI, 2010). Outros achados podem estar presentes na NAFLD, tais como pequenos arranjos de hepatócitos não zonais com esteatose microvesicular, megamitocôndria, núcleo glicogenado, lipogranulomas e glicogenose hepatocelular.

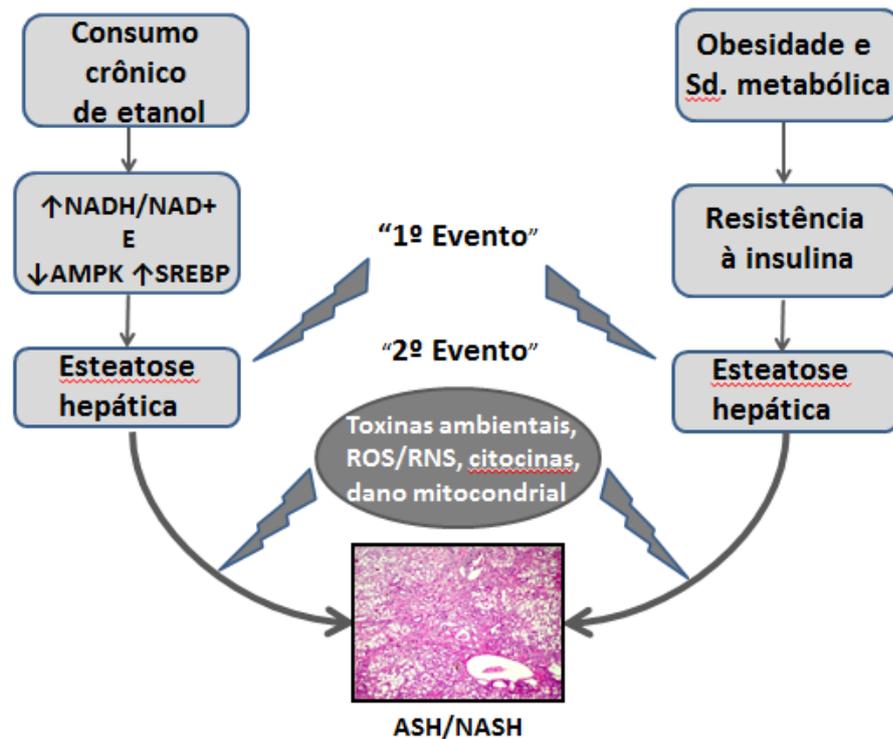
A tentativa de se propor um método de identificação dessa patologia foi sustentado no conceito de que o diagnóstico histológico de NASH baseia-se numa constelação de características mais do que um achado individual. Inicialmente Brunt descreveu uma avaliação semiquantitativa para diagnóstico de NASH (BRUNT, 1999). Promrat desenvolveu um sistema de escore semiquantitativo que englobava todo o espectro de NAFLD, porém não contemplava NAFLD pediátrico, cujas características diferem da NAFLD do adulto (PROMRAT, 2004).

Em 2002 o National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) patrocinou o desenvolvimento de uma rede de pesquisa clínica cooperativa multicêntrica para NASH (NASH CRN), nos quais um dos desafios foi desenvolver e validar um sistema de avaliação histológica que possuísse a capacidade de englobar todo o espectro de NAFLD e que pudesse ser aplicado em NAFLD pediátrica. Um escore de NAFLD foi desenvolvido e validado pelo comitê de Patologia do NASH CRN, através de dez patologistas que avaliaram individualmente e cegamente 32 amostras de fígado adulto e 18 infantis, com clínica presumida de NAFLD. Os casos foram especificamente incluídos para cobrir a gama de diagnósticos possíveis: esteatohepatite, possível esteatohepatite ou sem esteatohepatite. Foram utilizadas as técnicas de Hematoxilina e Eosina e Tricrômio de Masson (KLEINER et al, 2005).

Várias características histológicas foram avaliadas e, baseado em dados de concordância e análise de regressão múltipla, foi proposto um sistema de escore

semiquantitativo de atividade de NAFLD (NAS), que incluiu apenas características de dano hepático ativo e reversíveis. O escore foi definido pela soma não ponderada dos escores para esteatose (0-3: menos que 5% = grau 0; 5-33% = grau 1; 33-66% = grau 2; >66% = grau 3), inflamação lobular (0-3: ausência de infiltrados por campo de 200 x = grau 0; até 2 infiltrados por campo de 200 X = grau 1; 2 a 4 infiltrados por campo de 200 X = grau 2; > 4 infiltrados por campo de 200 X = grau 3) e balonização (0-2: Escore 0 = ausência; escore 1 = leve; escore 2 = severa), variando de 0 a 8. A fibrose, evento menos reversível, não foi incluída nos escores de atividade. Casos com NAS de 0-2 foram considerados como não diagnóstico de esteatohepatite. Casos com escore de 3-4 foram considerados borderline para esteatohepatite e escores 5-8 foram considerados como diagnósticos de esteatohepatite (KLEINER et al, 2005).

O benefício de se estabelecer um diagnóstico histológico preciso de NASH é que se possa identificar indivíduos com risco para doença hepática progressiva, cirrose e morte proveniente de doença hepática crônica (BRUNT, 2011).



**Figura 4. Modelo dos “dois eventos” de esteatohepatite.** O consumo de álcool, obesidade, e outras agressões, levando a uma resistência à insulina. Altos níveis de insulina aumentam a expressão de proteína 1c de ligação ao elemento regulatório de colesterol (SREBP-1c), enquanto que altos níveis de glicose ativam a proteína de ligação do elemento de resposta ao carboidrato (CREBP), induzindo lipogênese e esteatose. Altos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (FFA) também podem permitir a sua captação hepática a despeito dos seus níveis no fígado. A peroxidação lipídica no hepatócito leva à produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), causando disfunção mitocondrial e diminuição da capacidade de reoxidar NADH e FADH<sub>2</sub>. Endotoxinas podem induzir liberação de citocinas que são capazes de induzir apoptose, quimiotaxia de neutrófilos, ativação de células esteladas e corpos de Mallory, culminando com a NASH (JAESCHKE et al 2001; DAY e JAMES, 1998; BASARANOGLU, et al 2013).

## 1.6. Mediadores pró-inflamatórios

### 1.6.1. Interleucina-1

A maioria das patologias humanas é decorrente de inflamações crônicas, resultando na perda da função, por exemplo, de articulações, vasos sanguíneos ou todo um órgão. A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória de ação local e sistêmica produzida por fagócitos mononucleares ativados (DINARELLO, 2012). É a citocina fundadora da família IL-1 de ligantes, a qual é atualmente constituída por 11 membros, incluindo moléculas agonistas capazes de ativação de sinalização mediada por receptor (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33) e antagonistas (IL-1Ra) (LIE et al, 2012).

A terapia bloqueando a atividade de IL-1 nas síndromes autoinflamatórias resulta numa rápida e sustentada redução na severidade da doença, incluindo a reversão da perda mediada por inflamação. Uma vez ligada a seu receptor, a IL-1 desencadeia uma cascata de mediadores inflamatórios, quimiocinas e outras citocinas.

Em termos convencionais, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são referidas como IL-1 e ligam-se ao mesmo receptor (IL-1R1), mas consistem de dois produtos genéticos distintos (LIE et al, 2012).

A IL-1 $\alpha$  é expressa constitutivamente em vários tecidos, como queratinócitos da pele e endotélio (DINARELLO, 2009). A ação recíproca com a IL-1Ra regula a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares. Como exemplo, a sinalização de IL-1 $\alpha$  está associada à proliferação de queratinócitos, enquanto que sua atenuação, associada a um aumento de IL-1Ra, promove a diferenciação celular (DEWBERRY et al, 2003).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais, células mielóides e que possui efeitos pleiotróficos. Sua síntese e liberação são hermeticamente reguladas e a atividade da IL-1 $\beta$  liberada é ainda regulada pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). (HELEN et al, 2011).

IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são sintetizadas como precursores e seus processos para ativação requerem proteases celulares específicas. O precursor de IL-1 $\beta$  somente é ativado após clivagem pela caspase-1. Em contraste, a IL-1 $\alpha$  exerce seu papel em

ambas as formas precursoras e ativas (ativada pela calpaina), quando ligados a seu receptor (KAMARI et al, 2011).

O papel da IL-1 está bem definido em inúmeras patologias, tais como doença autoimune e autoinflamatória (MANSFIELD et al, 2001), danos isquêmicos hepáticos, cardíacos, renais e cerebrais (BOUTIN et al, 2001), diabetes tipo 1 e 2 (MANDRUP-POULSEN, 2010), artrite reumatóide (CUNNANE et al, 2001) e outras doenças inflamatórias crônicas. Enquanto o papel de IL-1Ra no metabolismo lipídico e esteatose têm sido estudados in vivo com resultados conflitantes, o papel específico de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na esteatose não está bem definido ainda (KAMARI et al, 2011).

Estes trabalhos com modelos de esteatohepatite tem evidenciado o papel da IL-1 no mecanismo de dano hepatocelular, e embora a escassez de dados em modelos induzidos por quimioterápicos não nos permita afirmar, estudos sugerem mecanismos semelhantes (COSTA et al, 2014).

### **1.6.2. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$ , originalmente conhecido como caquexina, foi descrito inicialmente em 1975 e reconhecido por sua habilidade de causar lise tumoral em uma variedade de modelos in vitro e em camundongos (daí o nome fator de necrose tumoral) (CARSWELL et al, 1975). A sua atividade antitumoral em modelos laboratoriais, levou ao questionamento se sua inibição poderia potencializar o risco de malignidade.

Sua atividade biológica requer a agregação de três monômeros de TNF- $\alpha$  para formar TNF- $\alpha$  trimérico, o qual age através da sua ligação a um ou dois tipos de receptores: TNFR1 ou TNFR2 (BEUTLER et al, 1989), também conhecidos como p55 e p75, respectivamente. Ambos exercem múltiplos efeitos no sistema imune, tais como: estímulo da liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e GM-CSF, regulação positiva da expressão de moléculas de adesão endotelial (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) e quimiocinas (MCP-1, MIP-2, RANTES e MIP-1 $\alpha$ ) e coordenação da migração de leucócitos para órgãos alvo.

O TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e neurônios, em resposta ao LPS e a outros produtos bacterianos. Seu papel é importante na ativação de macrófagos e fagossomos,

diferenciação de monócitos a macrófagos, recrutamento de macrófagos e neutrófilos, formação e manutenção de granuloma (KOO, 2010).

A expressão aumentada de TNF- $\alpha$  está também associada à patogênese de inúmeras doenças como artrite reumatoide, Doença de Crohn, Psoríase e Sarcoidose, e o uso de inibidores de TNF- $\alpha$  tem se mostrado efetivo como estratégia alvo específica no tratamento dessas patologias.

A produção aumentada de TNF- $\alpha$  tem sido evidenciada nas fases iniciais e tardias da NAFLD, através dos mecanismos conhecidos de indução de produção de outras citocinas pró-inflamatórias com consequente recrutamento de células de defesa danosas ao tecido hepático (MANCO et al., 2007).

### **1.6.3. Óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula produzida através da ação da óxido nítrico sintase (NOS), um grupo de proteínas que catalizam a oxidação de um dos grupos guanidinas da L-arginina gerando quantidades equimolares de citrulina e NO. São conhecidas três isoformas de NOS. Duas são constitutivamente expressas em neurônios e células endoteliais (NOS1 e NOS3, respectivamente) em baixas concentrações (picomolares) após estímulos, como a bradicinina, trombina e adenosina difosfato, e uma terceira induzida por citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-18, produzidas em macrófagos (NOS2) em concentrações mais elevadas (micromolares) durante evento inflamatório (NATHAN e XIE, 1994).

O NO tem, entre suas funções, a de regular o fluxo regional, a ativação de células endoteliais e inibição de adesão, a ativação e a agregação plaquetária no endotélio vascular (RADOMSKI et al., 1987). O NO participa ainda de diversos processos, como vasodilatação, neurotransmissão e defesa não específica do hospedeiro. Embora níveis moderados de NO derivado da iNOS sejam benéficos, muitas doenças são causadas pela sua superprodução.

O NO produzido pela iNOS possui papel em várias patologias inflamatórias, como enterocolite necrotizante, cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO et al., 1997; RIBEIRO et al., 2002), pancreatite (GOMES-CAMBRONERO et al., 2000), mucosite oral (LEITAO et al., 2007) e mucosite intestinal, esta última inclusive induzida por irinotecano. (MELO ML et al, 2008; LIMA-JUNIOR et al, 2012).

Em fígados sadios os níveis de iNOS encontram-se praticamente indetectáveis, enquanto que, durante processos inflamatórios em resposta ao LPS, agressão crônica pelo álcool ou outros estados patológicos como na NASH os níveis de iNOS elevam-se no fígado devido à infiltração de células inflamatórias e via indução nas células de Kupffer, hepatócitos e células epiteliais dos ductos biliares, com consequente produção de óxido nítrico (BUTTERY et al, 1994).

O NO é rapidamente metabolizado no plasma a outros produtos estáveis. No entanto, na presença de superóxido ( $O_2^-$ ), o NO forma o peroxinitrito ( $OONO^-$ ), um poderoso oxidante capaz de iniciar a peroxidação lipídica (REZNICK et al, 1993).

Este fenômeno é importante para a hepatotoxicidade porque o NO e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) são responsáveis pela mediação da disfunção mitocondrial, e os aumentos na expressão de iNOS na esteatose estão relacionados com a nitração das proteínas mitocondriais (LEE et al, 2003). Além do mais, o NO regula a cadeia de respiração mitocondrial através da ligação reversível nos locais hemes redox ativos no citocromo c oxidase e afeta a biogênese mitocondrial através de interações com a guanilato ciclase solúvel (NISOLI et al, 2004).

É postulado que um defeito na sinalização do NO contribui para a hepatotoxicidade por álcool através da inibição da síntese de ATP, aumento de ROS e da incapacidade de adaptação a stress por hipóxia (SHIVA et al, 2005).

Estudos mostram que a redução da produção de NO pela NOS das células endoteliais (eNOS) contribui para a patologia hepática via alteração do fluxo sanguíneo e disponibilidade de oxigênio. Opostamente, a administração de doadores de NO e a superexpressão de eNOS tem mostrado efeito protetor no dano hepática em modelos animais de hepatotoxicidade (RIVERA-CHAVES et al, 2001).

### **1.7. Peroxinitrito e 3-nitrotirosina**

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas primeiramente pelas mitocôndrias nas células como produto do metabolismo durante a conversão de oxigênio molecular em água. Essas incluem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ). A transferência de um elétron para o oxigênio pelo citocromo c oxidase e enzimas flavinas resulta na produção de  $O_2^-$ . A enzima superóxido

dismutase (SOD) o converte em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Entre células normais, os fagócitos combatem microorganismos com ação oxidativa de ROS.

Peroxisomas produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a degradação de ácido graxo. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é na maioria degradado em água pela catalase, mas uma parte pode escapar para dentro da célula (AMES et al 1993). As células possuem vários mecanismos de defesa antioxidante, tais como vitamina C e E, e enzimas como SOD, glutatona peroxidase e catalase. O stress oxidativo é gerado quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Como consequência as ROS podem modificar ou danificar macromoléculas nas células, incluindo oxidação e peroxidação de DNA.

Essas espécies reativas podem depletar ou causar danos oxidativos no mtDNA, com consequente bloqueio do fluxo de elétrons e diminuição da síntese de polipeptídeos da cadeia respiratória mitocondrial (RC), aumentando a formação de ROS na mitocôndria e liberando produtos da peroxidação lipídica. Concomitantemente a taxa aumentada de  $\beta$ -oxidação aumenta a formação de NADH, FADH<sub>2</sub> e mais liberação de elétrons para a RC. Componentes reduzidos da RC em excesso reagem com oxigênio para formar radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e também peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) na presença de níveis elevados de iNOS.

A mitocôndria dos pacientes com NASH apresenta taxa de re-síntese de ATP diminuída, exibindo lesões ultraestruturais, com a presença de inclusões paracristalinas na megamitocôndria (SANYAL et al, 2001). Essas mitocôndrias possuem atividades marcadamente diminuídas dos complexos da cadeia respiratória (PÉRES-CARRERAS et al, 2003).

A formação do peroxinitrito in vivo possui implicações significativas na biologia dos radicais livres, exercendo um papel defensivo num grande número de reações fisiopatológicas e também agindo como molécula de sinalização na ativação de vários protooncogenes (KAMAT et al, 2006).

A evidência da formação de peroxinitrito in vivo tem sido obtida imunistoquimicamente através da detecção de 3-nitrotirosina (KAMAT et al, 2006).

A nitração da tirosina é uma modificação pós-translacional em que o peroxinitrito reage com o anel aromático fenólico da tirosina em aminoácidos solúveis e em proteínas, através da adição de um grupo NO<sub>2</sub> para formar a 3-nitrotirosina. A extensão da nitração pode ser quantificada medindo-se a 3-nitrotirosina em matrizes biológicas, como sangue, urina e tecido (TSIKAS et al,

2012). Portanto a 3-nitrotirosina é considerada um marcador imunistoquímico de stress nitrativo.

## 1.8. JUSTIFICATIVA

As neoplasias têm sido vistas como um grande problema de saúde em função de sua crescente incidência, em especial o câncer colorretal, por apresentar elevada causa de morte entre ambos os sexos. E entre o grupo de neoplasias colorretais, as metastáticas para o fígado tem levado oncologistas a desenvolver novas combinações de quimioterápicos associados ou não a agentes biológicos no intuito de melhorar as taxas de conversão e tornar esses pacientes susceptíveis à ressecção cirúrgica completa com objetivo de aumento da sobrevida. No entanto a escolha de determinados antineoplásicos nos esquemas de poliquimioterapia ou tratamentos mais prolongados podem levar a efeitos colaterais que limitam ou até mesmo impossibilitam o benefício do resgate cirúrgico desses pacientes.

O irinotecano é um antineoplásico amplamente utilizado no câncer colorretal metastático, e um de seus efeitos colaterais mais significativos são a esteatohepatite não alcoólica (NASH), levando a um aumento da morbimortalidade decorrente de insuficiência hepática pós-ressecção cirúrgica.

O laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer (LAFICA) recentemente desenvolveu o primeiro modelo experimental de esteatohepatite usando camundongos Swiss tratados com o agente antineoplásico irinotecano com o objetivo de compreender os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento dessa entidade. No modelo foi mostrado o papel de IL-1 $\beta$ , TLR-4 e iNOS, bem como da translocação bacteriana portal causada pela mucosite intestinal na patogênese da esteatohepatite. Ainda neste mesmo trabalho os autores evidenciaram a participação do stress oxidativo no desenvolvimento da NASH através do aumento da dosagem de malonaldeído e da diminuição de glutathiona no tecido hepático. No entanto faz-se necessário utilizar o modelo com a ideia de testar drogas que possam atenuar ou mesmo inibir este efeito colateral, aumentando o benefício da droga.

