



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EUDMAR MARCOLINO DE ASSIS JUNIOR

**EFEITO PROTETOR DA SILIMARINA SOBRE A ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

FORTALEZA

2014

EUDMAR MARCOLINO DE ASSIS JUNIOR

**EFEITO PROTETOR DA SILIMARINA SOBRE A ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A865e Assis Junior, Eudmar Marcolino de.
Efeito protetor da silimarina sobre a esteato-hepatite não alcoólica experimental induzida por irinotecano/ Eudmar Marcolino de Assis Junior. – 2014.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2014.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

1. Inibidores da Topoisomerase I. 2. Silimarina. 3. Neoplasias Colorretais I. Título.

CDD 615.704

EUDMAR MARCOLINO DE ASSIS JUNIOR

EFEITO PROTETOR DA SILIMARINA SOBRE A ESTEATO-HEPATITE NÃO
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: 15/09/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Diego Veras Wilke

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcelo Leite Vieira Costa

Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por me amar e porque tudo que hoje eu sou, o sou por causa dela, que sempre me deu apoio e compreendeu.

A meu pai, por me amar, por ser sempre um bom exemplo e por nos dar liberdade para escolhermos nossos próprios caminhos.

A meus irmãos, Cinthya, Emanuel e Caio pelo companheirismo e apoio incondicional.

A minha família de modo geral, especialmente meus avôs e avós que sempre tinham um sorriso feliz sem justificativa, apenas por estar rodeados por seus netos.

A meu orientador Roberto César, que desde meu ingresso foi como um pai compreensivo entendendo minhas dificuldades e perdoando meus erros. Com seu direcionamento eu cresci bastante para chegar até aqui.

Ao Prof. Ronaldo de Albuquerque, que conduz o LAFICA com dedicação estando sempre preocupado com nosso aprendizado e orgulhoso de nosso progresso. Obrigado pelas inspiradoras aulas durante suas disciplinas.

Ao Prof. Marcellus Henrique, que sempre esteve lá quando precisei me ajudando de forma compreensiva e sem julgamentos sempre que precisei.

A Profa. Margarida e sua assistente Débora, do Departamento de Patologia, por gentilmente me cederem sua estrutura e conhecimentos quando eu mais precisava de ajuda com histologia.

Ao Prof. Paulo Roberto, que sempre foi prestativo ao analisar nossos cortes histológicos. Foi sempre um grande aprendizado trabalhar com ele.

A colega e grande amiga Anielle Torres, que foi sempre minha companheira de experimentos e além disso, sempre confiou em mim como amigo me apoiou em todos os momentos difíceis. Nós crescemos muito juntos esses dois anos e eu sempre vou lembrar disso onde quer que estejamos.

Aos amigos do LAFICA, especialmente, Vênúcia Magalhães, Carlos Wagner, Caio Abner, Livia Talita, Ana Paula, Ana Carla, Larisse Lucetti, Daniel, Maraiza Teixeira, Deysi Wong, Renan Oliveira por serem sempre prestativos e me ajudarem e pelos momentos de descontração em que nos reunimos para festejar nossas conquistas, que hajam muitas outras.

Aos alunos de iniciação científica e amigos, Diego Holanda, Lara Malveira, Leonardo Moreira, Nathalia Ribeiro e Christiane Mendes pela prestesa, pela amizade e pela confiança.

À Maria Silvandira (Vandinha), que é como uma mãe para todos do laboratório, um exemplo de eficiência e responsabilidade, obrigado por tudo. Sem ela essa dissertação não seria possível.

À Gleyciane Nobre por ser quem ela é, uma amiga fiel que acredita em nossas capacidades e nos incentiva a vencer, a quem eu amo muito, gosto de cuidar e dar carinho pois sabemos que podemos nos contar em todos os momentos.

À Jaqueline Nobre e sua família por me receber sempre de braços abertos em um abraço acolhedor de mãe.

À Camila Cerdeira, porque nossa amizade vai muito além das amizades comuns, debatemos sobre tudo discordamos frequentemente e nunca brigamos de cúmplices que somos, tenho ela um grande prestígio que se traduz no amor da nossa amizade.

À Evelin Valentin, que com seu jeito maluco compreendeu o meu criando uma dupla inseparável de amizade.

À Adriene Oliveira, que tem acompanhado minha trajetória como uma amiga insubstituível desde a graduação, me ajudando nos momentos de desespero e rindo ao meu lado nos momentos de diversão.

À Daniel Brito, o amigo mais antigo que guardo no coração, que sempre apoiou minhas decisões por mais malucas que pudessem parecer, me incentivando a seguir meus sonhos.

À Thayanne Brasil amiga e colega de quarto, que entrou comigo nesse desafio que é o mestrado e desde o começo estivemos lado a lado nos ajudando, nos apoiando nos momentos de dificuldade, por ela ser sempre alguém com quem eu posso contar pra tudo.

A Edilson Martins, meu irmão de coração, obrigado pelos momentos de descontração e por todos aqueles momentos em que me ouviu e deu apoio.

À Camila Meirelles, obrigado por ser uma irmã, obrigado pelos momentos de diversão e pelos momentos em que sofremos juntos nas disciplinas e no corre-corre do mestrado.

A Bruno Marques meu companheiro e amigo, que foi meu tudo enquanto estive longe da minha família, cuidou de mim, se preocupou e me ajudou quando precisei. Obrigado por me amar e entender minha cabeça louca. Você tornou suportável a dor que é morar longe da minha mãe, por isso não importa em que parte do mundo estejamos eu vou sempre levar você comigo.

Aos amigos do LOE, Marcilia, Patricia, Gabriella, Delano, Jersia e Cassia porque tivemos sempre ótimos momentos juntos e eu adoro conversar com eles.

À Profa. Letícia Lotufo e à Profa. Geane Matos que foram coordenadoras do programa durante o período cursado, obrigado pela dedicação.

À secretária Aura Rhanes pela atenção, gentileza e eficiência ao resolver nossos problemas mesmo quando chegávamos em cima da hora.

Aos funcionários, Alceu Machado, Lúcia Ribeiro, Janaíne Marques, Alana Carvalho, Naiara Felipe, Antonio Haroldo, Aauto Rodrigues, por todos os serviços prestados na resolução de pedidos e de problemas que surgiram do decorrer desta etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro prestado a este estudo.

*It is our choices that show what we truly
are, far more than our abilities.*

Alvo Percival Wulfric Brian Dumbledore

RESUMO

Introdução: O câncer coloretal (CRC) é a 3^o neoplasia mais prevalente no mundo. O irinotecano (IRI), fármaco de primeira linha para os tratamentos do CRC e sua metástase hepática, tem aumentado a sobrevivência dos pacientes. Contudo, seus efeitos colaterais, incluindo a esteato-hepatite não alcoólica (NASH), podem limitar o curso do tratamento. Os protocolos baseados em irinotecano foram associados com um aumento no risco de NASH de 3,4 vezes. A silimarina (SIL) tem mostrado ser capaz de prevenir doenças do fígado gorduroso no contexto clínico e em modelos de danos hepáticos induzidos quimicamente. Assim, nosso objetivo foi estudar o efeito da SIL na NASH induzida pelo IRI, assim como o mecanismo envolvido. **Métodos e Resultados:** Camundongos Swiss fêmeas (n=8-10), foram divididos em 6 grupos e injetados com salina (SAL 5ml/kg i.p.), IRI (50 mg/kg i.p.), SIL (150 mg/kg v.o.) ou IRI (50 mg/kg i.p.) + SIL (SIL 1,5, 15, 150 mg/kg v.o.) 3x/semana/7 semanas. Amostras de sangue foram coletadas na sétima semana para determinar a concentração sérica das enzimas hepáticas ALT e AST (U/L). Animais foram mortos para a coleta do fígado para avaliar do dano tecidual (escores de Kleiner), dosagem de lipídeos totais (mg/g de tecido), MDA (nmol/g tecido), NPSH (mg de NPSH/g tecido), IL-6 (pg/mg de tecido), IL-10 (pg/mg de proteína) e IL-1 β (pg/mg de tecido), imunomarcção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), 3-Nitrotirosina (NTyr), e Receptor Toll Like tipo 4 (TLR4), quantificação do fator nuclear kappa B (NF κ B) e da α -actina de músculo liso (α -SMA) e expressão do gene RSS. ANOVA/Teste de Newman-Keuls ou Kruskal Wallis/ Teste de Dunn foram utilizados para análise estatística. Foram consideradas diferentes amostras onde o nível descritivo era inferior a 5%. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal sob o número de protocolo: 21/12. O IRI aumentou de forma significativa as transaminases hepáticas, o infiltrado neutrofílico, o acúmulo de lipídeos, o acúmulo de MDA, a expressão de NTyr, a expressão de α -SMA, a expressão de NF κ B, a expressão de IL-1 β , a expressão de IL-6, a expressão de TLR4 e quantificação de DNA bacteriano, quando comparados ao grupo SAL. SIL (1,5 mg/kg) melhorou esses parâmetros, exceto a infiltração neutrofílica e a quantificação do DNA bacteriano quando comparados ao o grupo IRI (P<0,05). Por outro lado, a dose media de SIL (15 mg/kg) foi efetiva apenas no Infiltrado Neutrofílico, na expressão de NTyr, na expressão de NF κ B e na expressão de IL-6. Adicionalmente, essa dose aumentou a expressão hepática de IL-10, a quantificação de DNA bacteriano e a expressão da α -SMA quando comparados com o grupo IRI (p<0,05). Contudo, a expressão de iNOS não foi afetada pelo pré-tratamento com SIL (P<0,05) e a maior dose foi ainda mais deletéria. **Conclusões:** O pré-tratamento com SIL previne o dano hepático causado pelo IRI provavelmente através da mudança da resposta inflamatória mediada por receptores TLR4 e citocinas IL-1, IL-6, IL-10 e NF κ B. O dano observado no grupo de animais tratados com as maiores doses de SIL parece ser dependente da translocação bacteriana do intestido que é associada a ativação do TLR4. Adicionalmente, a silimarina contribui para hepatoproteção por inibir o estresse oxidativo e a nitrosilação proteica, prevenindo a ativação de mecanismos de fibrose hepática.