Portanto, considerando o uso crescente de irinotecano nas neoplasias colorretais, o risco aumentado de esteatohepatite quando comparado a grupos virgens de tratamento quimioterápico, seu aumento de morbimortalidade em

pacientes que irão ser submetidos a ressecções hepáticas, o desenvolvimento de um modelo validado de esteatohepatite, o conhecimento prévio de um possível efeito hepatoprotetor na N-acetilcisteína em intoxicações por acetaminofen, propomos testar os possíveis efeitos protetores da NAC no modelo de esteatohepatite induzida por irinotecano em camundongo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar o possível efeito inibitório da N-acetilcisteína na evolução da esteatohepatite induzida pelo quimioterápico irinotecano em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o possível efeito protetor da N-acetilcisteína sobre parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos presentes na esteatohepatite induzida por irinotecano;
- Avaliar o envolvimento dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 e óxido nítrico, na patogênese da esteatohepatite induzida pelo irinotecano, assim com o efeito da NAC sobre esses mediadores;
- Avaliar o envolvimento do peroxinitrito na fisiopatologia da esteatohepatite induzida pelo irinotecano e o possível mecanismo protetor da N-acetilcisteína.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material utilizado

##### 3.1.1. Soluções, reagentes e fármacos.

- Cloridrato de irinotecano (Evoterin®, Evolabis, São Paulo, Brasil, ampola de 100 mg).
- N-acetilcisteína (Acetilcisteína, União Química, São Paulo, Brasil, ampola de 300mg, 100mg/ml)
- Solução salina: cloreto de NaCl a 0,9% (15M): frasco de 500mL (Tayuyna)
- Éter etílico 98% (Dinâmica)
- Álcool etílico 70% (Reagen)
- Formaldeído 40% (Reagen)
- Hematoxilina (Reagen)
- Eosina (Merck)
- Hematoxilina de Mayer (Reagen)
- Vectastatin – kit ABC (Vector)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-IL-1 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-3-Nitrotirosina (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de carneiro (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- **Tampão fosfato de potássio: solução A – 988mL + solução B – 12mL**
  - Solução A:
    - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth).....6,8 g
    - Água destilada .....q.s.p. 1 L

- Solução B:
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth).....8,7g
- **Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)**
  - HTAB (Sigma)..... 5g
  - Tampão fosfato de potássio..... 1L
- **Peróxido de hidrogênio (0,1%)**
  - Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec)..... 1 mL
  - Água destilada.....q.s.p. 30 mL
- **Solução de o-dianisidina**
  - O-dianisidina (Sigma) ..... 16,7 mL
  - Tampão fosfato de potássio..... 10 mL
  - $\text{H}_2\text{O}_2$ ..... 50  $\mu\text{L}$
  - Água destilada..... 90 mL

### 3.1.2. Equipamentos

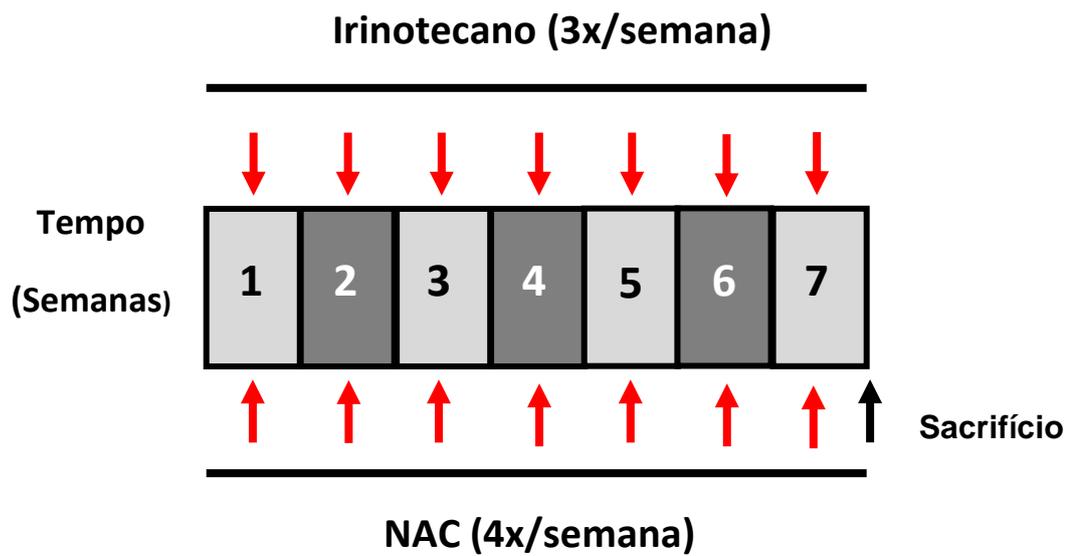
- Centrífuga Eppendorf – 5804R – Hamburgo – Alemanha
- Sonicador de amostras – Thornton – São Paulo - Brasil
- Homogenizador de amostras – Polytron PT10-35 – Kinematica – Suíça
- Vortex – Phoenix – Araraquara – São Paulo – Brasil
- Microscópio óptico – Olympus BX41TF – Olympus Optical CO – Japão
- Autoclave modelo digital horizontal – Stermax – Paraná – Brasil
- Balança analítica – Sartorius BL 210S
- Balança digital modelo MF6/ 1- Filizola – São Paulo – Brasil
- PHmetro modelo MR 10 – Denver instrument – EUA
- Deionizador de água – Milipore – São Paulo – Brasil
- Máquina de gelo – Everest – Rio de Janeiro – Brasil
- Freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  Revco Elite Plus – Thermoscientific – EUA
- Leitor de placas modelo ELX 800 – Bio Tek instruments – EUA

### **3.2. Animais**

Foram utilizados camundongos machos do tipo Swiss, pesando entre 20 e 25g, obtidos junto ao biotério da Faculdade de Medicina/ Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos experimentais (n=12) e mantidos todos em um recinto com controle de temperatura ambiente, com acesso livre à alimentação e água e submetidos aos ciclos de claro-escuro. O protocolo experimental segue estritamente as regras do NIH para o cuidado e uso de animais em laboratório e foi completamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (número de protocolo 21/12).

### **3.3. Indução da esteatohepatite e tratamento com NAC**

Baseado no modelo de esteatohepatite induzido por irinotecano desenvolvido por Costa e colaboradores, os animais foram distribuídos em seis grupos de doze animais cada. No grupo 1 os animais foram injetados com solução salina (5 mL/kg, i.p. quatro vezes por semana). No grupo 2 os animais foram injetados com N-acetilcisteína (1000mg/Kg sc, quatro vezes por semana). No grupo 3 os animais foram injetados com Irinotecano (50 mg/kg, i.p, três vezes por semana em dias alternados). No grupo 4 os animais foram injetados com Irinotecano (50 mg/kg, i.p, três vezes por semana em dias alternados) e N-acetilcisteína (10mg/Kg sc uma hora antes do irinotecano + uma quarta dose na semana). No grupo 5 os animais foram injetados com Irinotecano (50 mg/kg, i.p, três vezes por semana em dias alternados) e N-acetilcisteína (100mg/Kg sc uma hora antes do irinotecano + uma quarta dose na semana). No grupo 6 os animais foram injetados com Irinotecano (50 mg/kg, i.p, três vezes por semana em dias alternados) e N-acetilcisteína (1000mg/Kg sc uma hora antes do irinotecano + uma quarta dose na semana). Todos os grupos tiveram suas sobrevidas monitorizadas e foram tratados por um período de 7 semanas, conforme modelo citado e sacrificados ao final da sétima semana. Os animais foram pesados no início de cada semana para controle de peso e ajuste das doses. Durante o sacrifício os fígados dos animais foram pesados para avaliação.



**Figura 5 – Esquema de tratamento.** Esquema de injeção do Irinotecano, N-acetilcisteína e sacrifício dos animais. O irinotecano foi administrado na dose de 50 mg/Kg 3 vezes por semana por sete semanas consecutivas. A N-acetilcisteína foi administrada nas doses de 10, 100 e 1000mg/Kg 4 vezes por semana por sete semanas. O sacrifício foi realizado ao final da sétima semana.

### **3.3.1. Dosagens das concentrações plasmáticas de alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST)**

Antes do sacrifício, ao término da sétima semana, os camundongos foram sedados com éter etílico a 98% e tiveram sangue colhido pelo plexo orbital. Após centrifugação do sangue a  $100 \times g/10$  min, o plasma foi obtido para análise bioquímica de alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST). Para a mensuração, utilizou-se um espectrofotômetro em um nível de absorvância de 365 ou 545 nm como apropriado, de acordo com o recomendado pelo *kit* do fabricante (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil).

### **3.3.2. Avaliação histopatológica do fígado**

As amostras do fígado foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, desidratadas e emblocadas em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram obtidos e depois corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E), e em seguida examinados por microscopia óptica (x100). As lâminas foram analisadas por um patologista experiente que não possuía informações sobre o tratamento ou da divisão entre os grupos. O diagnóstico e a graduação da NASH foram avaliados conforme o Escore de Atividade da NASH (NAS) proposto por Kleiner e colaboradores (2005) como segue: esteatose (menos que 5% = grau 0; 5-33% = grau 1; 33-66% = grau 2; >66% = grau 3); inflamação lobular (ausência de infiltrados por campo de 200  $\times$  = grau 0; até 2 infiltrados por campo de 200  $\times$  = grau 1; 2 a 4 infiltrados por campo de 200  $\times$  = grau 2; > 4 infiltrados por campo de 200  $\times$  = grau 3) e tumefação hepatocítica (Escore 0 = ausência; escore 1 = leve; escore 2 = severa). A presença concomitante desses três parâmetros histológicos fora necessária para definir NASH.

### **3.3.3. Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)**

Amostras de fígado foram homogeneizadas em 100mg/1mL de KCl 1,15% (homogenato 10%). Um alíquota de 500  $\mu$ L do homogenato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionados 3 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% (TBA). Essa mistura foi fervida em banho-maria por 45 min e, em seguida,

resfriada em água gelada, adicionados 4 mL de n-butanol, agitada em vortex por 1 min e centrifugada a 1200 g/15min. Utilizou-se a fase butanólica para leitura em espectrofotômetro a 520 e 535nm. A diferença obtida entre as duas leituras foi utilizada para calcular o MDA, baseada no coeficiente de extinção molar de 13700M/cm (UCHIYAMA e MIHARA, 1978).

#### **3.3.4. Determinação de lipídios no tecido hepático**

As amostras do fígado foram analisadas para determinação da quantidade de lipídios de acordo com o método proposto por BLIGH e DYER (1959). Concisamente, as amostras foram homogeneizadas em uma solução de 1:2 entre clorofórmio/metanol seguindo a proporção de 100 mg de tecido/1.9 mL da solução e agitadas. Em seguida, clorofórmio foi adicionado (0.63 mL) e a solução novamente agitada. Finalmente, 0.63 ml de água destilada foram adicionadas atingindo a proporção final (2:2:1 clorofórmio:metanol:água). O sistema foi centrifugado na temperatura ambiente a 200 X g/2 min dando origem a um sistema com duas fases (aquosa em cima, orgânica em baixo). A fase inferior foi recuperada e o total de lipídeos foi calculado (g de lipídeos/100 g amostra) após total evaporação da amostra (100 °C).

#### **3.3.5. Reação Imunoistoquímica para iNOS, IL-1 $\beta$ e 3-Nitrotirosina**

A partir das amostras de fígado dos animais submetidos à esteatohepatite induzida por irinotecano, pré-tratados com NAC (10mg/Kg) e tratados apenas com salina, foi realizada uma análise imunohistoquímica para iNOS, IL-1 $\beta$  e 3-Nitrotirosina, conforme descrito a seguir: as peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação, promoveu-se uma recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M (pH 6.0) aquecido a 100 °C durante 15 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente durante 20 min, as lâminas foram lavadas em PBS. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio 3% v/v durante 15 min e lavagem com PBS. Procedeu-se a incubação, por 12 h, com anticorpo primário rabbit anti-iNOS, anti-IL-1 $\beta$  e anti 3-nitrotirosina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluídos em PBS – BSA 5% na proporção de 1:100 para IL-1 $\beta$ , 1:200 para iNOS e 1:400 para 3-nitrotirosina. Em

seguida as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas (30 min) com o anticorpo secundário biotilado (anti-rabbit IgG) diluído em PBS-BSA 5% na proporção de 1:400 para IL-1 $\beta$ , nitrotirosina e iNOS. Após a remoção do anticorpo biotilado, com lavagem em PBS as lâminas foram incubadas por 30 min com o complexo ABC (Horseradish Peroxidase Standard). Após lavagem com PBS e incubação com DAB/peróxido (2 min) para dar a cor da reação, as lâminas foram lavadas com H<sub>2</sub>O destilada e desidratadas com uma série graduada de álcool e xilol. Finalmente, realizou-se a contra-coloração com hematoxilina de Harry's e posterior desidratação e montagem das lâminas. Uma análise quantitativa da reação seguiu os parâmetros descritos por YEOH et al. (2005). A coloração foi observada sob microscopia óptica por um patologista que desconhecia os tratamentos e graduada como a seguir: 0, sem imunomarcção; 1, fraca imunomarcção; 2, moderada imunomarcção; 3, intensa imunomarcção.

### **3.3.6. Determinação de IL-1 e TNF- $\alpha$ no tecido hepático**

A partir das amostras de fígado dos animais submetidos à esteato-hepatite induzida por irinotecano, pré-tratados com NAC (10mg/Kg) e tratados apenas com salina e estocados em freezer -80°C até o momento do ensaio. Os tecidos coletados foram homogeneizados e processados como descrito por SAFIEH-GARABEDIAN *et al.* (1995). A detecção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 murino (2 $\mu$ g/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal anticorpo anti-TNF-  $\alpha$  e anti-IL-1 diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50  $\mu$ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 $\mu$ L) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37 C por 15 a 20min. A reação enzimática foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância medida a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL/mg proteína.

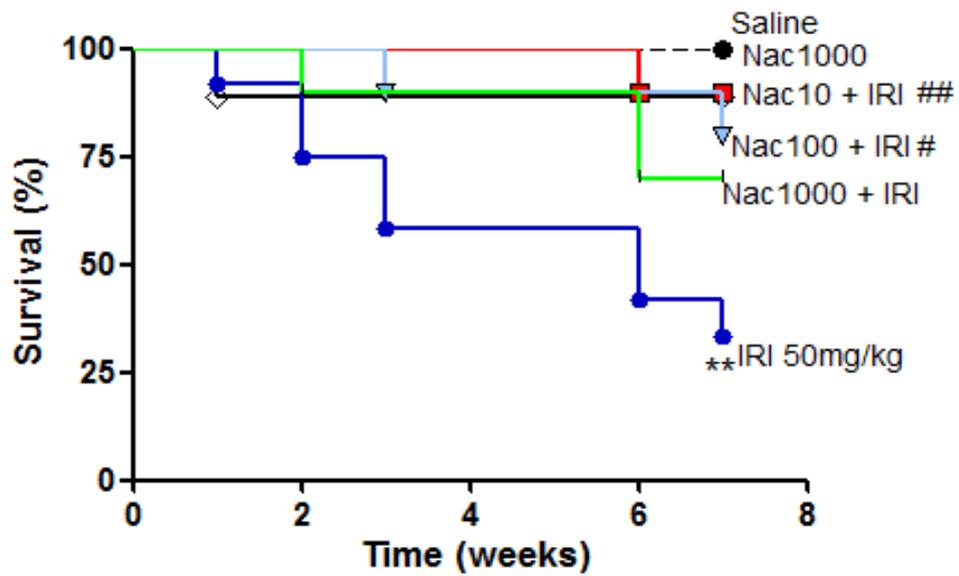
### 3.4. Análise estatística

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância (one-way ANOVA ou two-way ANOVA) ou Kruskal-Wallis para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, seguido dos testes de comparações múltiplas de Bonferroni ou o teste de Dunns. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . A curva de sobrevivência foi expressa em termos de percentagem de animais vivos, realizando-se o teste de log-rank Mantel-Cox para determinar a diferença entre as curvas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Curva de sobrevida

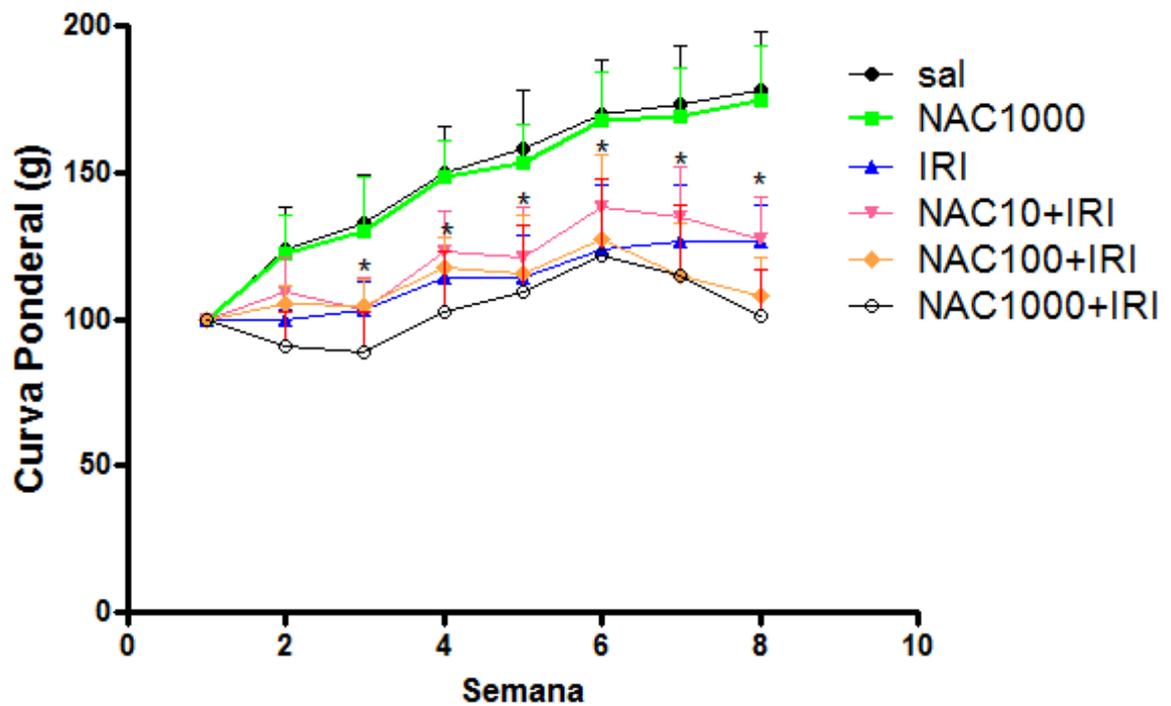
A figura 6 mostra a curva de sobrevida dos animais tratados com irinotecano, do grupo controle com salina, NAC e dos animais tratados com irinotecano + NAC. Os animais tratados com irinotecano (IRI, 50 mg/kg três vezes por semana por sete semanas consecutivas, i.p) mostraram uma redução da sobrevida (44%  $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo salina (5 mL/kg, i.p. quatro vezes por semana) (100% de sobrevida). Os animais pré-tratados com NAC nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg, 4 vezes por semana por sete semanas consecutivas, sc mostraram um aumento da sobrevida ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo do irinotecano (10 mg/kg: 90% de sobrevida; 100 mg/kg: 80% de sobrevida). No grupo pré-tratado com NAC 1000mg/Kg houve aumento de sobrevida, porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ). O grupo tratado com NAC (1000mg/Kg 4 vezes por semana por sete semanas consecutivas, sc) apenas, não apresentou alteração da sobrevida, quando comparado com o grupo salina.



**Figura 6. Curva de sobrevida.** Tratamento com rinotecano reduz a sobrevida dos animais prevenida pela NAC. O IRI induziu uma significativa ( $P < 0,05$ ) redução de sobrevida (44%) vs o grupo salina (sobrevida: 100%). NAC aumentou a sobrevida de animais injetados com IRI ( $p < 0,05$ ) (10 mg/kg: 90%; 100 mg/kg: 80%) vs grupo IRI (44%). (Log rank test,  $n = 08$ ). \* $p < 0.05$  versus salina.

#### 4.2. Curva de peso corporal

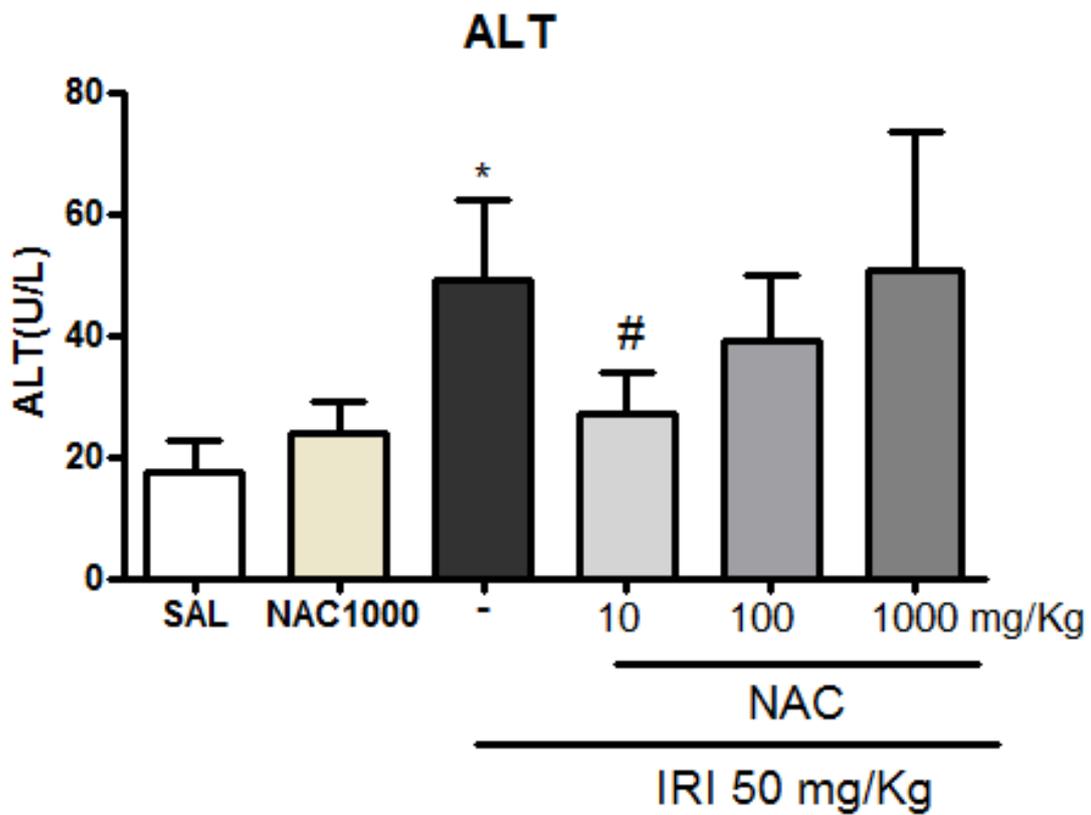
A figura 7 mostra a avaliação ponderal dos animais tratados com irinotecano, do grupo controle com salina, NAC e dos animais tratados com irinotecano + NAC. Os animais tratados com irinotecano na dose de 50 mg/kg (*ip* 3 vezes/semana, por sete semanas consecutivas) apresentaram perda ponderal significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo salina. Nenhum pré-tratamento com NAC (10, 100 e 1000mg/Kg 4 vezes por semana por sete semanas consecutivas, *sc*) preveniu esta perda ( $p > 0,05$ ). O tratamento com NAC isolado não interferiu na curva ponderal quando comparado com o grupo salina.



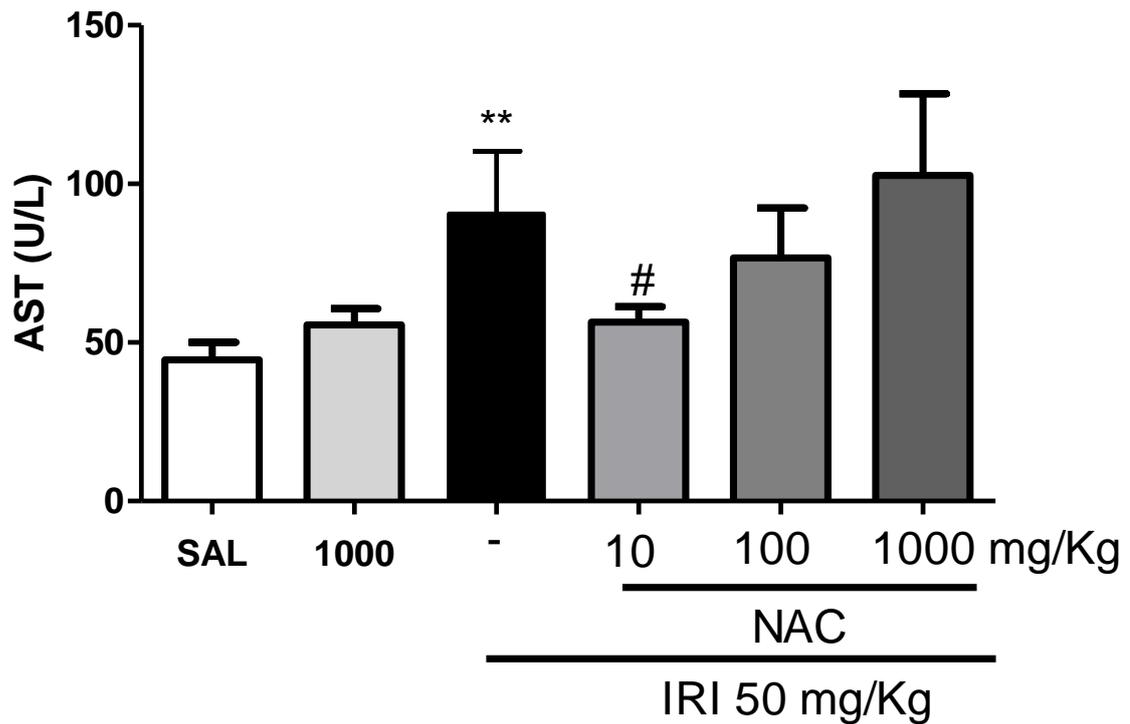
**Figura 7. Peso corporal.** Tratamento com irinotecano induz perda de peso corporal não prevenida pela NAC. Os animais foram pesados semanalmente para determinar a variação do peso corporal. O IRI induziu significativa ( $p < 0,05$ ) perda ponderal vs grupo salina. NAC não protegeu da perda ponderal induzida por irinotecano. NAC isoladamente não interferiu nos pesos dos animais. Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina.

#### **4.3. Dosagem das concentrações plasmáticas de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ALT e AST)**

O irinotecano induziu a um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) das dosagens séricas de ALT ( $48,99 \pm 13,4$ ) e AST ( $90,55 \pm 19,7$ ) quando comparados com o grupo salina (ALT:  $17,31 \pm 5,2$  e AST:  $44,58 \pm 5,4$ ) ao término das sete semanas. Apenas NAC na dose de 10mg/Kg preveniu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) esta elevação das enzimas (ALT:  $26,95 \pm 7$  e AST:  $56,42 \pm 4,8$ ) (**figuras 8 e 9**).



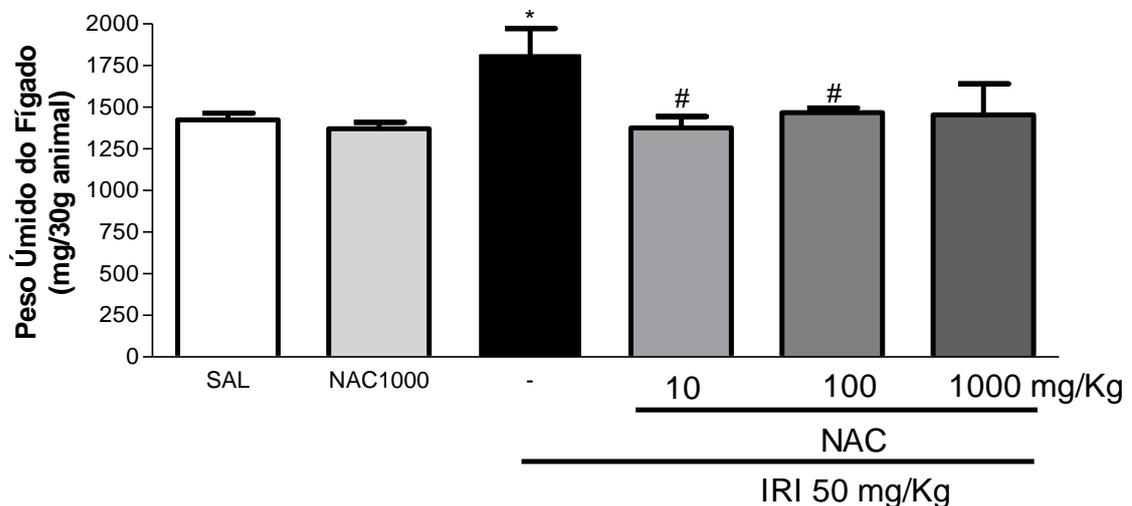
**Figura 8. Concentrações plasmáticas de ALT.** O IRI induziu uma significativa ( $P < 0,05$ ) elevação de ALT ( $48,99 \pm 13,4$ ), vs o grupo salina (ALT:  $17,31 \pm 5,2$ ). O tratamento com NAC (10 mg/Kg) diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) ALT:  $26,95 \pm 7$  vs o grupo IRI. Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina



**Figura 9. Concentrações plasmáticas de ALT.** O IRI induziu uma significativa ( $P < 0,05$ ) elevação de AST ( $90,55 \pm 19,7$ ), vs o grupo salina (AST:  $44,58 \pm 5,4$ ). Tal alteração foi prevenida ( $P < 0,05$ ) pelo tratamento com NAC (10 mg/Kg) AST:  $56,42 \pm 4,8$ . Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina

#### 4.4. Peso úmido do fígado

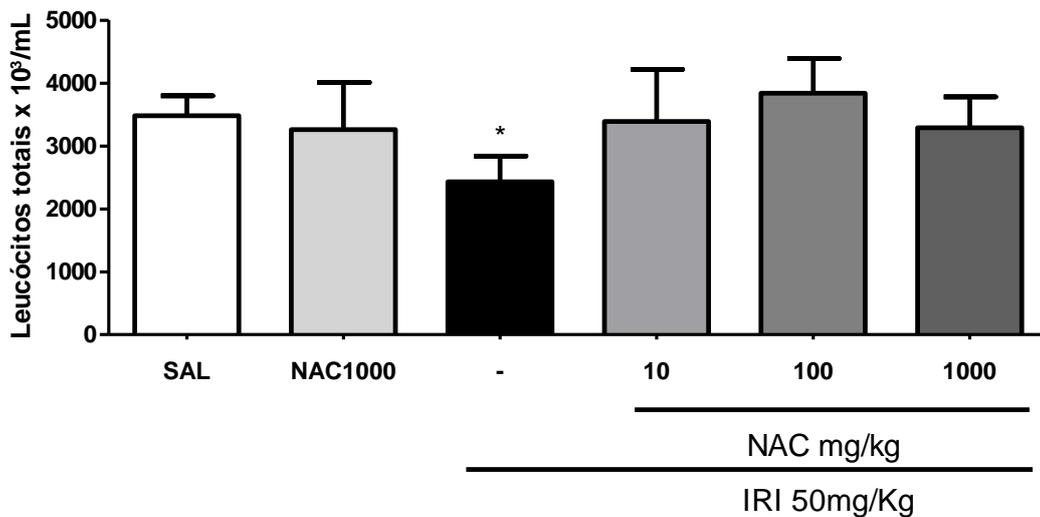
Ao fim da sétima semana, os animais foram sacrificados e tiveram seus fígados coletados para avaliar seus pesos líquidos (peso do fígado líquido/30g animal). Houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do peso úmido do fígado no grupo tratado com irinotecano quando comparado com o grupo salina ( $1814 \pm 159,3$  vs  $1425 \pm 39,5$ ). As doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg de NAC reverteram esse aumento ( $1375 \pm 68,2$  e  $1467 \pm 28,6$  respectivamente ( $p < 0,05$ )). Apenas o grupo tratado com NAC (1000mg/Kg) não apresentou alteração do peso úmido hepático, quando comparado com o grupo salina (**figura 10**).



**Figura 10 – Peso hepático líquido.** Tratamento com Irinotecano induz alteração do peso hepático líquido em camundongos. Pré-tratamento com NAC inibe esse efeito. O IRI induziu um significativo ( $P < 0,05$ ) aumento do peso do fígado ( $1814 \pm 159,3$ ), vs o grupo salina (peso hepático:  $1425 \pm 39,5$ ). Tratamento com NAC (10mg/Kg e 100mg/Kg) reverteu esse aumento ( $1375 \pm 68,2$  e  $1467 \pm 28,6$  respectivamente) ( $p < 0,05$ ) induzido pelo Irinotecano. Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina

#### 4.5. Contagem de leucócitos totais no sangue

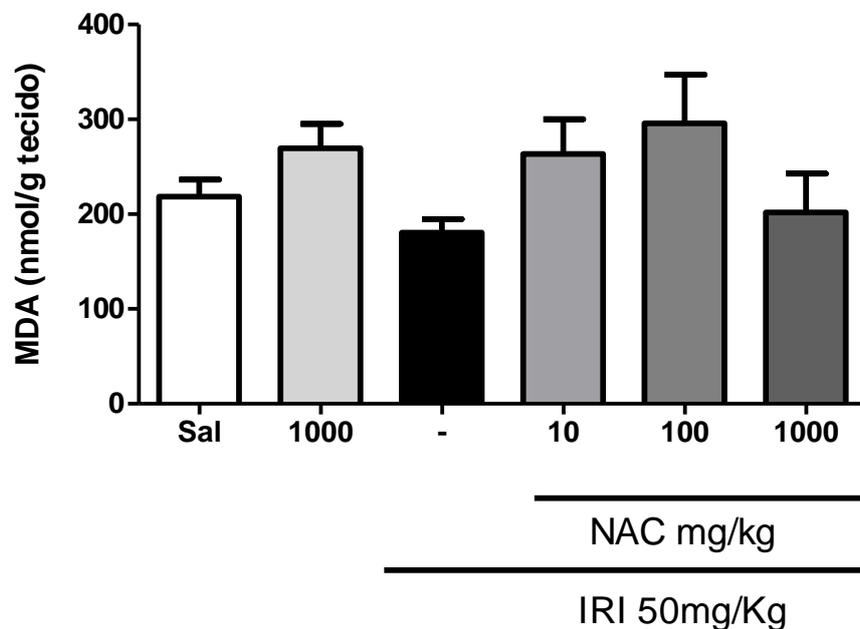
Ao término da sétima semana de tratamento amostras de sangue foram coletadas antes do sacrifício dos animais. Observou-se diferença estatística do número total de leucócitos dos grupos injetados com irinotecano em relação ao grupo salina. O pré-tratamento com NAC nas três doses não reverteu a leucopenia (figura 11).



**Figura 11. Contagem de leucócitos totais no sangue.** Na sétima semana de tratamento os animais tratados com irinotecano apresentaram uma leucopenia ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina. O grupo pré-tratado com NAC nas três doses não reverteu a leucopenia em relação ao grupo salina. Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina.

#### 4.6. Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)

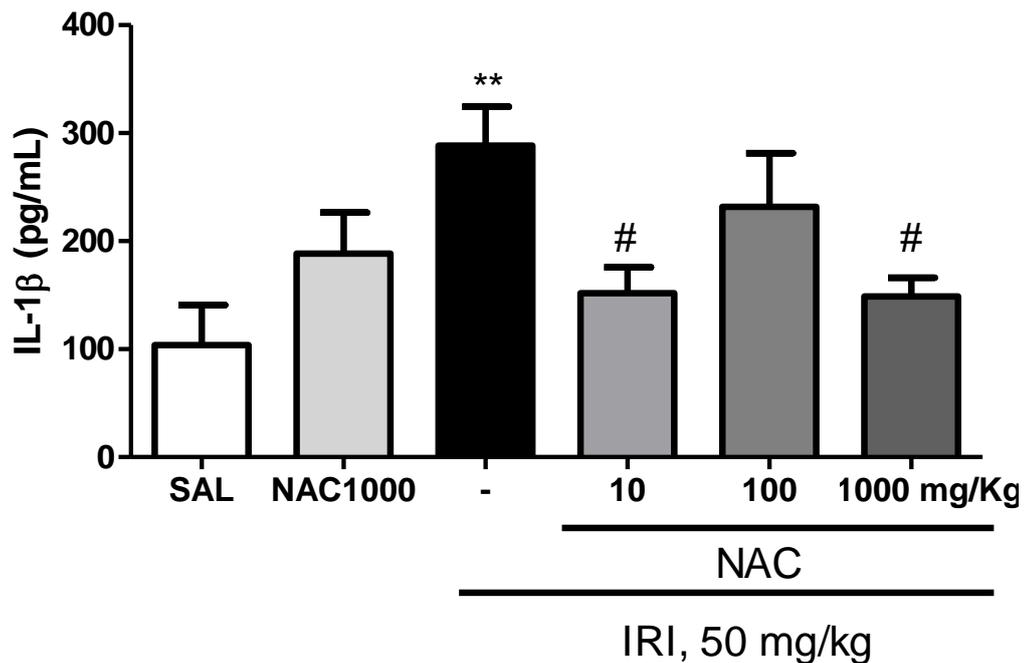
Ao término da sétima semana de tratamento não observaram-se diferenças estatísticas na dosagem de MDA no fígado, entre os grupos tratados com irinotecano, pré-tratados ou não com NAC, em relação ao grupo salina (**figura 12**).