Palavras Chave: Inibidores da Topoisomerase I. Silimarina. Neoplasias Colorretais.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the 3rd most common cancer worldwide. Irinotecan (IRI), first-line drug for the treatment of hepatic metastases and its CRC has increased the survival of patients. However, its side effects, including non-alcoholic steatohepatitis (NASH), may limit the course of treatment. Irinotecan-based protocols have been associated with a 3.4 times increased risk of NASH. Silymarin (SIL) has shown to be capable of preventing fatty liver disease in the clinical setting and in models of liver damage chemically induced. Thus, our goal was to study the effect of SIL on IRI-induced NASH, as well as the mechanism involved.

Methods and results: Female Swiss mice (n = 8-10) were divided into 6 groups and were injected with saline (SAL 5 ml / kg ip) IRI (50 mg / kg ip), SIL (150 mg / kg po) or an IRI (50 mg / kg ip) + SIL (SIL 1.5, 15, 150 mg / kg PO) 3x / week / 7 weeks. Methods and results: Female Swiss mice (n = 8) were divided into 6 groups and received saline injection (SAL 5 ml / kg ip) IRI (50 mg / kg ip), SIL (150 mg / kg po) or an IRI (50 mg / kg ip) + SIL (SIL 1.5, 15, 150 mg / kg PO) injection 3x / week / 7 weeks. Blood samples were collected in the seventh week to determine the serum concentration of ALT and AST (U / L) liver enzymes. Animals were killed to collect liver in order to assess the tissue damage score (Kleiner), serum total lipids (mg / g tissue), MDA (nmol / g tissue), NPSH (NPSH mg / g tissue), IL 6 (pg / mg tissue), IL-10 (pg / mg protein), and IL-1 β (pg / mg tissue), immunostaining of nitric oxide synthase (iNOS), 3-nitrotyrosine (NTyr), and Toll like receptor type 4 (TLR4), quantification of nuclear factor kappa B (NFkB) and α -smooth muscle actin (α -SMA) and gene expression of the RSS. ANOVA / Newman-Keuls test or Kruskal Wallis / Dunn test were used for statistical analysis. Samples were considered different, when the p-value was lower than 5%. The study was approved by the ethics committee on animal research under protocol number: 21/12. IRI significantly increased liver transaminases, the neutrophil infiltration, lipid accumulation, the accumulation of MDA, the expression of NTyr, the expression of α -SMA expression of NFkB, the expression of IL-1 β , the expression IL-6, the expression of TLR4 and quantification of bacterial DNA when compared to the SAL group. SIL (1.5 mg / kg) improved these parameters, except neutrophil infiltration and quantification of bacterial DNA when compared to IRI group (P <0.05). Moreover, the SIL's middle dose (15 mg / kg) was effective only in the neutrophilic infiltrate in NTyr expression, the expression of NFkB and expression of IL-6. Additionally, it increased hepatic expression of IL-10, quantification of bacterial DNA and expression of α -SMA compared to IRI (p <0.05). However, iNOS expression was not affected by pretreatment with SIL (P <0.05) and the higher dose was even more deleterious. **Conclusions:** Pre-treatment with SIL prevent liver damage caused by IRI probably by changing the inflammatory response mediated by TLR4, IL-1, IL-6, IL-10 and NFkB. The damage observed in the group of animals treated with the highest doses of SIL seems to be dependent of bacterial translocation from the gut, which is associated with activation of TLR4. Additionally, silymarin contributes to hepatoprotection by inhibiting oxidative stress and protein nitrosylation, preventing activation of hepatic fibrosis' mechanisms.

Keywords: Topoisomerase I Inhibitors. Silymarin. Colorectal Neoplasms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detalhamento dos primers utilizados na reação de PCR.....	35
Tabela 2 - Avaliação da diarreia em animais submetidos a NASH induzida pelo irinotecano e tratados com silimarina.....	39
Tabela 3 - Estratificação dos escores de Kelliner.....	44
Tabela 4 - Resumo dos achados observados alterados ou não pelo tratamento com a silimarina.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo do Irinotecano.	17
Figura 2 - Esquema explicativo da fisiopatologia da NASH induzida pelo irinotecano proposto por Costa e colaboradores (2014).	21
Figura 3 - Estrutura química dos compostos polifenólicos do cardo-leiteiro.	22
Figura 4 - Esquemática do delineamento experimental.	30
Figura 5 - O tratamento com a silimarina não interfere na mortalidade e na curva ponderal dos animais injetados com irinotecano.	38
Figura 6 - Principais parâmetros clínicos observados frente a administração de irinotecano.	40
Figura 7 - Dosagem sérica de transaminases hepáticas.	41
Figura 8 - Contagem de infiltrados neutrofílicos e dosagem bioquímica de lipídeos.	42
Figura 9 - O efeito da silimarina sobre a expressão hepática de α -SMA.	43
Figura 10 - Sumário dos escores de Kleiner.	44
Figura 11 - Fotomicrografia do tecido hepático de animais submetidos a NASH induzida pelo irinotecano.	46
Figura 12 - Efeito da silimarina no acúmulo de MDA e redução do NPSH causados pela indução de NASH pelo irinotecano.	48
Figura 13 - Efeito da silimarina na expressão de iNOS observada no modelo de NASH induzida pelo irinotecano.	49
Figura 14 - Efeito da silimarina sobre a nitrosilação proteica do tecido hepático de animais submetidos a indução de NASH pela injeção de irinotecano.	50
Figura 15 - Efeito do tratamento com silimarina na dosagem de citocinas no tecido hepático de animais submetidos a indução de NASH pelo uso de irinotecano.	52
Figura 16 – Expressão relativa de NF κ B no fígado de animais submetidos ao modelo de NASH induzida pelo irinotecano e tratados com silimarina.	53
Figura 17 - Detecção da presença de DNA bacteriano no tecido hepático através de PCR em tempo real.	54
Figura 18 - Envolvimento da ativação de TLR4 na NASH induzida por irinotecano o efeito da silimarina nesse contexto.	55
Figura 19 - Adaptação do modelo de Costa e colaboradores (2014).	71

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AP-1	Proteína Ativadora-1
CAPD	Diálise Peritoneal Contínua
CCR	Câncer Coloretal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutathiona
HCV	Hepatite C
IL-10	Interleucina-10
IL-1R	Receptor de Interleucina-1
IL-1ra	Antagonista do Receptor de IL-1
IL-1β	Interleucina-1 β
INF-γ	Interferon- γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
IRAK-1	Kinase Associada a IL-1R
IRI	Irinotecano
Iri-NASH	Esteato-Hepatite Não Alcoólica relacionada ao uso do Irinotecano
KLF-6	Fator 6 semelhante a Kruppel
LHS	Lipase Hormônio Sensível
LPS	Lipopolissacarideo
map	Proteína Efetora Associada a Mitocôndria
NAFLD	Doença Gordurosa Não Alcoólica do Fígado
NASH	Esteato-Hepatite não alcoólica
NF-IL-6	C/EBP β / fator nuclear-interleucina-6
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
NPSH	Grupos Sulfidrílicos não proteicos
PPR's	Receptores de Reconhecimento de Padrão
STAT3	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 3
T3SSs	Sistema de Secreção tipo III da E. Coli
TLR4	Receptor-4 tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoran-Alpha
α-SMA	α -Actina de Músculo Liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer colorretal metastático	14
1.2 Irinotecano	16
1.3 Esteato-Hepatite não alcoólica - NASH	18
1.4 Silimarina	22
1.5 Justificativa e relevância	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Fármacos e reagentes	28
3.3 Animais	29
3.4 Delineamento experimental	29
3.5 Avaliação clínica dos animais	31
3.6 Dosagens das concentrações plasmáticas de aminotransferases (ALT e AST)	31
3.7 Avaliação histopatológica do fígado	32
3.8 Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)	32
3.9 Determinação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP)	33
3.10 Determinação de lipídeos no tecido hepático	33
3.11 Reação Imunohistoquímica para iNOS, N-Tyr e TLR-4	33
3.12 Análise do envolvimento de bactérias na NASH e nos tratamentos com a silimarina ..	34
3.12.1 <i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	34
3.13 Análise de expressão do NF-κB e α-SMA por Western Blot	35
3.14 Análise de expressão do Il-1β, IL-6 e IL-10 por ELISA	36
3.15 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o câncer como sendo um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo (WHO, 2014). Incluem-se nessa categoria mais de 100 tipos de tumores malignos de variadas localizações (INCA, 2011).