**Figura 12. Dosagem de malonaldeído no tecido hepático.** Na sétima semana de tratamento não observaram-se diferenças na dosagem de MDA no tecido hepático nos grupos injetados com irinotecano, pré-tratados ou não com NAC, em relação ao grupo salina ( $P > 0,05$ ). Salina:  $218,4 \pm 18$  IRI ( $180,5 \pm 14,3$ ) NAC 10 ( $263,4 \pm 36,8$ ) NAC 100 ( $295,9 \pm 51,2$ ) NAC 1000 ( $201,9 \pm 40,8$ ). Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina.

#### 4.7. Dosagem de IL-1 no tecido hepático

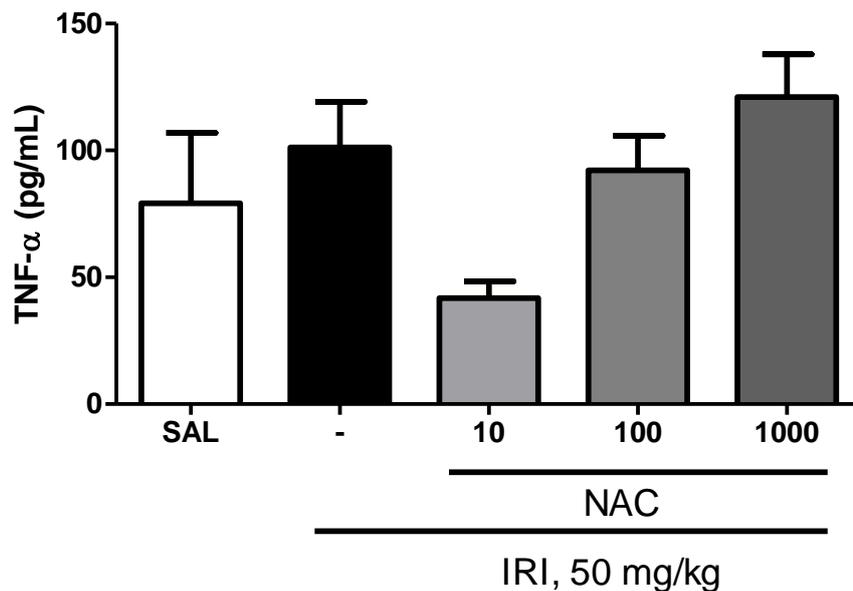
Na dosagem tecidual hepática da citocina pró-inflamatória IL-1 houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos animais tratados com irinotecano ( $288,5 \pm 35,86$ ) em comparação com o grupo salina ( $104 \pm 36,9$ ). Pré tratamento com a NAC nas doses de 10mg/Kg e 1000mg/Kg inibiram o aumento da citocina IL-1 ( $p < 0,05$ ) ( $152 \pm 23,92$  e  $149 \pm 17,21$ , respectivamente) (**figura 13**).



**Figura 13. Dosagem de IL-1 no tecido hepático.** O IRI induziu um significativo ( $P < 0,05$ ) aumento da dosagem hepática de IL-1 ( $288,5 \pm 35,86$ ), vs o grupo salina ( $104 \pm 36,9$ ). Tratamento com a NAC nas doses de 10mg/Kg e 1000mg/Kg inibiram ( $p < 0,05$ ) o aumento da citocina IL-1 ( $152 \pm 23,92$  e  $149 \pm 17,21$ , respectivamente). Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina.

#### 4.8. Dosagem de TNF- $\alpha$ no tecido hepático

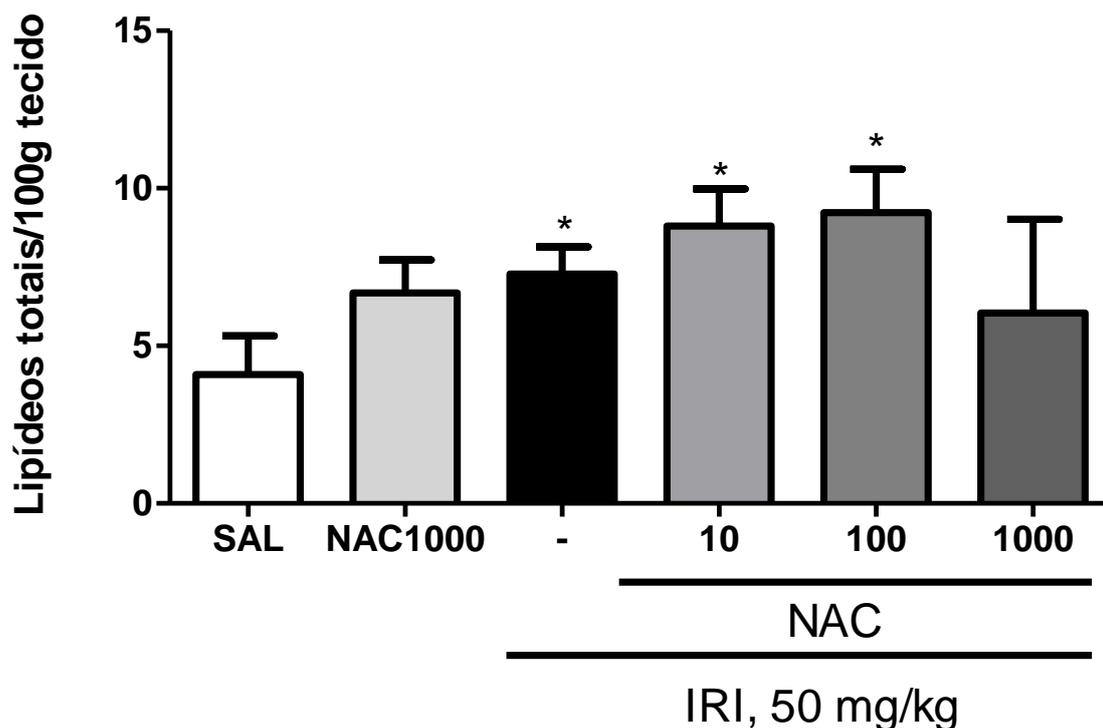
Na dosagem tecidual hepática da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , não houve aumento significativo nos animais tratados com irinotecano ( $101,1 \pm 18,0$ ) em comparação com o grupo salina ( $79,21 \pm 27,73$ ), pré-tratados ou não com a NAC nas doses de 10mg/Kg, 100mg/kg e 1000mg/Kg ( $41,83 \pm 6,62$ ;  $92,14 \pm 13,73$  e  $121,0 \pm 16,86$  respectivamente) (**figura 14**).



**Figura 14. Dosagem de TNF- $\alpha$  no tecido hepático.** O IRI não induziu um significativo ( $P > 0,05$ ) aumento da dosagem hepática de TNF- $\alpha$  ( $101,1 \pm 18,0$ ), vs o grupo salina ( $79,21 \pm 27,73$ ). Tratamento com a NAC nas doses de 10mg/Kg, 100mg/Kg e 1000mg/Kg não alteraram ( $p > 0,05$ ) a dosagem da citocina TNF- $\alpha$  ( $41,83 \pm 6,62$ ;  $92,14 \pm 13,73$  e  $121,0 \pm 16,86$ , respectivamente). Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina

#### 4.9. Dosagem de lipídios totais no fígado

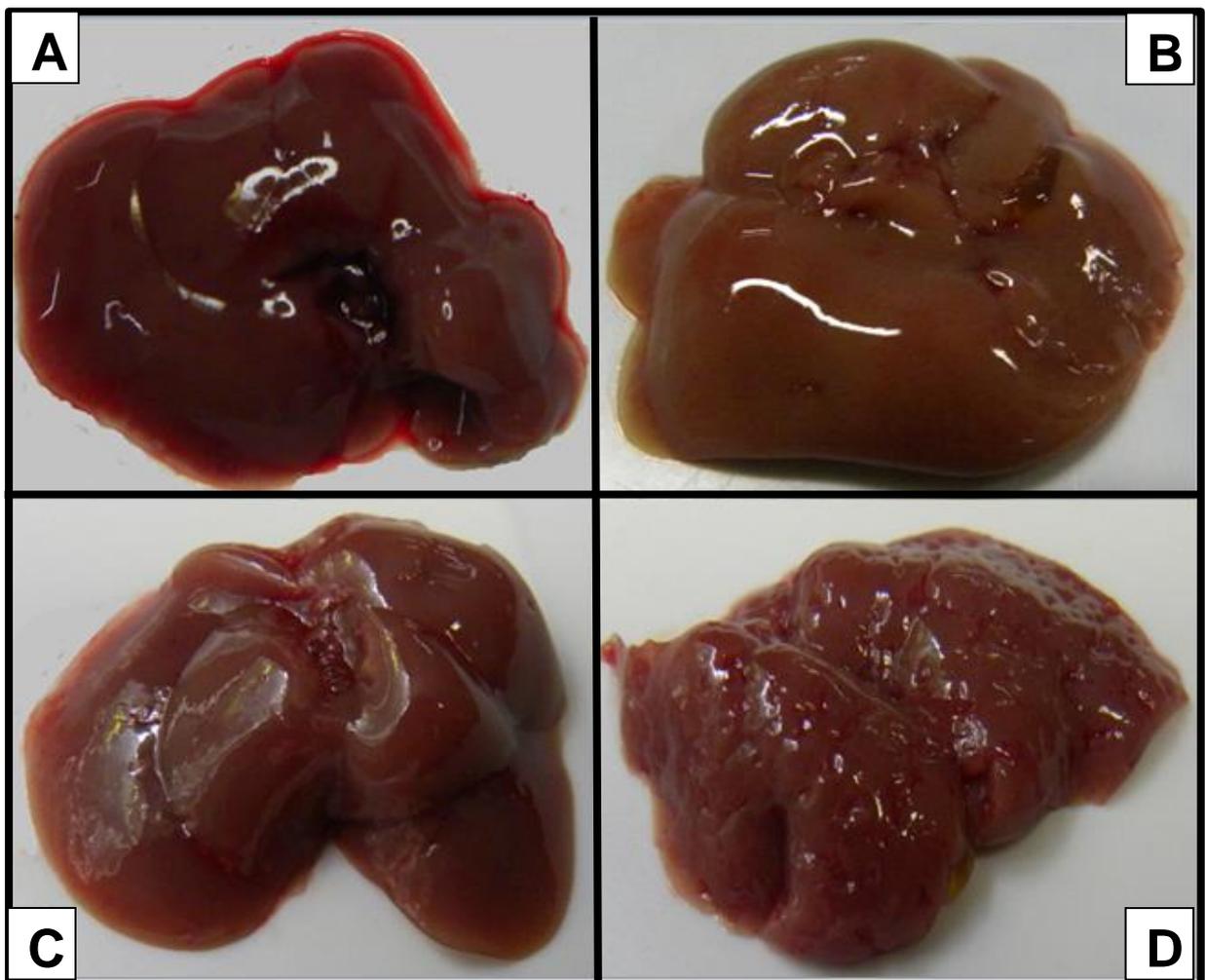
Na dosagem tecidual hepática de lipídios houve aumento significativo nos animais tratados com irinotecano ( $7,27 \pm 0,87$ ) em comparação com o grupo salina ( $4,1 \pm 1,21$ ). Pré tratamento com a NAC nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg não inibiram o aumento de lipídeos em ( $8,8 \pm 1,17$ ;  $9,22 \pm 1,38$  e  $6,04 \pm 2,96$  respectivamente). Animais pré-tratados com NAC na dose de 1000mg/Kg não mostrou alteração da dosagem de lipídios em comparação ao grupo salina ( $6,67 \pm 1,05$ ) (figura 15).



**Figura 15. Dosagem de lipídios totais no tecido hepático.** O IRI induziu um significativo ( $P < 0,05$ ) aumento da dosagem hepática de lipídios totais ( $7,27 \pm 0,87$ ), vs o grupo salina ( $4,1 \pm 1,21$ ). Pré-tratamento com a NAC nas doses de 10mg/Kg e 100mg/Kg não inibiram ( $p > 0,05$ ) esse aumento de lipídios no tecido hepático ( $8,8 \pm 1,17$ ;  $9,22 \pm 1,38$  e  $6,04 \pm 2,96$  respectivamente). Pré-tratamento com 1000mg/Kg não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados com o grupo salina ( $6,04 \pm 2,96$ ). NAC 1000 ( $6,67 \pm 1,05$ ). Os dados estão demonstrados como valores de média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) \* $p < 0,05$  vs salina

#### 4.10. Avaliação macroscópica do fígado

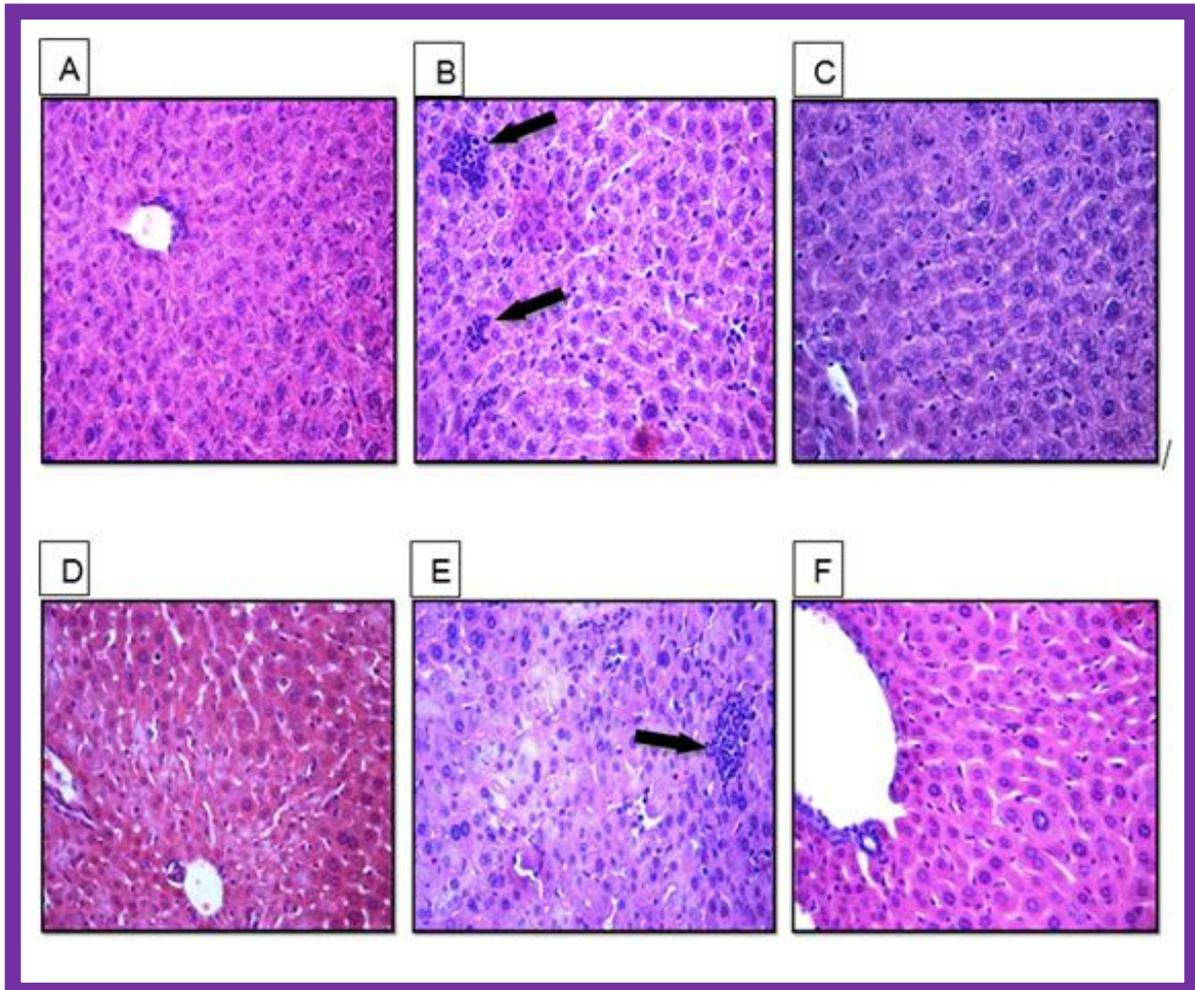
A **figura 16** ilustra os aspectos macroscópicos dos fígados. A **figura 16A** mostra um fígado de aspecto normal do grupo salina. Na **figura 16B** evidenciamos a clássica alteração do “fígado amarelo” de um animal tratado com irinotecano que desenvolveram esteatohepatite. A **figura 16C** ilustra o aspecto normal do fígado de um animal pré-tratado com NAC 10mg/Kg. A **figura 16D** ilustra um fígado de aspecto macronodular sugestivo de cirrose.



**Figura 16. Aspecto macroscópico do fígado.** A: fígado normal do grupo salina. B: fígado esteatótico do grupo irinotecano. C: fígado normal do grupo pré-tratado com NAC 10mg/Kg. D: fígado macronodular causado pelo irinotecano

#### **4.11. Avaliação histopatológica do fígado**

Na análise histopatológica observou-se uma redução do infiltrado inflamatório polimorfonuclear e uma preservação da arquitetura parenquimal hepática em animais submetidos ao tratamento com irinotecano quando pré-tratados com N-Acetilcisteína apenas na dose de 1000mg/Kg (figura 17F), enquanto que nas doses de 10mg/Kg (Figura 17D) e de 100mg/Kg (Figura 17E) não ocorreu alterações dos critérios de Kleiner em relação aos animais tratados apenas com irinotecano (Figura 17B). Os grupos tratados apenas com salina (Figura 17A) e com NAC (Figura 17C) não apresentaram infiltrados polimorfonucleares e manteve a organização tecidual hepática característica. Houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da mediana relativa ao infiltrado inflamatório lobular do grupo pré-tratado com NAC na dose de 1000mg/Kg a despeito do tratamento com irinotecano.



**Figura 17. Fotomicrografias do fígado.** Tecido hepático dos camundongos tratados com solução salina apresentando histologia normal (A). Camundongos tratados com irinotecano (B). Alterações histológicas características de esteatohepatite: Infiltrado portal neutrofílico (B). Setas identificam, nas figuras, o evento patológico descrito. Coloração pelo H&E (Magnificação 400x, black scale bars).