De acordo com a OMS, uma em cada quatro mortes no mundo é devida ao câncer. Portanto, essa doença é hoje uma das maiores causas de morte no mundo, com 14 milhões de novos casos a cada ano e 8,2 milhões de mortes por câncer em 2012. Nos EUA são estimados 1.665.540 de novos casos de câncer em 2014, além disso, espera-se 585.720 pessoas morram devido ao câncer nos EUA, e um total de 15.780 novos casos de câncer diagnosticados em crianças e adolescentes neste mesmo ano.

A expectativa de vida da população brasileira vem aumentando consideravelmente. Esse aumento tem sido associado ao maior aparecimento de problemas com câncer. Por isso, o câncer é incontestavelmente um problema prioritário de saúde pública em todas as regiões e instâncias sociais, desde as mais abastadas até as mais desfavorecidas – cultural, social e economicamente. Estima-se para 2015 a ocorrência de 395 mil novos casos de câncer, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, sendo o câncer de próstata, mama e coloretal os três mais frequentes.

O câncer gera um gasto econômico significativo a cada ano. Em 2009, essa doença causou uma perda econômica de 216,6 bilhões de dólares além do incontável sofrimento humano (ACS, 2014). As consequências econômicas de cada caso de câncer incluem os custos diretos e indiretos com tratamento, a renda renunciada pelo paciente e por seus familiares impossibilitados de trabalhar durante o tratamento, e, mais importante ainda em termos econômicos, é a perda de produtividade devido à morte prematura ou deficiência (KNAUL et al., 2014). Em contrapartida, os investimentos em pesquisa trouxeram melhorias nos tratamentos e na sobrevivência de pacientes. Havendo uma queda de 20% no número de mortes devidas ao câncer de 1991 a 2010, evitando-se cerca de 1,3 milhões de mortes (ACS, 2014).

Com um número maior de pacientes sobreviventes ao câncer e em tratamento, o número de indivíduos sofrendo as consequências da toxicidade decorrentes desse tratamento tem aumentado. Levando ao aparecimento de efeitos colaterais que demandam interferências importantes no tratamento, em alguns casos, sendo necessária a sua interrupção.

1.1 Câncer colorretal metastático

O Câncer colorretal (CCR) é um dos tipos de câncer mais frequentes e que mais mata no mundo. Ele é o terceiro tipo de câncer mais comum entre homens no mundo (746 mil casos – 10% do total) e o segundo entre as mulheres (614 mil casos – 9,2% do total). Apesar da maioria dos novos casos ocorrerem em regiões mais desenvolvidas do planeta (55% dos casos) a maioria dos casos de óbito acontecem em regiões menos desenvolvidas (52% das mortes) (WHO, 2014). Em 2014 estima-se que no Brasil ocorrerão 15 mil novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 17 mil em mulheres, sendo as regiões brasileiras mais afetadas por essa doença o Sul, o Sudeste e o Centro Oeste (INCA, 2014).

Essa neoplasia é considerada de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estágios iniciais com uma sobrevida geral de 5 anos para 55% dos pacientes em países desenvolvidos e 40% deles em países em desenvolvimento (INCA, 2014). Porém, em 25% dos pacientes diagnosticados com CCR já há instalada uma metástase hepática. Além disso, dos pacientes que não apresentam no momento do diagnóstico, metade irá desenvolver metástases hepáticas durante o curso da doença (CHEN et al., 2011).

As metástases hepáticas são as mais frequentes e as mais letais em pacientes com CCR. 25% dos pacientes apresentam metástases hepáticas no momento do diagnóstico. Dos que não apresentam nesse momento, 30% desenvolverão metástases hepáticas. Além disso, em cerca de 30% das mortes devido a essa neoplasia, a doença está restrita ao fígado (Kuvshinov e Fong, 2007), portanto, é de extrema importância o controle dessas metástases nesses pacientes. Na última década as estratégias de tratamento do CCR metastático ganharam dois importantes aliados com a introdução do Irinotecano e da Oxaliplatina como agentes quimioterápicos aos esquemas terapêuticos, aumentando a taxa de sobrevida global em pacientes não tratados, que era de 6 a 12 meses (KUVSHINOV; FONG, 2007), para de 20 a 22 meses nos pacientes que receberam essas novas drogas (RAMIA-ANGEL et al., 2011).

Apesar do grande avanço no tratamento clínico do CCR, uma possibilidade real de cura pode apenas ser levada em consideração quando aliada a uma remoção cirúrgica de toda a evidência da doença mais margens negativas (COSTA et al., 2014). De modo geral, a cirurgia é associada a uma quimioterapia pré-operatória, com o objetivo de controlar a doença micrometastática e o melhorar o prognóstico do paciente (ADAM et al., 2004; RAMIA-ANGEL

et al., 2011). Esse tratamento tem trazido resultados auspiciosos onde se consegue sobrevidas de 5 anos variando em 30 a 60% (KUVSHINOV; FONG, 2007; WEI et al., 2006), uma média muito superior a pacientes não operados que raramente chegavam aos 3 anos de sobrevivência global (ROUGIER et al., 1995).

A quimioterapia pré-operatória é ainda mais importante para pacientes que possuem tumores inicialmente irressecáveis (BISMUTH et al., 1996). Nos quais as metástases hepáticas já tomaram aproximadamente 80% do parênquima hepático e não podem ser removidas sem o comprometimento da vida do paciente (BISMUTH et al., 1996; POZZO et al., 2004; KUVSHINOV; FONG, 2007). Com o uso da quimioterapia pré-operatória, a sobrevida desses pacientes pode se igualar a sobrevida daqueles que apresentaram metástases inicialmente ressecáveis (ADAM et al., 2004).

Esse tratamento é conhecido como terapia de conversão e objetiva diminuir o tamanho dos tumores possibilitando a posterior remoção cirúrgica. A droga geralmente utilizada na terapia de conversão, é o 5-fluoruracil em combinação com a oxaliplatina e/ou o irinotecano, conseguindo-se com esse tratamento tornar ressecáveis aproximadamente 40% dos tumores inicialmente irressecáveis (BISMUTH et al., 1996; ADAM et al., 2004; POZZO et al., 2004).

Como a terapia combinada (quimioterapia + tratamento cirúrgico) tem trazido resultados promissores, o número de indicações tem subido bastante nos últimos anos. Ao mesmo tempo, tem subido a preocupação dos oncologistas com o tempo de exposição a esses agentes quimioterápicos, uma vez que essas drogas possuem ações deletérias sobre o parênquima hepático, com aparecimento de efeitos colaterais altamente correlacionados com o uso dessas drogas, a oxaliplatina com a Síndrome da obstrução sinusoidal (RUBBIA-BRANDT, 2004), e o irinotecano com a esteato-hepatite (VAUTHE, 2006).

Como o fígado, caso esteja são, pode ter grande volume ressecado devido a regeneração (80% do volume total) (KUVSHINOV; FONG, 2007) a ressecção cirúrgica dos tumores mais margem negativa é uma prática relativamente segura. Contudo, pacientes expostos a um longo tempo de quimioterapia podem apresentar efeitos colaterais nesse órgão. Onde é observada uma capacidade regenerativa reduzida, que podem transformar até mesmo pequenas ressecções em uma insuficiência hepática pós-cirúrgica (HAMMOND et al., 2011).

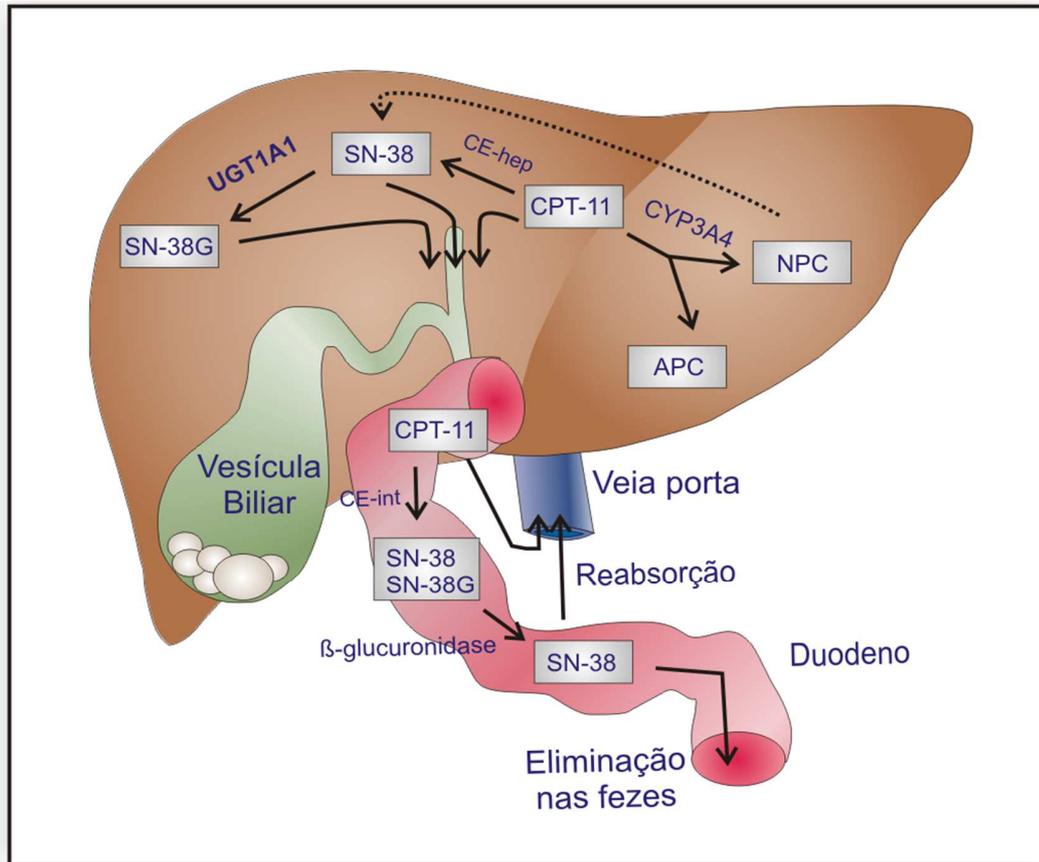
1.2 Irinotecano

O Irinotecano (IRI) é um derivado semi-sintético da camptotecina. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall et al., em 1966, de uma planta nativa da China e do Tibet, *Camptotheca acuminata*. O Irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) exercem suas atividades antineoplásicas impedindo a duplicação do DNA, através da inibição seletiva da topoisomerase I, uma enzima que cliva uma das cadeias da fita dupla de DNA permitindo que a outra gire em seu próprio eixo relaxando a pressão de torção necessária para o armazenamento do DNA em cromossomos, e também responsável pela religação da fita clivada (CHAMPOUX, 2001). Como o SN-38 e o irinotecano estabilizam a ligação covalente DNA-Topoisomerase-1, a fase S do ciclo celular não consegue ser completada levando a célula a ativar mecanismos de morte. Portanto, o irinotecano e seu metabólito são citotóxicos, principalmente para células que estão em constante atividade mitótica (CHAMPOUX, 2001).

Devido ao tipo de ação citotóxica do irinotecano ele é ativo contra diversos tipos de tumores, sendo relatados a sua utilização em diferentes tratamentos, como para câncer de ovário (FUJII et al., 2002), linfoma de Hodgking (RIBRAG et al., 2003), câncer de pulmão de células pequenas e não-pequenas (LANGER, 2004), mama (PEREZ et al., 2004) e de estômago (ENZINGER et al., 2005). Além desses, o irinotecano é a droga de primeira linha para o tratamento do câncer colorretal (SALTZ et al., 2001; CHESTER et al., 2003).

O irinotecano é uma pró-droga pois, apesar de ter ação inibidora sobre a topoisomerase I, seu principal metabólito ativo, o SN-38 é cerca de mil vezes mais potente (KOIZUMI et al., 2006). Além disso, o SN-38 passa por um mecanismo de reciclagem no organismo que o mantém em níveis séricos consideráveis por um tempo maior. Esse mecanismo é chamado de recirculação entero-hepática (Figura 1), nele o SN-38 sofre processo de glicuronidação dando origem a um metabólito inativo (SN-38G) que é excretado via bile na via intestinal. Apesar de uma parte ser excretada junto com as fezes, grande parte do SN-38G sofre ação da β -glicuronidase produzida por bactérias entéricas, podendo novamente ser absorvido no intestino delgado (Figura 1) (TAKASUNA et al., 1996; CHESTER et al., 2003; TALLMAN, 2005).

Figura 1 - Metabolismo do Irinotecano.



No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 (irinotecano) 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 β -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação entero-hepática (TAKASUNA et al., 1996; CHESTER et al., 2003; TALLMAN, 2005).

Fonte: COSTA et al., 2014.

Como existem células do próprio organismo que estão constantemente em divisão, os irinotecano e SN-38 também levam a morte celular nesses tecidos, gerando os efeitos colaterais da terapia do câncer. Existem diversos efeitos colaterais relacionados à quimioterapia. O

irinotecano é conhecido por causar mucosite intestinal e diarreia. Nesse processo, há uma atrofia das vilosidades e um aprofundamento das criptas associados a um prejuízo importante da integridade do epitélio intestinal (IKUNO et al., 1995; FREITAS, 2007). A quebra na barreira intestinal é um ponto importante na fisiopatologia da toxicidade intestinal e extraintestinal do irinotecano, uma vez que ela favorece a translocação e infecção bacteriana, que desencadeia mecanismos inflamatórios exacerbados que culminam em dano tecidual (GIBSON et al., 2003; MARTIN; WALLACE, 2006).

A translocação bacteriana é importante para a fisiopatologia de outros eventos patológicos relacionados ao uso do irinotecano, principalmente para a esteato-hepatite não alcoólica (NASH, do inglês *Nonalcoholic steatohepatitis*) relacionada ao uso desse antineoplásico (COSTA et al., 2014). A NASH aparece em 1 a cada 12 pacientes que recebem tratamento com irinotecano. Um risco 3,45 vezes maior de desenvolver a doença é atribuído a pacientes que recebem irinotecano em comparação com aqueles que não recebem quimioterapia (ROBINSON et al., 2012). Na NASH induzida por irinotecano, uma série de eventos inflamatórios, desencadeados pela ação de bactérias entéricas no fígado, leva a um desequilíbrio metabólico e oxidativo com características como: intenso infiltrado inflamatório e acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, o que pode culminar em fibrose e insuficiência hepática (COSTA et al., 2014). Como pacientes com fígado deficiente não possuem poder regenerativo adequado, os pacientes com NASH induzida por irinotecano podem apresentar risco de mortalidade pós-metastastectomia (VAUTHEY et al., 2006).

No contexto do tratamento do câncer colorretal metastático, a NASH aparece como um potencial empecilho, uma vez que os tratamentos dos tumores classificados como irrissecáveis é baseado em quimioterapia pré-operatória para diminuição do tumor (BISMUTH et al., 1996). Porém, o aparecimento de toxicidade no parênquima hepático não cancerígeno impossibilita a cirurgia, pois é sabido que este órgão perde a sua grande capacidade de regeneração podendo culminar, caso a cirurgia se proceda, em uma insuficiência hepática (KANDUTSCH et al., 2008).

1.3 Esteato-Hepatite não alcoólica - NASH

A Doença Gordurosa Não Alcoólica do Fígado (NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) é uma síndrome rotineiramente encontrada na prática clínica que pode variar desde alterações hepáticas sem maiores relevâncias clínicas, como a esteatose simples, até

diferentes graus de lesão inflamatória hepática que pode determinar deterioração da função hepática com um risco potencial de evolução para cirrose (MULHALL et al., 2002). A NASH se inclui como a forma mais grave da NAFLD com presença de esteatose associada a lesões necro-inflamatórias características como tumefação hepatocítica, inflamação e fibrose hepática (BRUNT et al., 1999; HAMAGUCHI et al., 2005). Um paciente que apresente todas essas características corre um risco potencial de uma evolução silenciosa para uma cirrose hepática em até 24% dos casos (MATTEONI et al., 1999).

O diagnóstico da NASH é feito por biópsia hepática onde o patologista avalia a presença dos achados histopatológicos característicos. Kleiner e colaboradores definiram através de um estudo bem delineado, cego, randomizado e com dupla checagem, quais eram os achados mais associados a esse problema, sendo encontrados 3 achados diretamente correlacionados. Foram atribuídos escores que quantificam cada uma das três variáveis histológicas através da gradação da severidade dos achados: esteatose (0 a 3); inflamação lobular (0 a 3); vacuolização (0 a 2). A soma desses três escores diagnósticos de NASH, pode variar de 0-2 (ausência de NASH), 3-4 (NASH marginal) e ≥ 5 (presença de NASH) (KLEINER et al., 2005). Além desses três achados principais, Kleiner recomendou a observação da presença de infiltração inflamatória portal e fibrose, esses achados tem pouco valor de diagnóstico pois tem baixa capacidade preditiva negativa, porém são parâmetros associados a doença que servem como avaliadores de severidade (KLEINER et al., 2005).