#### 4.12. Escores de Kleiner

**Tabela 1. Escores de atividade de NASH.** O irinotecano induziu uma elevação ( $p < 0,05$ ) dos escores histológicos de inflamação lobular [3 (1 - 3)], esteatose [1 (1 - 2)], balonização [2 (0 - 2)], ( $p < 0,05$ ) e do escore de Kleiner [5,5 (4 - 7)], quando comparado com o grupo salina [0(0-0), 0(0-0), 0(0-0) e 0(0-0), respectivamente]. Dos grupos pré-tratados com NAC, apenas a dose de 1000mg/Kg promoveu efeito hepatoprotetor ( $p < 0,05$ ) na inflamação lobular [1(1-3)]. Na análise dos demais escores não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo). \* $p < 0,05$  vs Salina; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs Salina.

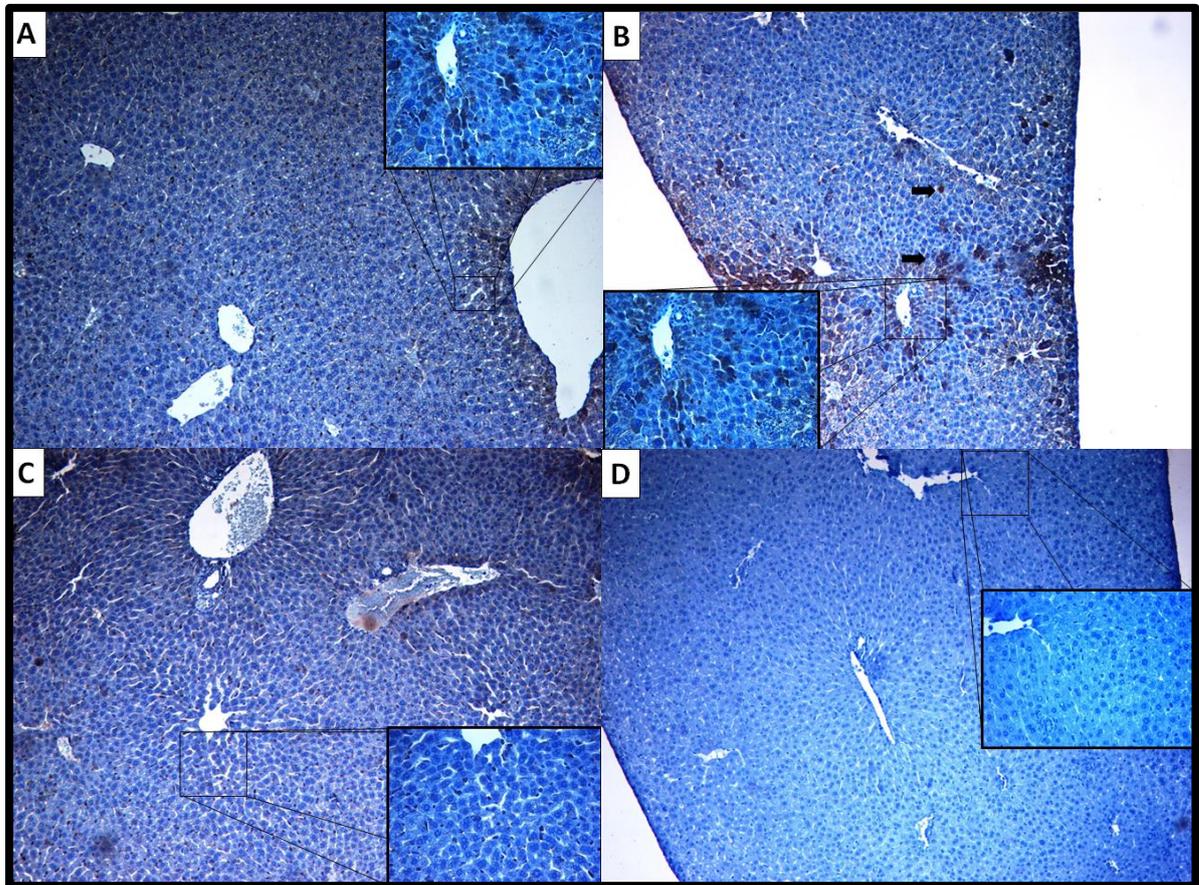
Grupos dos animais (n=8)	Parâmetros histológicos			Escore Final (Kleiner) (0-8)
	Inflamação lobular (0-3)	Grau de esteatose (0-3)	Tumefação celular (0-2)	
Salina	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
NAC (1000 mg/kg)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Irinotecano (50 mg/kg)	3 (1 - 3)***	1 (1 - 2)**	2 (0 - 2)*	5,5 (4 - 7)***
IRI (50 mg/kg) + NAC (10 mg/kg)	1 (1 - 2)	0 (0 - 1)	0 (0 - 2)	2 (1 - 4)
IRI (50 mg/kg) + NAC (100 mg/kg)	1 (0 - 3)	1 (0 - 1)	0 (0 - 2)	3 (1 - 4)
IRI (50 mg/kg) + NAC (1000 mg/kg)	1 (1 - 3)#	0,5 (0 - 1)	0 (0 - 1)	2 (1 - 3)

#### 4.13. Reação imunoistoquímica para IL-1, iNOS e Nitrotirosina.

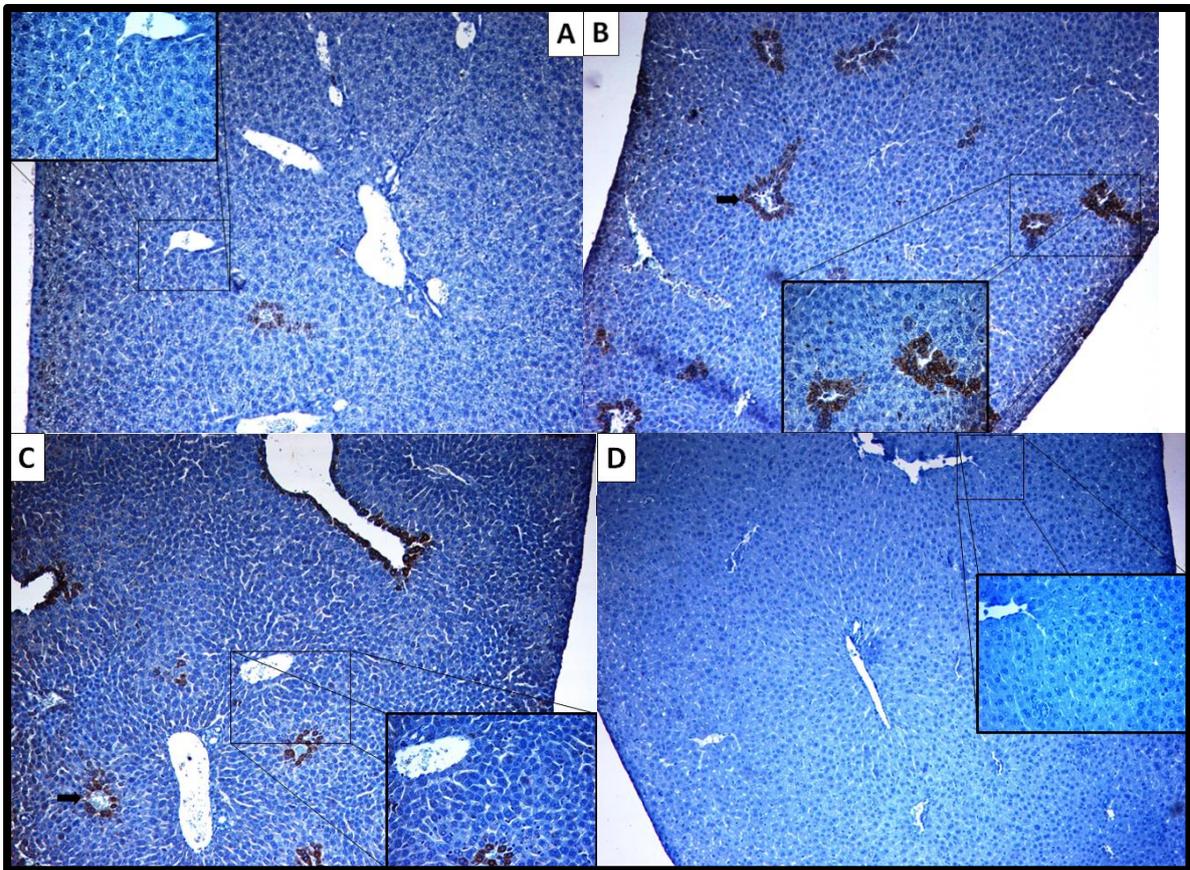
A análise por imunohistoquímica do tecido hepático dos animais tratados com irinotecano revelou hiperexpressão de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), iNOS ( $p < 0,05$ ) e Nitrotirosina ( $p > 0,05$ ) comparado com o controle. Animais pré-tratados com NAC 10mg/Kg mostraram diminuição das expressões de IL-1 $\beta$  e iNOS. A análise de IL-1 $\beta$  mostrou marcação nas células de kupffer com padrão granular citoplasmático periportal moderado e centrolobular. Houve discreta marcação nos hepatócitos (**Tabela 2, Figura 18**, seta preta). A imunoexpressão de iNOS foi evidenciada nos hepatócitos, células mononucleares do espaço porta e nas células de Kupffer, com padrão granular centrolobular (**Tabela 2, Figura 19**, seta preta). A imunoexpressão de nitrotirosina restringiu-se aos microabscessos difusamente (**Tabela 2, Figura 20**, seta preta). Um controle negativo foi incluído e representa uma amostra do fígado onde o anticorpo foi substituído por PBS/BSA a 5% e onde nenhuma imunoexpressão foi detectada. (**Figuras 18, 19 e 20**, painel D).

**Tabela 2. Escores imunoistoquímicos.** Irinotecano promove aumento da imunomarcção de IL-1 $\beta$ , iNOS e Nitrotirosina no tecido hepático. Pré-tratamento com NAC 10mg/Kg inibe marcação de IL-1 $\beta$  e iNOS. Os valores estão expressos como mediana (mínimo-máximo). \*p<0,05 vs Salina; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs Salina.

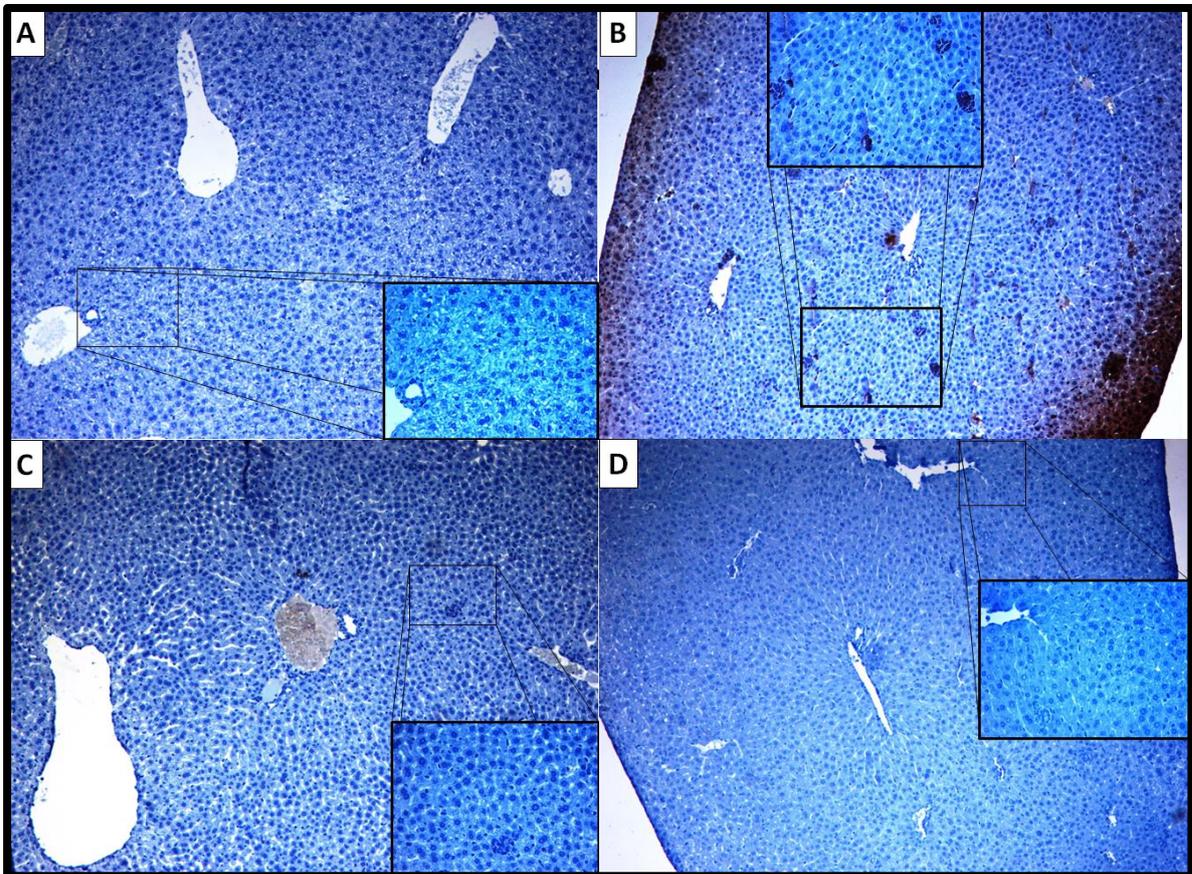
Grupos experimentais (N = 8)	Escores imunoistoquímicos		
	Semana 7		
	IL-1 $\beta$	iNOS	Nitrotirosina
Salina	2 (0 - 2)	1 (1 - 3)	0 (0 - 0)
IRI (50 mg/kg)	3 (2 - 3)*	3 (3 - 3) *	1 (0 - 2)
IRI (50 mg/kg) + NAC (10 mg/kg)	1,5 (0 - 3)#	2 (1 - 3)#	0 (0 - 0)



**Figura 18. Imunoexpressão de IL-1 $\beta$  no fígado.** Irinotecano aumenta a imunoexpressão de IL-1 $\beta$  no fígado. Pré-tratamento com NAC 10mg/Kg inibe a marcação. Nos animais tratados com irinotecano, a análise de IL-1 $\beta$  mostrou marcação nas células de kupffer (**setas pretas, quadro B**) e discreta marcação nos hepatócitos, com padrão granular citoplasmático periportal moderado e centrolobular (**Quadro B**), quando comparados com o grupo salina (**Quadro A**). O pré-tratamento com NAC 10mg/Kg mostrou diminuição dessa marcação (**Quadro C**). O controle negativo corresponde a uma amostra de tecido hepático onde o anticorpo foi substituído por PBS/BSA e nenhuma imunoexpressão foi detectada (**Quadro D**). Magnificação 40X.



**Figura 19. Imunoexpressão de iNOS no fígado.** Irinotecano aumenta a imunoexpressão de iNOS no fígado. Pré-tratamento com NAC 10mg/Kg inibe a marcação. Nos animais tratados com irinotecano, a análise de iNOS mostrou marcação nos hepatócitos, células mononucleares do espaço porta e nas células de Kupffer, com padrão granular centrolobular (**seta preta, quadro B**), quando comparados com o grupo salina (**Quadro A**). O pré-tratamento com NAC 10mg/Kg mostrou diminuição dessa marcação (**seta preta, Quadro C**). O controle negativo corresponde a uma amostra de tecido hepático onde o anticorpo foi substituído por PBS/BSA e nenhuma imunoexpressão foi detectada (**Quadro D**). Magnificação 40X.



**Figura 20. Imunoexpressão de Nitrotirosina no fígado.** Nos animais tratados com irinotecano, a análise de iNOS mostrou marcação nos hepatócitos, células mononucleares do espaço porta e nas células de Kupffer, com padrão granular centrolobular (**seta preta, quadro B**), quando comparados com o grupo salina (**Quadro A**). O pré-tratamento com NAC 10mg/Kg mostrou diminuição dessa marcação (**seta preta, Quadro C**). O controle negativo corresponde a uma amostra de tecido hepático onde o anticorpo foi substituído por PBS/BSA e nenhuma imunoexpressão foi detectada (**Quadro D**). Magnificação 40X.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foram mostradas claras evidências que sustentam a ideia inicial de que a N-acetilcisteína (NAC) pudesse funcionar como um agente protetor da esteatohepatite não alcoólica NASH), particularmente aquela utilizada como ferramenta nesta investigação, a esteatohepatite induzida pelo agente antineoplásico irinotecano.

Uma das primeiras etapas em estudos experimentais que envolvem efeitos protetores de fármacos em patologias que possuam a sua correspondente humana é a utilização de um modelo experimental fidedigno que consiga reproduzir, se não na totalidade, mas pelo menos em sua maioria os eventos presentes na similar patologia humana. Nesse sentido, Costa e colaboradores (2014) desenvolveram recentemente no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer da UFC - LAFICA um modelo de esteatohepatite induzido por irinotecano em camundongos que permitiu estudar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da doença, como a participação de IL-1 $\beta$ , TLR4, iNOS e translocação bacteriana portal.

Tendo por base o modelo supramencionado os resultados iniciais da presente investigação mostram que se conseguiu reproduzir em sua plenitude os eventos presentes na esteatohepatite e descritos no modelo original, cuja avaliação foi baseada em critérios clínicos, laboratoriais, imunoistoquímicos e na descrição dos critérios Kleiner (2005). Dessa forma foi utilizado o irinotecano na dose de 50mg/Kg i.p. três vezes por semana ao longo de sete semanas, momento em que os animais foram sacrificados para avaliação dos diversos parâmetros.

Para se chegar a essa dose do quimioterápico utilizado em nosso modelo, Costa e colaboradores realizaram experimentos com doses escalonadas de irinotecano com o objetivo de definir qual induziria a esteatohepatite nos seus parâmetros clínicos, histológicos, imunoistoquímicos e de stress oxidativo, e com uma taxa de mortalidade aceitável.

Como não havia ainda na literatura, um modelo desenvolvido de esteatohepatite induzida por irinotecano em camundongos, as doses iniciais propostas, na tentativa de causar efeito hepatotóxico (25, 50, 75 e 100mg/Kg), foram estabelecidas baseado no estudo de Melo e colaboradores (2008), que desenvolveram um modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano na dose

de 75mg/Kg/dia por 4 dias. Neste estudo o irinotecano causou diarreia significativa, alterações histopatológicas no intestino (infiltração de células inflamatórias, perda da arquitetura de criptas e encurtamento das vilosidades), aumento da atividade tecidual de MPO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC e imunomarcação intestinal para TNF- $\alpha$ .

Pelo fato das doses de 75 e 100mg/Kg apresentarem uma mortalidade muito elevada e a dose de 25mg/Kg não induzir esteatohepatite, foi escolhido como dose padrão 50mg/Kg, que induziu esteatohepatite nos critérios propostos com uma mortalidade aceitável.