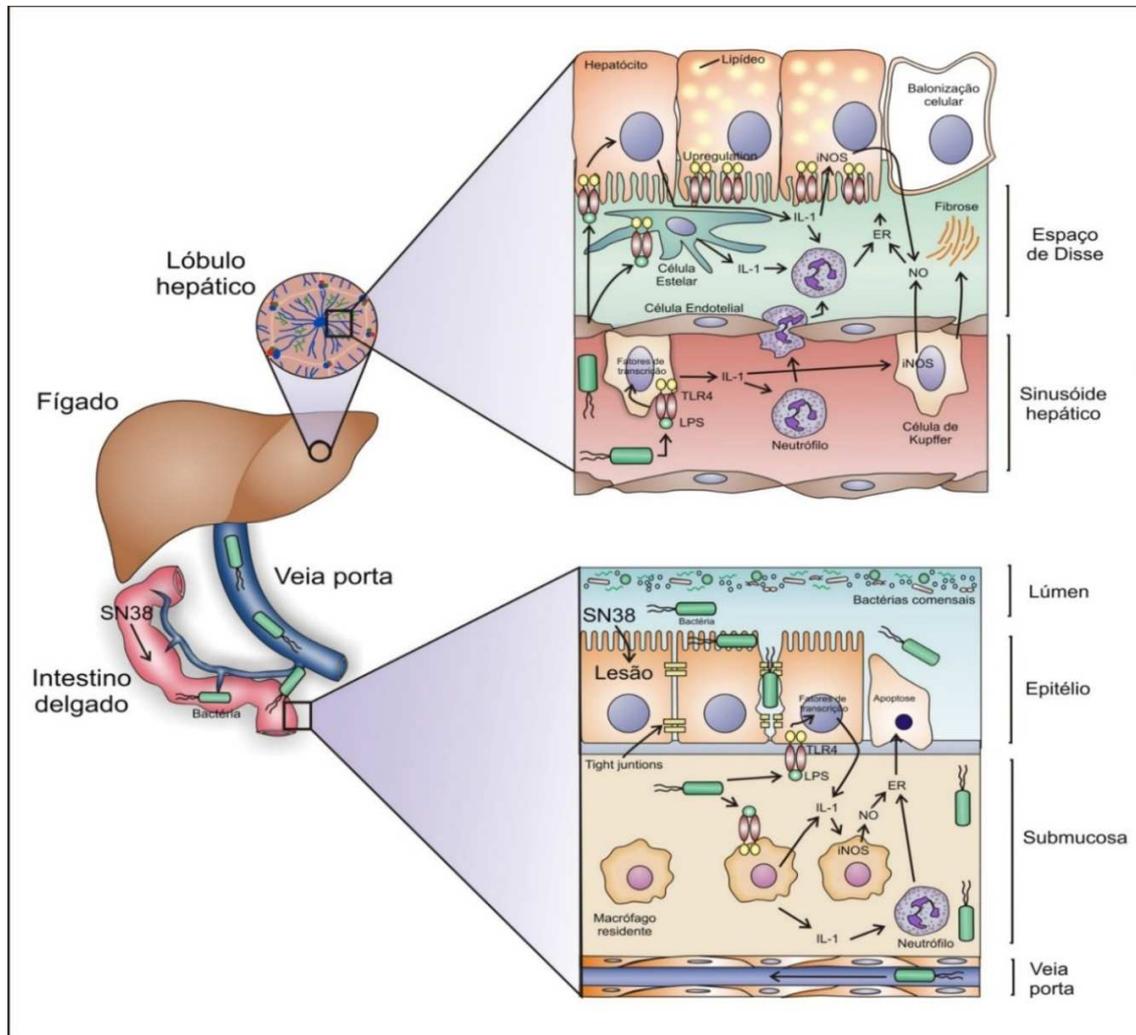
A teoria mais aceita para explicar a fisiopatologia da NASH é o modelo chamado de *'two hits'* (dois insultos), neste modelo, o desenvolvimento da esteatose, por fatores como a resistência à insulina, Diabetes Melitus e síndromes metabólicas, corresponde à primeira etapa (CHITTURI e Farrell., 2001; LIMA et al., 2010) e tornaria o fígado mais susceptível para danos subsequentes, segunda etapa. Essa envolve um novo mecanismo de lesão hepática - estresse oxidativo, com a peroxidacao lipídica ou exposição do fígado ao lipopolissacarideo (LPS) bacteriano, com a ativação de citocinas pró-inflamatórias - que pode ser potencializado quando ocorre em um fígado esteatótico (DAY; JAMES, 1998a; CORTEZ-PINTO et al., 2006), finalmente, o aparecimento do dano hepatocelular, inflamação e fibrose que caracterizam a NASH (DAY; JAMES, 1998b).

No caso da NASH induzida por irinotecano, Costa e colaboradores sugeriram que diversos insultos estariam atuando de forma concomitante. Isso colocaria o fígado em uma situação

inflamatória que leva a produção de radicais livres e estresse oxidativo, comprometendo as mitocôndrias e, conseqüentemente, a β -oxidação de lipídeos. O estado inflamatório em um fígado esteatótico exarcerbaria ainda mais a situação e culminaria nas lesões características da NASH (COSTA et al., 2014).

Com relação aos mediadores inflamatórios, Costa relatou um aumento de Interleucina-1 β (IL-1 β), Óxido Nítrico Sintase induzida (do inglês, *inducible nitric oxide synthase* - iNOS) e Receptor-4 tipo toll (do inglês, *toll like receptor 4* - TLR4) no fígado de animais tratados com irinotecano por 7 semanas. Além disso, evidenciou-se uma translocação de bactérias gram-negativas que se mostraram aumentadas tanto no sangue portal quanto no fígado desses animais. Acredita-se que a exposição do fígado às bactérias intestinais e a lesão direta do medicamento levaram a um estado inflamatório característico, através da ativação dos receptores TLR4, promovendo a liberação de IL-1 β e iNOS, que recrutam neutrófilos e aumentam a produção de superóxidos, colocando o órgão desse animal em um ciclo vicioso de estresse oxidativo onde a disfunção mitocondrial e a peroxidação lipídica amplificam o estado inflamatório e oxidativo, que por sua vez afetam novas mitocôndrias em outras células que passam a acumular gordura e assim sucessivamente. Essas informações sobre a fisiopatologia abrem precedentes para possíveis alvos terapêuticos com boas perspectivas terapêuticas como, por exemplo, o uso de fármacos com ação modulatória dos eventos da NASH. Possíveis candidatos seriam os antioxidantes, como a silimarina. O esquema proposto por Costa e colaboradores pode ser visto na figura 2.

Figura 2 - Esquema explicativo da fisiopatologia da NASH induzida pelo irinotecano proposto por Costa e colaboradores (2014).



A presença do metabólito ativo SN-38 na mucosa intestinal determina uma lesão celular que debilita a barreira epitelial mucosa e permite a translocação de enterobactérias da luz intestinal. A presença destas bactérias gram-negativas na submucosa é reconhecida pela imunidade inata através dos TLR4 amplificando a resposta inflamatória local e permitindo que alguns microorganismos alcancem vasos capilares intestinais levando a bacteremia portal. As enterobactérias gram-negativas chegam ao fígado pelos ramos portais atingindo os sinusóides. A endotoxina bacteriana (LPS) é reconhecida pelos receptores TLR-4 presentes nos macrófagos locais (células de Kupffer) que se tornam ativados e passam a liberar citocinas inflamatórias como a IL-1 como também estimulam a síntese de óxido nítrico via iNOS. A IL-1 promove a atração e diapedese de leucócitos gerando infiltrados neutrofílicos portais e lobulares. O óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio geram estresse oxidativo causando lesão de membranas lipídicas e disfunção mitocondrial o que promove o surgimento de esteatose e tumefação dos hepatócitos. A célula estelar, também estimulada por LPS através de receptores TLR-4, assume um fenótipo fibrogênico e promove deposição de colágeno.

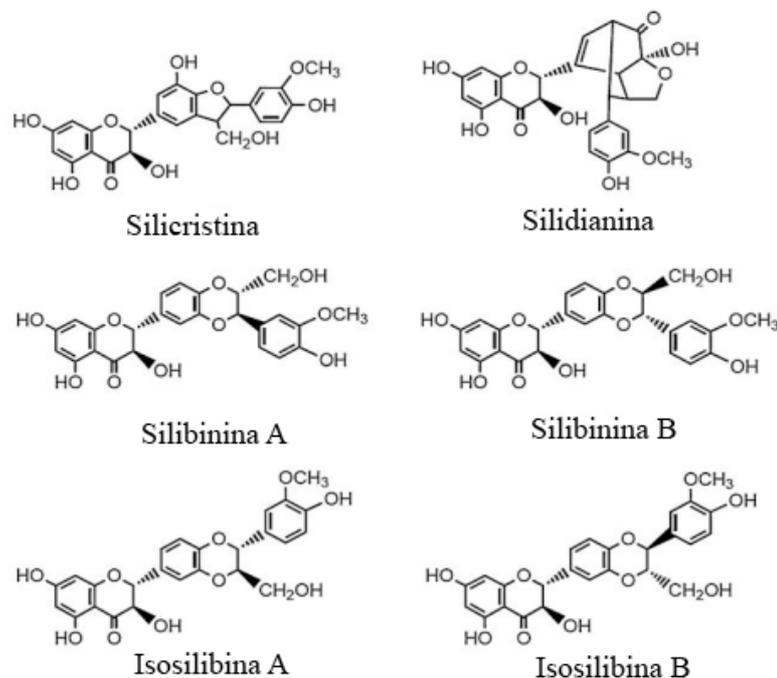
Fonte: COSTA et al., 2014.

1.4 Silimarina

A silimarina é um complexo de flavonoides antioxidantes derivados da erva do cardo leiteiro (*Silybum marianum*). Entre seus compostos estão a silicristina, silidianina, silibina e isosilibina, sendo a silibina o mais potente entre eles (Figura 3). O cardo-leiteiro é um membro da família Asteraceae (família bastante extensa de angiospermas conhecidas como girassóis), que tem uma longa história como fitoterápico hepatoprotetor, possuindo atualmente diversas indicações clínicas para pacientes com doença hepáticas crônicas (MAYER; MYERS; LEE. 2005; STRADER et al., 2002).

A principal ação da silimarina é como antioxidante natural. Como ela é rica em compostos polifenólicos, ela tem grande capacidade de quelar radicais livres e inibir, mesmo que reversivelmente, a ação do citocromo p-450, ou seja, ela interfere no metabolismo e biotransformação de diversas moléculas exógenas e endógenas, de modo seletivo, nas reações de fase I (FRASCHINI et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura química dos compostos polifenólicos do cardo-leiteiro.



Fonte: CALANI et al., 2012.

Outro mecanismo conhecido da silimarina, que auxilia na ação antioxidante, é a capacidade de estabilizar as membranas, tanto celular, quanto mitocondrial (TROUILLAS et al., 2008) por recuperar o potencial dessas membranas (ZHU et al., 2014; VALENZUELA; GARRIDO, 1994). Acredita-se que essa capacidade seja resultado do aumento do aporte antioxidante fisiológico do fígado, pois a silimarina aumenta a produção, as reservas e a liberação dos glutathiona (GSH) no fígado, para mais referências consultar revisão de Raione e colaboradores (2002).

Esses eventos já mostraram na prática que são capazes de proteger o fígado contra diversos eventos adversos, como na NASH induzida por obesidade (CACCIAPUOTI et al., 2013), em modelos murinos de esteato-hepatite alcoólica (ZHANG et al., 2013), em modelos de lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono (TROUILLAS et al., 2008) e contra fibrose hepática induzida por tioacetamida (CHEN et al., 2012).

O fígado é um órgão de extrema importância no organismo, participando de eventos diversos que são importantes desde a nutrição até a proteção do organismo contra agentes tóxicos exógenos, aos quais está constantemente exposto e sujeito a lesões (GUYTON; HALL, 2006). Por possuir uma capacidade regenerativa impressionante, quando comparada a outros órgãos, o fígado consegue funcionar bem se até 20% de seu parênquima total estiver intacto (KUVSHINOV; FONG, 2007). Por isso, essa capacidade de regeneração é vital e a silimarina contribuiria nesse contexto como estimuladora da regeneração hepática (FRASCHINI et al., 2002).

Os dados da literatura mostram a níveis experimentais e clínicos que o tratamento com a silimarina ajuda a recuperar o fígado de forma mais eficaz. Essa ação seria atribuída a ação nuclear e nucleolar dessa droga, que induz aumento da síntese de RNA ribossomal e da síntese de proteínas no fígado (FRASCHINI et al., 2002; RAINONE, 2005).

Por outro lado, outras evidências acerca do mecanismo de ação da silimarina foram relatados, como ações imunomodulatórias e anti-inflamatórias, dentre elas a inibição da produção e secreção mediadores pró-inflamatórios (RAINONE, 2005; POLYAK et al., 2007; KIM et al., 2013). De forma interessante, a IL-6 parece ser fisiologicamente importante para a regeneração hepática, pois após hepatectomia de dois terços do fígado em ratos, os níveis séricos de IL-6 foram encontrados elevados, principalmente na primeira hora em que se iniciava a síntese de DNA nos hepatócitos, seguidos do aumento dos fatores de transcrição: Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 3 (STAT3) e do C/EBP β / fator nuclear-interleucina-6 (NF-IL-6),

indicando que esses mediadores parecem ser importante como gatilho de transição da fase G0 para G1 nos hepatócitos (AKIRA et al., 1990; MAIONE et al., 1998). Além disso, Cressman e colaboradores, observaram que camundongos deficientes de produção de de IL-6 (IL-6 -/-) falhavam em regenerar o fígado após hepatectomia, pois seus hepatócitos ficavam presos na fase G1 de ciclo celular por não conseguir produzir quantidades adequadas de DNA, a suplementação desses animais com IL-6 resultava na normalização da capacidade regenerativa (CRESSMAN et al. 1996). Apesar da silimarina inibir a liberação da IL-6 durante processos inflamatórios no fígado, suas doses terapêuticas não interferiram negativamente na regeneração hepática. Ao contrário, as pesquisas apontam para um aperfeiçoamento dessa capacidade (FRASCHINI et al., 2002).

Há outros diversos relatos terapêuticos da silimarina. Foi demonstrado que ela possui ação anti-viral em infecções de hepatócitos com o vírus da hepatite C (HCV), onde tanto a silimarina bruta quanto uma fração padronizada desta, chamada de MK-001, apresentaram ação tanto preventiva quanto no tratamento da infecção de forma dose dependente (POLYAK et al., 2007). Esses mesmos autores demonstraram, em cultivo de células de origem mononuclear, que a silimarina era capaz de inibir a produção do Fator de Necrose Tumoral-Alpha (TNF- α) e do Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) em uma linhagem de células de hepatoma humano (POLYAK et al., 2007).

Uma limitação da utilização de um hepatoprotetor na terapia do câncer, seria uma interferência na ação citotóxica do medicamento. Com relação a silimarina, os relatos apontam para o oposto. A silimarina apresenta um efeito anti-proliferativo em cânceres de pele com uma ação tanto preventiva, devido a inibição das espécies reativas de oxigênio (EROs), quanto de tratamento, pois ela regula sinalizações de sobrevivência celular e mitose como dos reguladores p53 e Cip1/p21 entre outros. Há ainda dados que sugerem um efeito positivo da silimarina na recuperação do dano causado ao DNA pela radiação ultravioleta (SINGH; AGARWAL, 2005).

Concentrações altas dessa droga demonstraram efeitos antiproliferativos na linhagem Jurkat de células T leucêmicas provenientes de sangue periférico, causando inibição da síntese de DNA, parada no ciclo celular da fase G2 para a M e um aumento significativo da morte celular. Entretanto, neste mesmo delineamento experimental, baixas concentrações apresentavam efeitos pro-proliferativos (GHARAGOZLOO; AMIRGHOFAN, 2007) sugerindo novamente a variabilidade na ação desse medicamento de acordo com a dose administrada.

Com relação aos os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores da silimarina, parecem ser devido a sua ação inibitória sobre o NF- κ B (POLYAK et al., 2007; KIM et al., 2013; LEE et al., 2013), com consequente inibição das vias inflamatórias super expressas por sua ativação, e aumento na expressão dos reguladores da resposta imune Interleucina-10 (IL-10) e Interferon- γ (INF- γ) (RAINONE, 2005; WILASRUSMEE et al., 2002), além de aumentar a produção do antagonista endógeno da IL-1 (IL-1RA) (TÄGER, 2001). Entre as vias alteradas pela inibição do NF- κ B, estão a produção do TNF- α , IL-1 β e IL-6. Essa última é bastante envolvida na polarização da resposta imunológica agindo na maturação e proliferação de células B e T (STREETZ et al., 2000) em um sentido oposto a IL-10, que age, juntamente com outros imunomoduladores, em direção a um padrão imunológico de células Th2 e células T reguladoras (TAGA; TOSATO, 1992; D'ANDREA et al., 1993; HOWARD et al., 1993; DE VRIES, 1995).