Outra questão abordada foi qual via de administração do quimioterápico poderia ser mais efetiva na indução da esteatohepatite no modelo reproduzido neste estudo. Embasado também nos achados do modelo de Melo e colaboradores, em que a via intraperitoneal havia causado um quadro de mucosite intestinal conforme visto na prática clínica, deduziu-se que esta via também poderia ser efetiva no desenvolvimento do modelo de esteatohepatite.

Neste mesmo modelo foi evidenciado que os critérios histopatológicos e o escore de avaliação de esteatohepatite (NAS) utilizados na avaliação de NASH em seres humanos puderam ser extrapolados para o modelo animal. No entanto, apesar de induzir esteatohepatite, os escores encontrados nesse experimento foram, de uma forma geral inferiores aos seus referenciais em humanos. Uma explicação plausível para essa diferença seria o fato do modelo de esteatohepatite desenvolvido em camundongos ser um modelo de curso agudo (sete semanas) em fígado previamente sadio quando comparado ao mesmo evento em humanos, o que impede uma evolução mais prolongada e completa do desenvolvimento de NASH em todas as suas etapas, desde a infiltração gordurosa até o dano hepático com fibrose e cirrose, como ocorre em seres humanos (Pessayre et al, 2007).

Apesar de essa patologia depender de eventos prévios que culminam com um fígado já doente, este modelo padronizado pode ser utilizado em outros cenários mais propícios ao desenvolvimento da esteatohepatite, como animais obesos, mais velhos ou previamente esteatóticos induzidos por dietas aterogênicas. Dessa forma poderá ser evidenciado com mais intensidade as características histológicas após a agressão pelo antineoplásico.

A escolha de camundongos Swiss para a realização desse experimento baseou-se na sua semelhança imunológica e fisiológica com humanos (Wade, Dale, 2005), no histórico de trabalhos anteriores utilizando os mesmos animais em

modelos de esteatohepatite induzidas por outros estímulos, como dieta rica em lipídios, álcool ou polifenol (de Oliveira, 2006; Ronis, 2005; Lai, 2012) e no modelo citado de esteatohepatite desenvolvido por Costa e colaboradores (2014).

O despertar para a necessidade do desenvolvimento deste modelo de esteatohepatite foi desencadeado, entre outras razões, pela constatação do uso crescente de quimioterapia pré-operatória com combinações contendo irinotecano para as resseções hepáticas no câncer colorretal metastático e pelos resultados de pacientes que evoluíam no pós-operatório com diminuição da reserva funcional e insuficiência hepática, aumentando a morbimortalidade do procedimento, traduzido em resultados clínicos adversos após a cirurgia hepática (Vauthey et al, 2006).

O racional para se estudar o efeito da N-acetilcisteína na esteatohepatite induzida por irinotecano foi baseado no fato de que a literatura registra inúmeras publicações que demonstram uma atividade protetora da NAC e seus derivados em diversos tipos de agressões hepáticas induzidas por vários tipos de estímulo, tais como stress oxidativo, dano por mecanismo de isquemia e reperfusão, hepatite, intoxicação por acetaminofen, alcoolismo crônico e intoxicação por metais pesados (Millea et al, 2009; de Oliveira, 2006; Ronis, 2005; Lai, 2012).

Neste contexto, De Oliveira e colaboradores (2006) mostraram, em um modelo de esteatohepatite induzida por dieta deficiente em colina em ratos Wistar, o efeito hepatoprotetor da S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) oral, um S-nitrosotiol (RSNO) relativamente estável e um potente vasodilatador, sintetizado a partir da S-nitração do tiol correspondente livre, no caso a NAC (Ratziu, 2002).

Seguindo a mesma linha de raciocínio, Lai e colaboradores (2012) mostraram em outro modelo de esteatose em ratos Sprague-Dawley induzido intraperitonealmente por PCB-126, um polifenol policlorado, em doses escalonadas, que a dieta suplementada oralmente com a NAC ao longo de duas semanas reduziu o percentual de lipídio hepático de uma forma geral e melhorou a regulação negativa da expressão de CD36, um receptor escavenger envolvido na regulação da captação de ácidos graxos do fígado, exercendo uma ação protetora independente dos níveis de glutathiona hepática.

Outro dado que reforçou a escolha da N-acetilcisteína neste modelo foi que, tanto os mecanismos de lesão celular pelo agente antineoplásico, sugeridos pelos autores no modelo original quanto os mecanismos hepatoprotetores atribuídos à NAC apresentados nos outros modelos de lesão hepática, parecem ser

semelhantes. Partindo desse entendimento vários modelos de esteatohepatite em animais foram apresentados e utilizados na prática experimental com o intuito de explicar mecanismos fisiopatológicos e possíveis drogas hepatoprotetoras.

Baseado nos modelos desenvolvidos na pesquisa experimental, os resultados com a NAC puderam ser testados na prática médica através de ensaios clínicos. Tomando por base esse raciocínio, a ideia com os resultados desse estudo, é que após a verificação do possível efeito protetor da NAC na esteatohepatite pelo irinotecano, esta possa vir também a ser futuramente utilizada em condutas clínicas.

Nesta mesma linha de pensamento, Smilkstein e colaboradores (1988) já haviam analisado o uso de NAC oral como antídoto para o envenenamento por acetaminofen em 2540 pacientes tratados com uma dose oral inicial de 140mg/Kg, seguido de 70mg/Kg a cada quatro horas até completar 17 doses. Os autores evidenciaram que, após o início do uso da NAC dentro das 16 primeiras horas da overdose, não houve nenhuma morte relacionada com a toxicidade por acetaminofen. E ao ser iniciada dentro das primeiras 8 horas da ingestão do acetaminofen, a NAC apresentou um efeito protetor independente da dose de acetaminofen.

Analisando inicialmente os resultados encontrados no presente estudo, os dados pré-clínicos mostraram que a piora da sobrevida foi evidente nos animais tratados apenas com irinotecano, quando comparados com o grupo salina. Esta mortalidade significativa, em mais da metade dos animais, provavelmente seja um reflexo direto do efeito colateral da droga e de suas complicações decorrentes do uso contínuo ao longo do experimento. A melhora da mortalidade no grupo pré-tratado com NAC, nas doses de 10 e 100 mg/Kg reforça a ideia inicial de que a NAC possui efeito direto na sobrevida desses animais através da inibição desses efeitos colaterais. Vauthey e colaboradores (2006) também mostraram um aumento da morbimortalidade dos pacientes submetidos à quimioterapia com irinotecano, principalmente após serem submetidos à ressecções hepáticas maiores. A taxa de mortalidade desse experimento, no entanto, foi elevada mesmo sem que os animais tivessem sido submetidos a qualquer insulto cirúrgico.

Um dado intrigante é que, embora a mortalidade tenha sido reduzida, a perda de peso causada pelo irinotecano em comparação ao grupo controle não foi inibida pelo uso da NAC nas três doses neste estudo. O irinotecano causou uma perda de peso significativa a partir da terceira semana de tratamento, mantendo

essa diferença ponderal até o final do experimento, sem nenhuma interferência do pré-tratamento com NAC nas três doses. Apesar da mucosite intestinal não ter sido o foco desse experimento, a elevação dos escores de diarreia nos animais tratados com irinotecano nas primeiras semanas sugere que esta complicação possa ter ocorrido (dados não apresentados). E embora se acredite que as complicações ocorram por mecanismos semelhantes, não foi evidenciada redução desses escores nos animais pré-tratados com NAC.

A esteatohepatite e a mucosite intestinal são provavelmente eventos associados às taxas de morbimortalidade evidenciadas neste estudo. A perda da barreira da mucosa intestinal, redução da superfície absorptiva do intestino, aumento da motilidade intestinal, distúrbios da absorção de eletrólitos e fluidos e aumento da colonização por agentes infecciosos levam a um quadro de diarreia, espoliação, perda de peso e contribuem para um aumento da mortalidade dos animais (ENGELKING et al, 1996). Este fenômeno é observado logo nos primeiros dias de tratamento mostrando um efeito colateral mais precoce do que a esteatohepatite.

A mucosite intestinal, como efeito colateral do irinotecano já havia sido anteriormente citado em outros estudos experimentais do nosso laboratório. O estudo da mucosite induzida por irinotecano realizado por Lima-Junior (2012) mostrou um aumento dos escores de avaliação de diarreia em camundongos com impacto direto na mortalidade dos animais, apesar deste modelo apresentar um curso mais agudo, de apenas cinco dias. O modelo de mucosite intestinal induzido pelo irinotecano de Melo e colaboradores (2008) também demonstrou seu impacto na mortalidade dos animais.

Outro efeito colateral comumente encontrado com o uso dos antineoplásicos é a leucopenia, decorrente da mielotoxicidade da droga e consequente baixa da produção de elementos medulares. Esta leucopenia, levando a uma queda da imunidade celular facilita o surgimento de infecções oportunistas, contribuindo, juntamente com as outras complicações do tratamento, para o aumento da morbimortalidade das espécies em estudo. Os animais do grupo tratado com irinotecano apresentaram uma leucopenia significativa em relação ao grupo salina, conforme similaridade na prática clínica. Entretanto, diferente do que imaginaríamos encontrar neste experimento ao término da sétima semana de tratamento, não houve diferença estatística na contagem de leucócitos no sangue periférico dos animais tratados com irinotecano, em relação aos grupos pré-tratados

com NAC. Uma possível justificativa para este resultado seria a recuperação medular daqueles animais que sobreviveram à leucopenia ao longo das sete semanas ou da incapacidade de recuperação daqueles animais que possivelmente não toleraram a leucopenia, além de outros efeitos colaterais, indo a óbito.

Apesar de não ter se conseguido reproduzir o papel protetor da NAC, este dado corroborou o achado do modelo inicial em que a avaliação da contagem de leucócitos totais no sangue revelou uma leucopenia significativa que ocorreu na primeira e na sétima semanas, intercalados por um período de recuperação parcial do leucograma quando comparado ao controle.

Outro dado clínico relevante encontrado no experimento foi o aspecto macroscópico do fígado, com sua coloração amarelada e o aumento do seu peso úmido no grupo de animais tratados com irinotecano, quando comparados com o grupo salina e a sua inibição nos animais pré-tratados com NAC nas doses de 10 e 100mg/Kg. O aumento do peso úmido e a coloração amarelada do fígado, o chamado fígado amarelo (“yellow liver”), são características morfológicas de um fígado com esteatohepatite, decorrentes de acúmulo de gordura nos hepatócitos, infiltrado inflamatório e, nos casos mais avançados, presença de fibrose (KLEINER et al, 2005). Entretanto essa clássica alteração macroscópica do fígado não foi um achado comum em nosso experimento não tendo, portanto relevância estatística.

Indiscutivelmente um dos estudos mais relevantes sobre esteatohepatite não alcoólica e que padronizou seus critérios histológicos foi o estudo de Kleiner e colaboradores (2005). Nele os autores idealizaram e validaram um sistema de escore semiquantitativo baseado em características utilizadas em ensaios clínicos e estudos de história natural de NAFLD. No sistema proposto, as lesões histologicamente distintas de NAFLD foram avaliadas e somadas para fornecer um escore de atividade de NASH (NAS), em contraste com métodos que dependem muito mais da avaliação agregada para a severidade do grau ou que criam categorias de doença (BRUNT et al, 1999; YOUNOSSI et al, 1998).

Essa padronização teve uma razoável e boa reprodutibilidade interobservador em ambos os casos adultos e pediátricos, e foi equivalente a estudos de reprodutibilidade interobservador relatados previamente em doença hepática gordurosa (BRUNT et al, 1995; BEDOSSA et al, 1988). Por essas razões, na avaliação histológica desse experimento foi optado por utilizar os critérios de

Kleiner por se tratar de um escore já reproduzido e validado em modelo animal e na qual poderia ser comparado de forma fidedigna com os achados em humanos.

Na avaliação dos critérios histológicos de Kleiner no presente estudo, tanto a inflamação lobular quanto a esteatose e a balonização foram visualizadas nos fígados dos animais tratados com irinotecano. Na análise estatística seus escores foram significativamente diferentes do grupo controle, configurando um critério de reprodução do modelo de esteatohepatite.

A característica histológica de NASH que parece ser a mais significativa na determinação do diagnóstico de esteatohepatite é a balonização. A balonização ou tumefação hepatocítica é um tipo de alteração na qual as células tornam-se alargadas, edemaciadas e o citoplasma torna-se irregularmente amontado com vacúolos esteatóticos. Na fase inicial da doença as células balonizadas são vistas mais frequentemente na zona 3, próxima às veias hepáticas. No decorrer do dano ou em casos mais severos de esteatohepatite elas podem perder essa distribuição zonal (KLEINER, 2012).

Brunt e colaboradores (2011) relataram que, a despeito do NAS final, a balonização foi praticamente ausente nos casos de não NASH (95,7%) e borderline para NASH (62,8%), e francamente presente nos casos de NASH confirmados (99,6%) ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, quando foram comparados os três critérios histológicos avaliados neste experimento, a balonização foi o único achado que não esteve presente em todos os casos de esteatohepatite. Nos casos borderline para esteatohepatite a balonização pode se apresentar de forma atenuada na zona 1 ou mesmo ausente, principalmente quando associado à fibrose e/ou cirrose. Portanto, diante de possíveis casos borderline para esteatohepatite nesses animais que não apresentaram balonização poderia ser justificada essa falta de predominância completa. Embora sua identificação possa ser útil nesses casos, a presença de fibrose no fígado não foi avaliada neste experimento por não fazer parte dos critérios clássicos de NASH.

Apesar da balonização acentuada não ter sido um achado frequente nos animais pré- tratados com NAC nas três doses, a análise estatística isolada não mostrou diferença quando comparados com os escores do grupo controle e do grupo tratado apenas com irinotecano.

A inflamação lobular foi o achado histológico mais evidente e com maior significância estatística entre os animais que desenvolveram NASH, quando

comparados com o grupo controle. E contrariamente à balonização e à esteatose, a NAC na dose de 1000mg/Kg protegeu de maneira significativa esse fenômeno mostrando que a N-acetilcisteína parece exercer efeito protetor quando avaliamos os critérios histológicos separadamente. Apesar de se tratar de um evento fundamental na progressão de esteatose para esteatohepatite, a inflamação pode variar consideravelmente de intensidade. As células do infiltrado inflamatório consistiam principalmente de neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares. Seu padrão é predominantemente lobular, mas à medida que a doença progride a inflamação portal também se torna mais proeminente. A inflamação lobular pode se tornar tão severa na zona 3 que dificulta a distinção entre os processos inflamatórios da área perivenulas da área portal (BRUNT et al, 2011).

Além de achados histológicos, o ensaio para dosagem de mieloperoxidase pode ser outra forma de evidenciar o evento inflamatório no hepatócito, visto que a atividade dessa enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos é utilizada como marcador da presença de polimorfonucleados no tecido inflamado.

Uma área de concordância geral no estudo da NASH é que a esteatose é um pré-requisito necessário para o dano inflamatório subsequente. O modelo de “two hits” (dois eventos) foi proposto por Day e colaboradores (1998), na qual as alterações na homeostase lipídica associada com obesidade, resistência à insulina e ruptura de adipocinas resultam em esteatose e constitui o “primeiro evento”. A esteatose sensibiliza o fígado para o “segundo evento”, resultando em dano hepatocelular, inflamação e fibrose.

Tomando por base o modelo dos “dois eventos”, se compararmos o terceiro critério histológico desse experimento, será visto que os animais que desenvolveram esteatohepatite com o uso do irinotecano, apresentaram escores de esteatose estatisticamente diferentes do grupo controle. Quando comparados os grupos pré-tratados com NAC nas três doses, a incidência de esteatose não foi estatisticamente diferente dos animais tratados exclusivamente com irinotecano, enfatizando a incapacidade da NAC em inibir a esteatose.

Adicionalmente, para ser realizada a avaliação do efeito da NAC na etapa de esteatose, este experimento utilizou outro parâmetro, a dosagem de lipídios totais no fígado. A semelhança dos valores encontrados nos grupos tratados com irinotecano, pré-tratados ou não com NAC sugere que, embora existam evidências

do efeito hepatoprotetor na segunda etapa da NASH, a NAC não parecer influenciar na etapa de esteatose.

A esteatose no modelo de NAFLD normalmente se apresenta em grau significativo e na etapa inicial na doença, quando a fibrose é mínima ou ausente. Sua distribuição é tipicamente visualizada na zona 3. À medida que a doença progride a esteatose pode perder sua distribuição zonal clássica. (KLEINER, 2012). O padrão de esteatose encontrado no estudo foi microvesicular, apresentando núcleo central, circundado por pequenos depósitos de lipídios, que em alguns momentos coalesciam, dando a impressão de aspecto macrovesicular.

Embora nenhum estudo tenha investigado especificamente o papel da NAC na etapa de esteatose apenas, de Oliveira e colaboradores (2008) evidenciaram que a sua combinação com a metformina mostrou-se promissora no tratamento da NASH em humanos através da redução de lipídio hepatocelular. A explicação se dá pela teoria de que o stress oxidativo e a resistência à insulina são possivelmente os mecanismos mais envolvidos na patogênese da NASH.

Baumgardner e colaboradores (2008) corroboraram a observação feita por De Oliveira e cols na qual a NAC só possui efeito hepatoprotetor no segundo evento ("second hit"), não influenciando na etapa da esteatose ("first hit"). Em um modelo animal de esteatohepatite induzido por dieta rica em lipídios, a esteatose hepática não foi influenciada pela suplementação dietética com NAC. No entanto o escore patológico do fígado, incluindo a fibrose, foi significativamente menor. Além dos critérios histológicos, nesse experimento a NAC reduziu a dosagem de ALT sérica e o stress oxidativo, e preveniu o aumento do citocromo P450 e da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ .

A ALT e a AST são testes de screening úteis na detecção do dano hepático (KAPLOWITZ et al, 1992). Elas são encontradas nos hepatócitos e não podem se difundir além da célula em condições fisiológicas. Quando há dano ao hepatócito e conseqüente dano da membrana celular, há extravasamento das enzimas com elevação sérica (ROBINS et al, 1994).

A relação de ALT e NAFLD ainda não foi completamente explicada, mas estudos apoiam um maior nível de ALT como não apenas uma consequência, mas um preditor de desenvolvimento de NASH nesses pacientes (SCHINDHELM et al, 2006). Dessa forma, a redução do nível de ALT pode ser o melhor efeito que seja possível de alcançar na inibição da esteatohepatite.

Partindo dessa premissa, foi realizada a dosagem das enzimas hepáticas ao término da sétima semana, com vistas à detecção de dano hepatocelular e foi evidenciada nos resultados que a elevação significativa, tanto de ALT quanto de AST nos animais tratados com irinotecano, alcançou um dos objetivos do estudo, a reprodução do modelo de esteatohepatite induzida por irinotecano. E que a inibição da elevação das enzimas nos animais pré-tratados com NAC na dose de 10mg/Kg se soma aos achados prévios já citados da hipótese da NAC ser realmente uma droga hepatoprotetora na NASH. Independente dos escores de Kleiner encontrados nesse experimento que sugerem o desenvolvimento de NASH (NAS  $\geq$  5), os animais que desenvolveram outros critérios de esteatohepatite apresentaram na sua grande maioria elevações de ALT e AST, fazendo realmente a pensar no papel dessas enzimas hepáticas como marcadores de esteatose.