Finalmente, os diversos efeitos encontrados frente a administração da silimarina variaram drasticamente de acordo com a dose administrada, sendo encontrados efeitos antioxidantes na maioria das doses, até mesmo em doses reduzidas. Contudo, os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores só começam a ser observados após 10mg/kg. O mais intrigante é que há relatos de efeitos pró-inflamatórios em doses acima de 200 mg/kg em camundongos, intensificando processos inflamatórios, apesar de não ser relatada toxicidade da administração de apenas silimarina até mesmo em doses acima de 500 mg/kg. Esses achados evidenciam a importância do estudo dessa droga em diversas faixas de dosagem, possibilitando a sua utilização em eventos patológicos diversos (FRASCHINI et al., 2002), como na esteato-hepatite induzida por irinotecano.

1.5 Justificativa e relevância

Devido à grande frequência desse problema somada à ampla necessidade do uso do irinotecano por pacientes com CCR e metástases hepáticas, faz-se necessário o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa doença. Além disso, é necessário encontrar alternativas que possibilitem uma melhora na qualidade do parênquima hepático durante e após o tratamento quimioterápico do câncer, para que o paciente tenha mais chances de cura com a remoção cirúrgica do tumor.

A silimarina vem recebendo bastante relatos positivos como hepatoprotetor, como evidenciado nos estudos citados anteriormente. Inclusive, a silimarina já é usada como controle de proteção hepática em alguns modelos usados para testes de novas drogas. Uma evidência pode ser citada no estudo de Obogwu e colaboradores, os autores utilizaram a silimarina como controle para testar a capacidade hepatoprotetora do extrato da folha de *Mucuna pruriens* em um modelo de toxicidade por álcool e drogas antituberculose (OBOGWU et al., 2014).

Contudo, nenhum trabalho foi publicado relatando os efeitos dessa substância sobre a toxicidade a antineoplásicos, não havendo, até onde se conhece, propostas consistentes de medidas terapêuticas. Esse fato pode ser devido, talvez, à ausência até bem pouco tempo, de um modelo confiável de NASH relacionada ao uso de irinotecano (COSTA et al., 2014).

Dessa forma, para a avaliação da capacidade protetora da silimarina e de outros agentes hepatoprotetores, nosso grupo desenvolveu um modelo experimental em camundongos que mimetiza todos os achados clínicos da NASH apresentada por pacientes em quimioterapia com irinotecano (COSTA et al., 2014). Assim, nosso grupo se propôs a estudar a aplicabilidade dessa droga, bem como o mecanismo pelo qual ela agiria nesse contexto. Um objetivo seria aprimorar o tratamento do câncer colorretal metastático para que um maior número de pessoas possa se beneficiar da terapia de conversão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

2.1.1 Estudar o efeito preventivo da silimarina no desenvolvimento de esteato-hepatite não-alcoólica experimental induzida pelo irinotecano.

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Avaliar se a silimarina reduz as alterações dos parâmetros macroscópicos, microscópicos e bioquímicos indicativos de estabelecimento da esteato-hepatite experimental induzida pelo irinotecano.

2.2.2 Verificar se o possível efeito protetor da silimarina seria decorrente da modulação de eventos inflamatórios e da produção de mediadores e de fatores de transcrição inflamatórios.

Investigar se a silimarina diminui o fenômeno de translocação bacteriana envolvida na fisiopatologia da NASH induzida por irinotecano.

2.2.3 Estudar o efeito modulador da silimarina sobre o estresse oxidativo na patogênese da esteato-hepatite induzida por irinotecano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos e reagentes

- Cloridrato de irinotecano (Evoterin®, Evolabis, São Paulo, Brasil, ampola de 100 mg).
- Silimarina S0292 (Sigma Aldrich, MO, USA)
- Anticorpo primário monoclonal de coelho anti-Nitrotirosina (Life Technology, NY, U.S.A.)
- Anticorpo primário monoclonal de coelho anti-TLR-4 (Life Technology, NY, U.S.A.).
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-NF- κ B NLS (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho Anti-Actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário monoclonal de cabra Anti- α -SMA (Sigma Aldrich, MO, U.S.A.)
- Anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina anti-IgG de coelho (Sigma Aldrich, MO, U.S.A.)
- Anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina anti-IgG de cabra (Sigma Aldrich, MO, U.S.A.)
- ImunoCruz – Anti-coelho kit ABC (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)

3.2 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
- Microscópico 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°C Revco Elite Plus – Thermoscientific – EUA
- Leitor de placas modelo ELX 800 – Bio Tek instruments – EUA

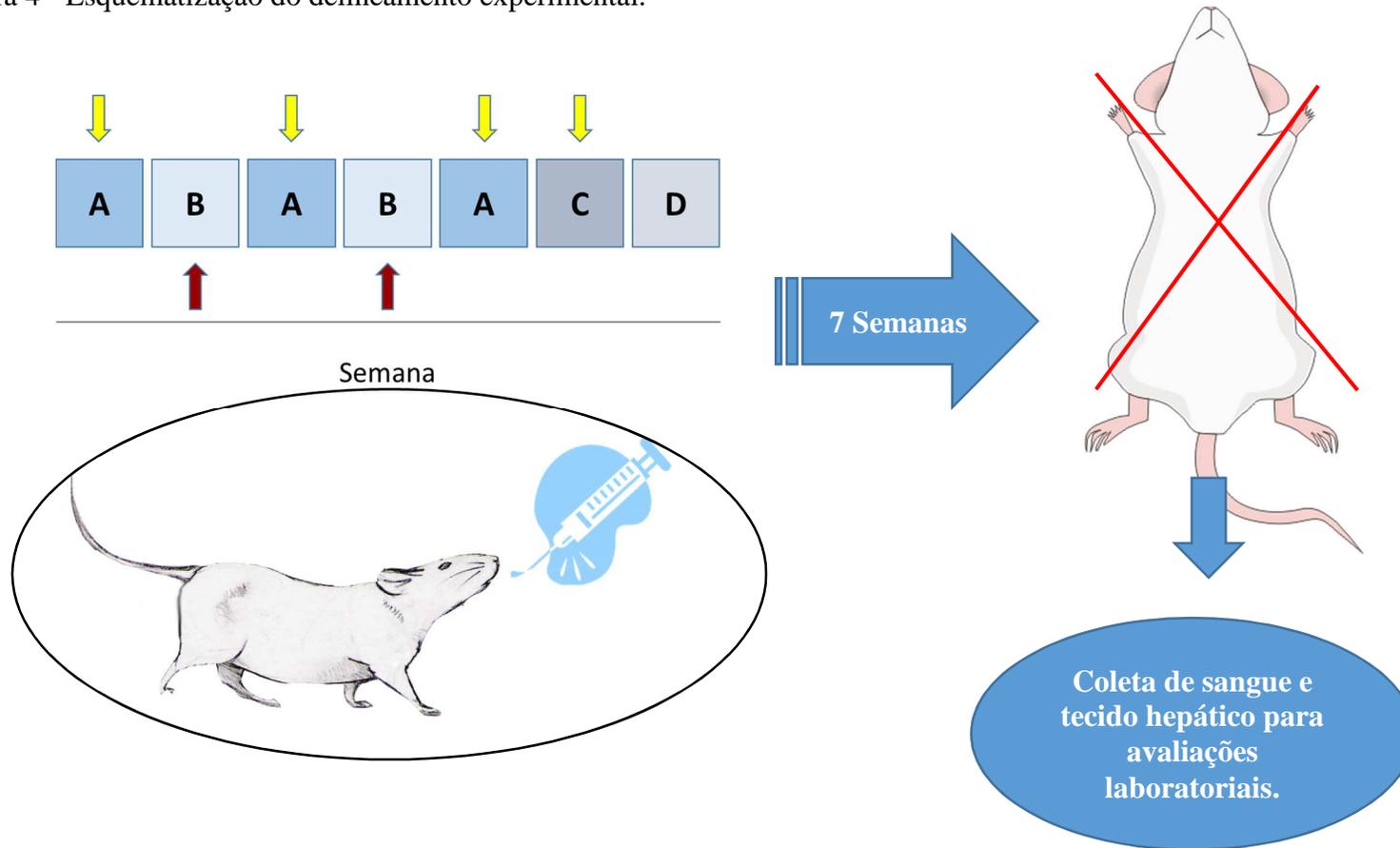
3.3 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas do tipo Swiss, pesando entre 20 a 25g, obtidos junto ao biotério setorial da Faculdade de Medicina/ Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos experimentais (n=8-10) e mantidos todos em um ambiente com controle de temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com acesso livre à alimentação e água e submetidos aos ciclos de claro-escuro (12h/12h). O protocolo experimental seguiu estritamente as regras do Instituto Nacional de Saúde (NIH, do inglês *National Institutes of Health*), nos Estados Unidos, para o cuidado e uso de animais em laboratório e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (número de protocolo 21/12).