Estudos experimentais também aventaram o envolvimento de ALT como marcador de esteatohepatite. Comparado ao modelo de NASH, em outro modelo de hepatotoxicidade induzida por cádmio subcutâneo, Shaikh e colaboradores (1999) evidenciaram que a coadministração de NAC nos ratos diminuiu a peroxidação lipídica e protegeu contra a hepatotoxicidade através da normalização dos níveis de ALT e LDH.

Apesar de não ser enquadrado em um modelo de NASH, o modelo de esteatohepatite induzida por álcool desenvolvido por Ronis e colaboradores (2005) mostraram que a ingestão de álcool resultou em esteatose, infiltrado inflamatório, focos de necrose e elevação de ALT sérica, além do aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , do acúmulo hepático de MDA e de hidroxinonenal (HNE), provando que os mecanismos patogênicos no fígado, desencadeados tanto por álcool quanto por outros estímulos, são semelhantes.

Ao comparar padrões histopatológicos com dados laboratoriais na esteatohepatite, Kleiner e Brunt (2012) mostraram que nos fígados com NAS $\leq$ 4, mas com diagnóstico confirmado de esteatohepatite, os altos valores de ALT isolados foram correlacionados como preditores de NASH ( $p=0,003$ ). Esse dado, portanto reforça a teoria de que não só os critérios de Kleiner, mas todo o conjunto de achados clínicos e histopatológicos deve ser avaliado para determinar um diagnóstico de esteatohepatite.

Como prova dessa teoria, das 934 biópsias hepáticas não cirróticas de pacientes adultos com perfil de NAFLD incluídas no estudo Database ou no trial

PIVENS, 543 (58%) encontraram critérios histológicos para diagnóstico firmado de esteatohepatite. Neste subgrupo, em apenas 75% dos casos o NAS foi  $\geq 5$ . Por outro lado, das 208 biópsias que foram diagnosticados como sem esteatohepatite, 14 tinham NAS  $\geq 5$ . Esses resultados ressaltam o fato de que os critérios diagnósticos para esteatohepatite e o escore de lesões estão relacionados, mas também podem fornecer resultados diferentes.

Dentro das hipóteses aventadas da fisiopatologia da esteatohepatite, o envolvimento de mediadores inflamatórios exerce papel de importância no desencadeamento dos fenômenos que culminam com a NASH (PIHLAJAMÄKI et al, 2012; TILG et al, 2011; KAMARI et al, 2011; SINGAL et al, 2011).

Já é de amplo conhecimento que a ativação do TNF- $\alpha$  com consequente sinalização da IL-1 $\beta$  parece possuir papéis fundamentais no processo inflamatório de várias patologias como Doença de Crohn, artrite reumatoide e psoríase através da migração de neutrófilos, bem como estimulação de leucócitos, células endoteliais e fibroblastos para a produção de fatores quimiotáticos (DINARELO et al, 2012).

Este experimento utilizou como ferramenta de avaliação do papel da IL-1 $\beta$ , a sua dosagem no tecido hepático e a expressão no estudo imunoistoquímico em cortes de fígado. Conforme resultados, os animais que desenvolveram esteatohepatite mostraram concentrações mais elevadas de IL-1 $\beta$  quando comparadas ao grupo controle, reforçando a hipótese de que realmente essa citocina exerça papel pivotal na gênese da esteatohepatite. Na análise do perfil imunoistoquímico o grupo que recebeu apenas irinotecano a IL-1 $\beta$  marcou difusamente nas células de kupffer, nos hepatócitos periportais e nos microabscessos, com um padrão granular citoplasmático.

Corroborando a hipótese de que a NAC possui efeito inibitório no modelo descrito, nos grupos tratados com NAC nas doses de 10 e 1000mg/Kg a dosagem de IL-1 $\beta$  no tecido hepático não mostrou diferenças estatísticas quando comparada ao grupo controle. Por mostrar melhor proteção na dosagem hepática dessa citocina, realizamos o estudo imunoistoquímico apenas do grupo pré-tratado com NAC na dose de 10mg/Kg. Novamente achamos resultados promissores. A análise mostrou apenas marcação nas células de kupffer em menor intensidade quando comparado com o grupo do irinotecano, porém com o mesmo padrão granular citoplasmático periportal moderado e centrolobular. Não houve marcação nos hepatócitos.

Achados na literatura reforçam a ideia de que a sinalização excessiva de IL-1 induz ao processo inflamatório no fígado, portanto exercendo importante papel em modelos murinos de NAFLD e fibrose hepática (FAN et al, 2003; BARONI et al, 1996; BOROS et al, 1999).

Isoda e colaboradores (2004) mostraram que camundongos nocautes para IL-1Ra desenvolveram NAFLD severa e fibrose portal com importante infiltrado inflamatório após 20 semanas de dieta aterogênica. Kamari e colaboradores (2001) relataram que a deficiência de IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  reduziu significativamente a progressão da esteatose para esteatohepatite e fibrose em um modelo de esteatohepatite em camundongos induzido por dieta aterogênica. O depósito de colesterol hepático aumentado enfatizou o papel dominante da inflamação mediada por IL-1 $\alpha$  no desenvolvimento da esteatohepatite.

Seguindo a linha de pensamento sobre o envolvimento de citocinas neste modelo de esteatohepatite, seria de se esperar que a concentração no tecido hepático de TNF- $\alpha$  também estivesse elevada, pois há um racional forte de que essa citocina possui um papel chave na mediação da injúria hepática, dada a sua capacidade de indução de inflamação e apoptose em hepatócitos sob condições de stress oxidativo (DAY et al, 2006; VIDELA et al, 2004). No entanto, quando foi realizada a dosagem de TNF- $\alpha$  no tecido hepático não foram encontradas diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados com irinotecano, pré-tratados ou não com NAC. Como o TNF- $\alpha$  é a primeira citocina a ser estimulada na cascata inflamatória, e a partir dela outras citocinas são também sinalizadas, como a IL-1 $\beta$ , para culminar com a esteatohepatite, supõe-se que sua elevação ao término do experimento já tenha sido depletada, não sendo, portanto possível a detecção de elevação na sua dosagem.

Diferente dos dados encontrados, Manco e colaboradores (2007) mostraram que a dosagem sérica elevada de TNF- $\alpha$  em pacientes portadores de NAFLD está intimamente relacionada com um NAS  $\geq 5$  e que o TNF- $\alpha$  sozinho pode acuradamente ser um marcador específico de NASH. No entanto pacientes portadores de outras patologias associadas à NASH, como doença inflamatória intestinal e câncer podem cursar com aumento de TNF- $\alpha$ , gerando um questionamento sobre falso positivo na análise.

Há também relatos contrastantes na literatura sobre o TNF- $\alpha$  e seu papel na esteatohepatite. Mandato et al (2005) não evidenciaram aumento significativo nos

níveis de TNF- $\alpha$  em crianças com hipertransaminasemia e achados ultrassonográficos de esteatohepatite (hiperrecogenicidade), quando comparadas com crianças sem alterações de enzimas hepáticas ou ultrassonográficas. No entanto esse estudo não correlacionou os parâmetros clínicos e radiológicos, com achados histológicos de esteatohepatite.

O stress oxidativo é citado como o possível mecanismo central do dano hepatocelular na NASH, associado ao acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, aparecimento de disfunção mitocondrial e elevação de citocinas pró-inflamatórias. Como dito previamente, considerado um dos melhores candidatos para o “segundo evento”, visto que explica todas as características histológicas reconhecidas da doença (MEHTA et al, 2002).

Com o objetivo de avaliar o papel do stress oxidativo nesse modelo de esteatohepatite, foi utilizada a dosagem de malonaldeído (MDA), um biomarcador geral de peroxidação lipídica, e a análise imunistoquímica da 3-nitrotirosina, um bioproduto do peroxinitrito.

Embora nossa teoria reforce a importância do stress oxidativo na patogênese da NASH, não foram evidenciadas alterações significativas na dosagem de MDA ao término da sétima semana, como demonstrado anteriormente por Costa e colaboradores (2014). No modelo citado, os picos de elevação do malonaldeído ocorreram na primeira e na quinta semanas de experimento com queda ao término da sétima semana, explicando que há estresse oxidativo nas primeiras semanas e se mantendo até a quinta semana de tratamento com irinotecano, vindo a diminuir suas dosagens ao término do experimento.

Embora o papel oxidativo neste experimento não tenha ficado esclarecido através da dosagem de MDA, a literatura reforça teoria do envolvimento do stress oxidativo na NASH. Thong-Ngam et al (2007) mostraram a importância do stress oxidativo na NASH e na sua progressão de esteatose em esteatohepatite e fibrose/cirrose através da oxidação de ácidos graxos livres citotóxicos levando a uma regulação positiva de citocinas, indução da enzima 2E1 do citocromo p450 (CYP2E1), depleção da concentração de antioxidantes e geração de bioprodutos, entre eles o MDA.

Seguindo a avaliação sobre o envolvimento do stress oxidativo, a marcação de 3-nitrotirosina nos leva a sugerir a hipótese de que após a etapa de esteatose, o aumento da peroxidação lipídica nos hepatócitos gerando um

desequilíbrio na produção de ROS e peroxinitrito, aumentando a liberação de produtos da peroxidação lipídica e citocinas, possam ser os desencadeadores das lesões hepáticas da NASH.

Embora os achados levem a sugerir a relevância do stress oxidativo na esteatohepatite, o papel dos antioxidantes não está claramente definido. Apesar de não ter sido estudado neste experimento a sua participação, inúmeros trabalhos mostram o aumento dos marcadores oxidativos e uma diminuição dos níveis de antioxidantes diante de um quadro de NAFLD (KOTEISH et al, 2001; LETTERON et al, 1996; GRATAGLIANO et al, 2000).

Recentemente, dados encorajadores no uso de vitamina E isolada foram obtidos no estudo PIVENS (SANYAL et al, 2010). 247 pacientes não diabéticos com diagnóstico histológico de NASH foram randomizados para receber pioglitazona 30mg/dia, vitamina E 800UI/dia ou placebo. Após 96 semanas de tratamento apenas os pacientes tratados com vitamina E mostraram melhora estatisticamente significativa dos parâmetros histológicos de esteatohepatite comparados com o grupo placebo.

O uso de antioxidantes associados com sensibilizadores de insulina tem mostrado efeito protetor encorajador, visto que a insulina exerce um papel crucial na patogênese na NAFLD. Bugianesi e colaboradores (2005) randomizaram 110 pacientes com NAFLD não diabéticos para receberem 2d/dia de metformina, vitamina E ou dieta redutora de peso. Ao final de 12 meses de tratamento, o grupo que utilizou metformina foi superior à vitamina E ou dieta redutora de peso na normalização das enzimas hepáticas (56% vs. 20%  $p=0,0006$ ) e foi um preditor independente para a normalização de ALT (OR 6,95% CI:2-17;  $p=0,0011$ ).

O óxido nítrico (NO) pode agir como um potente inibidor da reação em cadeia da peroxidação lipídica, varrendo radicais livres e inibindo muitos desencadeadores, como enzimas peroxidases. Espera-se que o excesso de NO exerça um efeito protetor contra a peroxidação lipídica, enquanto que o excesso de  $O_2^-$  ou concentrações equimolares de NO e  $O_2^-$  induzam a peroxidação lipídica. Dessa forma, o balanço entre NO e  $O_2^-$  pode ter importantes implicações na NAFLD, visto que o stress oxidativo exerce um papel essencial no início e/ou propagação da doença.

A manutenção da função normal da mitocôndria é essencial para a regeneração hepática. Portanto qualquer fenômeno que curse com disfunção

mitocondrial no fígado pode contribuir para o dano hepático, e embora a iNOS seja necessária para a regeneração hepática, o excesso de NO pode causar dano no DNA, levando ao acúmulo de p53, p21Cip1 e inibição do ciclo celular. Somado a isto, a esteatohepatite pode causar proliferação celular defeituosa através de alterações da via do NF- $\kappa$ B. A produção de NO via iNOS pelas células de Kupffer podem exercer papel na ativação de NF- $\kappa$ B nessas células e liberação subsequente de mediadores citotóxicos, como o TNF- $\alpha$ . De fato, estudos recentes têm mostrado que a ativação da NF- $\kappa$ B em macrófagos é mediada, pelo menos em parte, pelas espécies reativas de nitrogênio derivadas de NO (ONOO-) (MATATA et al, 2002).

Em fígados com esteatohepatite a imunomarcção para iNOS é habitualmente evidenciada através de um sinal positivo no citoplasma do hepatócito ao redor da veia central (HA e CHAE, 2010). O sinal é observado primariamente nas áreas de vacuolização e mais forte nos hepatócitos e macrófagos vacuolizados. Apesar de marcar nos fígados normais, o sinal é bem mais baixo. À semelhança do padrão descrito, no grupo do trabalho tratado com irinotecano a iNOS marcou intensamente nos hepatócitos, com um padrão granular centrolobular, além de células mononucleares do espaço porta e leve a moderado nas células de Kupffer. No grupo pré-tratado com NAC 10mg/Kg, a iNOS marcou moderadamente na região centrolobular nos hepatócitos e com rara marcação das cels kupffer. Em ambos os grupos não houve marcação no espaço porta.

Avaliando a forte imunomarcção para iNOS nos animais tratados com irinotecano neste experimento, pode ser aventado que a sua indução no fígado esteja correlacionada com alterações gordurosas e sua expressão regulada positivamente pelo stress oxidativo.

Dados da literatura dão conta de que a imunoexpressão de nitrotirosina costuma estar difusamente localizada ao redor dos hepatócitos na zona periportal dos ácinos e em algumas células na região sinusoidal que lembram células de Kupffer ou células esteladas, nos fígados esteatóticos (HA e CHAE, 2010). No entanto, a avaliação aqui realizada evidenciou imunomarcção apenas nos microabscessos localizados difusamente no parênquima hepático, evento este inibido na sua totalidade no grupo pré-tratado com NAC na dose de 10mg/Kg, apesar de não mostrar significância estatística.

O achado do experimento de que um acúmulo intra-hepático anormal de nitrotirosina está associado com a severidade histológica da NASH, sugere

novamente que o dano oxidativo associado ao NO possa exercer papel significativo nesta patogênese. Conforme demais parâmetros avaliados, a NAC parece confirmar novamente seu papel Inibitório do dano oxidativo.

Tem sido recentemente relatado que ambos os níveis de iNOS e nitrotirosina são significativamente maiores em formas severas de NASH com fibrose hepática do que nas formas leves, sugerindo a importância do NO também no processo de fibrogênese na NASH (GARCIA-MONZON et al, 2000). A expressão de iNOS parece contribuir com a progressão para essa fibrose hepática sem influenciar no depósito de lipídios. Isto reforça a ideia de que a iNOS possa agir como um protetor contra o “segundo evento” na NASH. Entretanto o papel preciso na iNOS no processo de fibrose hepática na NASH ainda precisa ser elucidado.

Enfim, foram encontrados resultados evidentes, nos seus diversos parâmetros, da reprodutibilidade do modelo de esteatohepatite e sua inibição pela N-acetilcisteína. E conforme evidenciado nesse experimento e à semelhança de outros estudos da literatura aqui citados, conclui-se que a NAC, apresenta inúmeras ações. Portanto faz-se necessário estudo pormenorizado com o objetivo de definir quais dos seus mecanismos estão envolvidos na proteção da esteatohepatite.

## 6. CONCLUSÕES

Os dados desse trabalho permitem concluir que:

- A N-acetilcisteína parece exercer efeito protetor na esteatohepatite induzida por irinotecano quando se avalia parâmetros clínicos (sobrevida, peso úmido do fígado), bioquímicos (ALT, AST, dosagem de IL-1 $\beta$  no tecido hepático) e histopatológicos (inflamação lobular, imunexpressão de IL-1 $\beta$  e iNOS)

- Tal efeito protetor parece se dever, entre outros ainda não investigados, à inibição da geração de IL-1 $\beta$  e óxido nítrico.

## REFERÊNCIAS

- ADAM R, DELVART V, PASCAL G, et al: **Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: A model to predict long-term survival.** *Ann Surg* 240:644-657, 2004
- ADAM R, PASCAL G, CASTAING D, et al: **Tumor progression while on chemotherapy: A contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases?** *Ann Surg* 240:1052-1061, 2004
- ADAMS LA, ANGULO P. **Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease.** *Diab Med* 2005; 22: 1129-1133.
- ADAMS LA, SSANDERSON S, LINDOR KD, ANGULO P. **The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies.** *J Hepatol.* v. 41, p. 132-138, 2005
- AHN, K. S. AND AGGARWAL, B. B. **Transcription factor NF- $\kappa$ B: a sensor for smoke and stress signals.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1056, 218–233, 2005
- ALBANO E, MOTTARAN E, VIDALI M, REALE E, SAKSENA S, OCCHINO G, et. al. **Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of nonalcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis.** *Gut.* v. 54, p. 987-993, 2005
- ALBERTS SR, POSTON GJ. **Treatment advances in liver-limited metastatic colorectal cancer.** *Clin Colorectal Cancer.* v. 10, n. 4, p. 258-265, 2011
- ALLEN PJ, KEMENY N, JARNAGIN W, et al: **Importance of response to neoadjuvant chemotherapy in patients undergoing resection of synchronous colorectal liver metastases.** *J Gastrointest Surg* 7:109-117, 2003
- ARKAN, M. C., HEVENER, et al. **IKK-B links inflammation to obesity-induced insulin resistance.** *Nat. Med.* 11, 191–198, 2005
- BARONI, G. S., et al. **Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis.** *Hepatology* 23, 1189–1199, 1996
- BAUMGARDNER JN, et al. **N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis.** *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):1872-9
- BEDOSSA P, et al. **Observer variation in assessment of liver biopsies of alcoholic patients.** *Alcohol Clin Exp Res* 1988;12:173-178
- BEUTLER B, CERAMI A. **The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response.** *Annu Rev Immunol* 1989; 7:625.

BEUTLER BA. **TLRs and innate immunity.** Blood 2009; 113:1399.

BONIZZI, G. AND KARIN, M. **The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.** Trends Immunol. 25, 280–288; 2004

BOROS, D. L., AND WHITFIELD, J. R. **Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni (1999)** *Infect. Immun.* 67, 1187–1193

BOUTIN H, ET AL. **Role of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in ischemic brain damage.** J Neurosci. 2001; 21:5528–5534

BRODY T. **Nutritional biochemistry. 2nd ed.** The United States: Academic Press, 1994: 243-245

BRUNT EM, et al **Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.** Am J Gastroenterol 1999;94:2467-2474

BRUNT EM. **Nonalcoholic steatohepatitis.** Semin Liver Dis 2004;24:3-20.

BRUNT EM, et al. **The NAS and the histopathologic diagnosis of NASH: distinct clinicopathologic meanings.** Hepatology 2011;53:810–820

BUGIANESI E, et al. **A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease.** Am JGastroenterol. 2005; 100:1082–1090

BUTTERY LD, et al. **Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats.** Lab Invest 1994;71:755–64.

CAI D, et al. **Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB.** Nat Med. 2005 Feb;11(2):183-90.

CARSWELL EA, et al. **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72:3666.

CHAMPOUX, J.J. **DNA topoisomerases: structures, function, and mechanism.** Annu. Rev. Biochem. v. 70, p. 369–413, 2001.

CHEN Y, et al. **Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet.** Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan 7;326(1):45-51

CHEN J, LI Q, WANG C, ZHU H, SHI Y, ZHAO G. **Simultaneous vs staged resection for synchronous colorectal liver metastasis: a metaanalysis.** Int J Colorectal Dis. v. 26, p. 191-199, 2011

CHITTURI S, FARRELL G. **Ethiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.** Sem Liv Dis. v. 21, n. 1, p. 27-41, 2001

CORTEZ-PINTO H, MOURA MC, DAY CP. **Nonalcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice.** J Hepatol. v. 44, p. 197-208, 2006.

COSTA MLV et al. **Chemotherapy associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model.** Artigo aceito para publicação na Cancer Chemoter Pharmacol.

CRESPO J, CAYON A, FERNANDEZ-GIL P, et. al. **Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75 in nonalcoholic steatohepatitis patients.** Hepathology. v. 34, p. 1158-1163, 2001

CUNNANE G, et al. **The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis.** Rheumatology. 2001; 40:62–69

DAY CP, JAMES OFW. **Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party?** Hepatol. v. 27, n. 6, p. 1463-1466, 1998

DE OLIVEIRA CP, et al. **Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis.** Hepatol Res. 2008; 38:159–165

DE OLIVEIRA CP, et al. **Oral administration of S-nitroso-N-acetylcysteine prevents the onset of non alcoholic fatty liver disease in rats.** World J Gastroenterol. 2006 Mar 28;12(12):1905-11

DE VRIES N, DE FLORA S. **N-Acetyl-L-Cysteine.** *J Cell Biochem* 1993;17F:S270-S277.

DEWBERRY RM, CROSSMAN DC, FRANCIS SE. **Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) genotype modulates the replicative capacity of human endothelial cells.** Circ Res. 2003; 92:1285–1287

DINARELLO CA. **Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.** Annu Ver Immunol. 2009; 27:519–550

DINARELLO CA, SIMON A, VAN DER MEER JW. **Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases.** Nat Rev Drug Discov. 2012 Aug;11(8):633-52. doi: 10.1038/nrd3800

FAN, J. G et al. **Change of serum endotoxin level in the progress of nonalcoholic steatohepatitis in rats (2003)** *Zhonghua Gan. Zang. Bing. Za. Zhi.* 11, 73–76

FERNANDEZ FG, et al. **Effect of steatohepatitis associated with irinotecan or oxaliplatin pretreatment on resectability of hepatic colorectal metastases.** J Am Coll Surg 200; 845-853, 2005

FIORINI RN, et al. **Development of an unbiased method for the estimation of liver steatosis.** *Clin Transplant* 18:700-706, 2004

FONG Y, et al. **Liver resection for colorectal metastases.** *J Clin Oncol* 1997; 15: 938-946

FOSTER T, et al. **Atorvastatin and antioxidants for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: the St Francis Heart Study randomized clinical trial.** *Am J Gastroenterol.* 2011; 106:71–77

FRACANZANI AL, et al. **Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes.** *Hepatology* 2008; 48: 792-798.

GARCIA-MONZON C, MARTIN-PEREZ E, IACONO OL. **Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity.** *J Hepatol.* v. 33, p. 716-724, 2000

GARCÍA-MONZÓN C, et al. **Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease.** *J Hepatol.* 2000 Feb;32(2):331-8

GEWIRTZ AT, et al. **Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression.** *J Immunol* 2001; 167:1882

GRATTAGLIANO I, et al. **Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet.** *J Nutr* 2000; 130: 2131-2136

GREGORY S. KELLY. **Clinical Applications of N-acetylcysteine** *Alternative Medicine Review*, Volume 3, Number 2; 1998

HA SK, CHAE C. **Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity.** *Exp Anim.* v. 59, n. 5, p. 595-604, 2010.

HAGIWARA SI, ISHII Y, KITAMURA S. **Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice.** *Am. J Respir. Crit Care Med* 2000;162:225–231

HAMAGUSHI M, KOJIMA T, TAKEDA N et. al. **The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease.** *Ann Int Med.* v. 143, p. 722-728, 2005

HAMMOND JS, GUHA IN, BECKINGHAM IJ, LOBO DN. **Prediction, prevention and management of postresection liver failure.** *British J Surg.* v. 98, p. 1188-1200, 2011

HARRISON SA, et al. **Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** Am J Gastroenterol. 2003; 98:2485–2490

HELEN J. LACHMANN **ARTHRITIS & RHEUMATISM** Vol. 63, No. 2, February 2011, pp 314–324)

HENSLEY K, et al. **Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in liver mitochondria.** Carcinogenesis 2000;21:983–989

HOUSE MG, ITO H, GONEN M, FONG Y, ALLEN PJ, DEMATTEO RP, BRENNAN M, BLUMGART LH, JARNAGIN W, DANGELICA MI. **Survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: trends in outcomes for 1,600 patients during two decades at a single institution.** J Am Coll Surg. v. 210, p. 744-754, 2010.

HUR GM, et al. **Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB.** Biochem Biophys Res Commun. 1999 Aug 11;261(3):917-22.d

HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, et. al. **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** N Engl J Med. v. 350, p. 2335-2342, 2004

ILAN Y. **Leaky gut and the liver: A role for bacterial translocation in nonalcoholic steatohepatitis.** World J Gastroenterol. v. 18, n. 21, p. 2609-2618, 2012.

JANSSENS, S. AND TSCHOPP, J. (2006) **Signals from within: the DNA-damage-induced NF-κB response.** Cell Death Differ. 13, 773–784

KAISHO T, AKIRA S. **Toll-like receptor function and signaling.** J Allergy Clin Immunol 2006; 117:979.

KAMAT JP. **Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent.** Indian J Exp Biol. 2006 Jun;44(6):436-47.

KAMARI Y, et al. **Lack of interleukin-1α or interleukin-1β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice.** J Hepatol. 2011 November ; 55(5): 1086–1094

KAPLOWITZ N. **Liver and biliary diseases.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1992: 383

KAROUI M, PENNA C, AMIN-HASHEM M, MITRY E, BENOIST S, FRANC B. **Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases.** Ann Surg. v. 243, p. 1–7, 2006.

KAWANAKA M, et al. **Control of oxidative stress and reduction in biochemical markers by Vitamin E treatment in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study.** *Hepatol Res.* 2004; 29:39–41

KIM KY, RHIM T, CHOI I, KIM SS. **N-acetylcysteine induces cell cycle arrest in hepatic stellate cells through its reducing activity.** *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):40591-8. Epub 2001 Aug 16.

KLEINER DE, BRUNT EM, NATTA MV, et. al. **Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology.* v. 41, p. 1313-1321, 2005.

KLEINER DE, BRUNT EM. **Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research.** *Semin Liver Dis.* v. 32, p. 3-13, 2012.

KOTEISH A, DIEHL AM. **Animal models of steatosis.** *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104

KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. **Toll-like receptors and innate immunity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388:621.

KOO S, MARTY FM, BADEN LR. **Infectious complications associated with immunomodulating biologic agents.** *Infect Dis Clin North Am* 2010; 24:285

LARTER CZ, CHITTURI S, HEYDET D, FARREL GC. **A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: The metabolic movers.** *J Gastroenterol Hepatol.* v. 25, n. 4, p. 672-690, 2010.

LEE JH, YANG ES, PARK JW. **Inactivation of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase by peroxynitrite. Implications for cytotoxicity and alcohol-induced liver injury.** *J Biol Chem* 2003;278:51360–71

LETTERON P, FROMENTY B, TERRIS B, DEGOTT C, PESSAYRE D. **Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice.** *J Hepatol* 1996; 24: 200-208

LIE PP, CHENG CY, MRUK DD. **The biology of interleukin-1: emerging concepts in the regulation of the actin cytoskeleton and cell junction dynamics.** *Cell Mol Life Sci.* 2012 Feb;69(4):487-500.

LIMA-JÚNIOR RC, et al. **Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Apr;69(4):931-42.

MANCO M, MARCELLINI M, GIANNONE G, NOBILI V. **Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease.** *Am J Clin Pathol.* v.127, p. 954-960, 2007

MANDRUP-POULSEN T, PICKERSGILL L, DONATH MY. **Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus.** *Nature Rev Endocrinol.* 2010; 6:158–166

- MANSFIELD E, ET AL. **The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments.** *Blood*. 2001; 98:851–859
- MATATA BM, GALINANES M. **Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-B DNA binding activity.** *J Biol Chem* 2002;277:2330–2335
- MEHTA K, VAN THIEL DH, SHAH N, MOBARHAN S. **Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants.** *Nutr. Rev* 2002;60:289–293.
- MELO ML, et al. **Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide.** *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Apr;61(5):775-84
- MIHARA M, UCHIYAMA M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** *Annal Biochem*. v. 86, n. 1, p. 271-8, 1978.
- MIKALOUSKAS S, MIKALOUSKIENE L, BRUNS H. **Dietary glycine protects from chemotherapy-induced hepatotoxicity.** *Amino acids*. v. 40, n. 4, p. 1139-1150, 2011.
- MORRIS-STIFF G, TAN Y-M, VAUTHEY JN. **Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases.** *Eur J Surg Oncol*. v. 34, n. 6, p. 609-14
- MULHALL BP, ONG JP, YOUNOSSI ZM. **Non-alcoholic fatty liver disease: an overview.** *J Gastroenterol Hepatol*. v. 17, p. 1136–43, 2002.
- NATHAN C, XIE QW. **Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.** *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):915-8.
- NEUSCHWANDER-TETRI BA, et al; **NASH Clinical Research Network. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology* 2010;52(3):913–924
- NISOLI E, CLEMENTI E, MONCADA S, CARRUBA MO. **Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework.** *Biochem Pharmacol* 2004;67:1–15
- PARDO A, et al. **Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice.** *Am. J Respir. Crit Care Med* 2003;167:925–932
- PAWLIK TM, CHOTIMA. **Surgical treatment for colorectal metastasis to the liver.** *J Gastrointest Surg*. v. 11, p. 1057-1077, 2007..
- PÉREZ-CARRERAS M, DEL HOYO P, MARTIN MA *et al.* **Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** *Hepatology* 2003; 38: 999–1007

PESSAYRE D. **Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease.** J Gastroenterol Hepatol 22 (2007) Suppl. 1; S20–S27

PIHLAJAMÄKI J, et al. **Serum interleukin 1 receptor antagonist as an independent marker of non-alcoholic steatohepatitis in humans.** J Hepatol. 2012 Mar;56(3):663-70

PROMRAT K, et al. **A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis.** Hepatology 2004;39:188-196

RADOMSKI MW, PALMER RM, MONCADA S. **Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium.** Lancet. v. 2, p. 1057-1058, 1987

RAMIA-ANGEL JM, DE LA PLAZA R, QUINONES JE. **Complete clinical response of liver metastasis after chemotherapy: to resect or not?** World J Gastrintest Oncol. V. 3, n. 7, p. 107-110, 2011

RATZIU V, et al. **Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis.** *Hepatology* 2002; 35: 1485-1493

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. **Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders.** In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. (Eds.). **Free Radicals: from basic science to Medicine.** Basel: Birkhauser Verlag, 1993.

RIBEIRO RA, et. al. **Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice.** J Urol. v. 167, n. 5, p. 2229-2234, 2002.

RIVERA-CHAVEZ FA, TOLEDO-PEREYRA LH, DEAN RE, CROUCH L, WARD PA. **Exogenous and endogenous nitric oxide but not iNOS inhibition improves function and survival of ischemically injured livers.** J Invest Surg 2001;14:267–73

RIVERA CA, ADEGBOYEGA P, VAN ROOIJEN N, TAGALICUD A, ALLMAN M, WALLACE M. **Toll-like receptor-4 signaling and kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.** J Hepatol. v. 47, p. 571-579, 2007

ROBBINS SL. **Pathologic basic of disease.** London: W. B. Soder Company, 1974: 25-30

ROBINSON SM, WILSON CH, BURT AD. **Chemotherapy-associated liver injury in patients with colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis.** Ann Surg Oncol. v. 19, n. 13, p. 4287-99, 2012.

RONIS MJ, et al. **Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition.** Free Radic. Biol. Med 2005;39:619–630

RUIZ AG, CASAFONT F, CRESPO J, CAYÓN A, MAYORGA M, ESTEBANEZ A, FERNADEZ-ESCALANTE JC, PONS-ROMERO F. **Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF- $\alpha$  gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.** *Obes Surg.* v. 17, p. 1374-1380, 2007.

SANYAL AJ, *et al.* **Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.** *Gastroenterology* 2001; 120: 1183–92.

SANYAL AJ, *et al.* **Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis.** *N Engl J Med.* 2010; 362:1675–1685

SHAIKH ZA, VU TT, ZAMAN K. **Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Feb 1;154(3):256-63.

SCHWABE, R. F., SCHNABL, B., KWEON, Y. O. AND BRENNER, D. A. (2001) **CD40 activates NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells.** *J. Immunol.* 166, 6812–6819

SCHINDHELM RK, DIAMANT M, DEKKER JM, TUSHUIZEN ME, TEERLINK T, HEINE RJ. **Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease.** *Diabetes Metab Res Rev.* 2006;22(6):437-43

SEKI S, KITADA T, SAKAGUCHI H. **Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases.** *Hepatol Res* 2005; 33: 132-134

SEN, R. AND BALTIMORE, D. **Inducibility of  $\kappa$  immunoglobulin enhancer binding protein NF- $\kappa$ B by a posttranslational mechanism.** *Cell* 47, 921–928; 1986

SHIVA S, *et al.* **The pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway.** *Free Radic Biol Med* 2005;38:297–306

SOLÍS HERRUZO JA, GARCÍA RUIZ I, PÉREZ CARRERAS M, MUÑOZ YAGÜE MT. **Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction.** *Rev Esp Enferm Dig.* 2006 Nov;98(11):844-74

STEIN LL, Dong MH, Loomba R. **Insulin sensitizers in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: Current status.** *Adv Ther.* 2009; 26:893–907

SMILKSTEIN MJ, KNAPP GL, KULIG KW, RUMACK BH. **Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985).** *N Engl J Med* 1988;319:1557-1562.

SU L, et. al. **Intestinal immune barrier integrity in rats with nonalcoholic hepatic steatosis and steatohepatitis.** *Chin Med J.* v. 125, n. 2, p. 306-311, 2012.

TAHAN V, et al. **Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes nonalcoholic fatty liver disease at high risk.** *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1433-1438

TE SLIGTE K, BOURASS I, SELS JP, DRIESSEN A, STOCKBRUGGER RW, KOEK GH. **Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem.** *Eur J Intern Med* 2004; 15: 10-21

TILG H, DIEHL AM. **Citokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.** *N Eng J Med.* v. 343, n. 20, p. 1467-1476, 2000.

TILG H, MOSCHEN AR. **IL-1 cytokine family members and NAFLD: neglected in metabolic liver inflammation.** *J Hepatol.* 2011 Nov;55(5):960-2

TILG H, MOSCHEN AR. **Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis.** *Hepatol.* v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010

THONG-NGAM D, SAMUHASANEETO S, KULAPUTANA O, KLAIKEAW N. **N acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis.** *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 14;13(38):5127-32

TOMLINSON JS, et al. **Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure.** *J Clin Oncol* 2007; 25: 4575-4580

TRACEY D, KLARESKOG L, SASSO EH, et. al. **Tumor necrosis factor antagonist mechanism of action: A comprehensive review.** *Pharmacology & Therapeutics.* v. 117, n. 2, p. 244-279, 2008

TSIKAS D. **Analytical methods for 3-nitrotyrosine quantification in biological samples: the unique role of tandem mass spectrometry.** *Amino Acids.* 2012 Jan;42(1):45-63

TSUNG A, et al. **Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells.** *J. Immunol.* 175:7661–7668 (2005).

VAN CUTSEM E, KOHNE CH, HITRE E, et. al. **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med.* v. 360, p. 1408-1417, 2009.

VAUTHEY, J. N et al. **Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases.** *J. Clin. Oncol.* 24, 2065–2072; 2006

VELAYUDHAM A., HRITZ I., DOLGANIUC A., MANDREKAR P., KURT-JONES E., AND SZABO G.. **Critical role of toll-like receptors and the common TLR adaptor,**

**MyD88, in induction of granulomas and liver injury.** J. Hepatol. 45:813–824 (2006).

VENDEMIALE G, GRATAGLIANO I, CARUSO ML, SERVIDDIO G, VALENTINI AM, PIRRELLI M, ALTOMARE E. **Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in therat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha.** Toxicol Appl Pharmacol. 2001 Sep 1;175(2):130-9.

WALL ME, WANI MC, COOK CE, et. al. **Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata.** J Am Chem Soc. v. 88, n. 16, p. 3888-3890, 1966.

WEI AC, GREIG PD, GRANT D, ET AL. **Survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a 10-year experience.** Ann Surg Oncol. v. 13, p. 668-676, 2006.

WEIGAND MA(1), PLACHKY J, THIES JC, SPIES-MARTIN D, OTTO G, MARTIN E, BARDENHEUER HJ. **N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation.** Transplantation. 2001 Aug 27;72(4):694-8

YANG L, SEKI E. **Toll-Like Receptors in Liver Fibrosis: Cellular Crosstalk and Mechanisms.** Front Physiol. v. 3, p. 138, 2012

YEOH AS, BOWEN JM, GIBSON RJ, KEEFE DM. **Nuclear factor kappaB (NFkappaB) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. v. 63, n. 5, p. 1295-303, 2005

YEHUDA KAMARI, et al. **Lack of Interleukin-1 $\alpha$  or Interleukin-1 $\beta$  Inhibits Transformation of Steatosis to Steatohepatitis and Liver Fibrosis in Hypercholesterolemic Mice** J Hepatol. 2011 November ; 55(5): 1086–1094.

YOUNOSSI ZM, et al. **Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations.** Mod Pathol 1998;11:560-565

ZORZI D, LAURENT A, PAWLIK TM, LAUWERS GY, VAUTHEY JN, ABDALA EK. **Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastasis.** British J Surg. v. 94, p. 274–286, 2007