3.4 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8-10), conforme a seguir: Grupo I: Salina (5 mL/kg, v.o.); Grupo II: Silimarina (150 mg/kg, v.o.); Grupo III: irinotecano (50 mg/kg, i.p.); Grupos IV: Silimarina (1,5 mg/kg v.o.) + irinotecano (50 mg/kg i.p.); Grupo V: Silimarina (15 mg/kg v.o.) + irinotecano (50 mg/kg i.p.); Grupo VI: Silimarina (150 mg/kg v.o.) + irinotecano (50 mg/kg i.p.). Os animais foram administrados com essas drogas 3 vezes por semana em dias alternados com um reforço da silimarina no dia seguinte a terceira administração, durante 7 semanas consecutivas e, ao final desse período, eutanasiados. Um esquema do delineamento experimental é mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Esquematização do delineamento experimental.



Nos dias A os animais recebem silimarina (1,5, 15 ou 150 mg/kg) ou salina por via oral, 1 hora antes de uma injeção de irinotecano 50 mg/kg ou salina por via intraperitoneal. Nos dias C os animais receberam um reforço de silimarina ou salina em suas respectivas doses por via oral, enquanto nos dias B era realizada uma avaliação ponderal, da diarreia e do estado geral do animal. Em dias D nenhum procedimento era realizado com a manipulação dos animais. As setas amarelas significam dias de administração das drogas nos animais, as setas vermelhas indicam dias de avaliações clínicas dos animais.

3.5 Avaliação clínica dos animais

Nos dias B, os animais eram pesados, um a um, em balança analítica e seus respectivos pesos eram registrados em tabelas. Após a pesagem, os animais eram colocados, um a um, em ambientes isolados onde eram observados por 10 minutos cada, para a avaliação de seu comportamento e seu grau de diarreia.

A diarreia do animal foi quantificada com a atribuição de escores que variavam de 0 a 3. O escore 0 significava fezes com aspecto e consistência normal, sem a presença de sujidade perianal, o escore 1 representava animais com fezes levemente amolecidas mas sem a presença de sujidades perianais. O grau 2 era atribuído a animais com fezes bastante amolecidas mas com pouca sujidade perianal, enquanto os animais com bastante sujidade eram considerados grau 3.

Também se observavam aspectos físicos com animal, como queda e eriçamento de pelo, contrações pélvicas e irritabilidade. Os dados registrados serviram para elaboração de uma curva de sobrevida e uma curva ponderal.

3.6 Dosagens das concentrações plasmáticas de aminotransferases (ALT e AST)

Os camundongos foram sedados com solução de Tribromo a 2.5% (10 mL/kg, i.p.) e tiveram sangue colhido pelo plexo retroorbital. Após centrifugação do sangue a 100 x g/10 min, o plasma foi obtido para análise bioquímica de proteínas totais, alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST). Para a mensuração, utilizou-se um espectrofotômetro em um nível de absorvância de 365 ou 545 nm conforme propriedade, de acordo com a recomendação do fabricante (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brasil). Resumidamente, a ALT e a AST catalisam a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato (ALT) e glutamato e oxalacetato (AST). Este é reduzido a lactato (ALT) ou a malato (AST) por ação da lactato desidrogenase (LDH) ou da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade das enzimas na amostra.

3.7 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 μ m de espessura foram obtidos e depois corados com 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 dos grupos. O diagnóstico e a graduação da NASH foram avaliados conforme o Escore de Atividade da NASH (NAS) proposto por Kleiner et al. (2005), como a seguir: 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 x = grau 0; até 2 infiltrados por campo de 200 X = grau 1; 2 a 4 infiltrados por campo de 200 X = grade 2; > 4 infiltrados por campo de 200 X = grade 3) e tumefação hepatocítica (escore 0 = ausência; escore 1 = leve; escore 2 = severa). A presença concomitante desses três parâmetros histológicos foi necessária para definir NASH.

Nas lâminas histopatológicas também se realizou a contagem do número de infiltrados de neutrófilos por campo, sendo essa contagem feita de modo cego por dois pesquisadores independentes, sendo contatos por peça o total de 10 campos. A escolha do primeiro campo foi de forma aleatória, e os demais campos foram contíguos ao campo anterior.

3.8 Ensaio para dosagem de malonaldeído (MDA)

Amostras de fígado foram homogeneizadas em 100mg/1mL de KCl 1,15% (homogenato 10%). Uma alíquota de 500 μ L do homogenato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionados 3 mL de H₃PO₄ 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 535 nm. 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).

3.9 Determinação dos grupos sulfidrílicos não-protéicos (SH-NP)

Amostras de fígado foram homogeneizadas em 100 mg/1 mL de EDTA sódico 0,02M gelado. Alíquotas de 400 μ L do homogenato foram adicionadas a 320 μ L de água destilada, 80 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Após centrifugação, 200 μ L do sobrenadante foram coletados e, em seguida, 400 μ L de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 10 μ L de DTNB 0,01M foram acrescidos para determinação da absorbância dentro de 5 min a 412 nm. O branco não continha homogenato. A concentração de SH-NP foi calculada através da equação da reta de regressão obtida de uma curva de calibração de glutathiona reduzida (GSH) e expressa em μ g de SH-NP/500 mg de tecido (Boyd et al. 1979).

3.10 Determinação de lipídeos no tecido hepático

As amostras do fígado foram analisadas para determinação da quantidade de lipídeos de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959). Rapidamente, 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 foi adicionada atingindo a proporção final (2:2:1 clorofórmio:metanol:água). A mistura foi centrifugada na temperatura ambiente a 200 X g/2 min dando origem a um sistema com duas fases (polar em cima, apolar embaixo). A fase inferior foi recuperada e o total de lipídeos foi calculado (mg de lipídeos/g amostra) após total evaporação da amostra (100 °C).

3.11 Reação Imunohistoquímica para iNOS, N-Tyr e TLR-4

A partir das amostras de fígado foi realizada uma análise imunohistoquímica para iNOS, N-Tyr e TLR4, conforme descrito a seguir: as peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação, promoveu-se uma recuperação antigênica com tampão citrato 0,1 M (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 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), AntiN-Tyr e Anti-TLR4 (Life Technology, Life®, NY) diluídos em PBS – BSA 5% na proporção de 1:400 (iNOS e TLR4) ou 1:800 (N-Tyr). 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 1:200. 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 H₂O 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 o número de células marcadas por campo foi contado em 10 campos das lâminas marcadas com iNOS e TLR4, enquanto as lâminas marcadas com N-tyr foram quantificadas utilizando o programa de processamento de imagem Fiji/ImageJ (Schindelin et al. 2012).

3.12 Análise do envolvimento de bactérias na NASH e nos tratamentos com a silimarina

Para determinar a participação de uma possível translocação bacteriana a partir da microbiota intestinal dos animais, amostras do fígado foram coletadas em condições estéreis, homogeneizadas em tampão de trisol para a extração do DNA utilizando o kit da Qiagen, realizada de acordo com as especificações do fabricante. A reação em cadeia de polimerase foi realizada como descrita a seguir:

3.12.1 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Como evidenciado na Tabela 1, avaliou-se a presença do gene *E. coli* 16SrRNA(rrs) relacionado com a detecção da *Escherichia coli* com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) (QUETZ et al., 2012). O gene de referência utilizado foi o PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A). (TATSUMI et al., 2008)

Para a reação foram utilizados 10 µL de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, San Diego, CA, USA), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 3 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease para um volume final de 20 µL. Os iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão descritos na Tabela 1. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de *melting*, realizada para assegurar a especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do *quantification cycle* (Cq) para os genes testados foram exportados para o programa Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativos de expressão do gene rrs foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, qual $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1 - Detalhamento dos primers utilizados na reação de PCR.

Processo Relacionado	Genes	Sequências dos iniciadores (5' - 3')	Produto (pb)	n° NCBI	Condições do PCR
Detecção de <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	S – CCCCTGGACGAAAGACTGAC	401	JN547259.1	95°C-20''
	16SrR	AS – ACCGCTGGCAACAAAGGATA			63°C-20''
	NA				72°C-45''
Referência	PPIA	S – AATGCTGGACCAAACACAAA AS – TTCCACAATGTTTCATGCCTT	117	NM_008907.1	95°C-20'' 58°C-20'' 72°C-45''

3.13 Análise de expressão do NF-κB e α-SMA por Western Blot

Os fígados dos animais foram homogeneizados em tampão de RIPA (Tris 50mM; NaCl 150mM; EDTA 1mM; Triton 1%) e em seguida centrifugadas (1500g/10min.), seus sobrenadantes foram separados em um eppendorf devidamente rotulado. A quantidade total de proteínas de cada amostra foi mensurada utilizando-se o *kit* BioRad® com uma curva de BSA de 6 pontos. Os volumes foram ajustados para que as quantidades de proteínas fossem equivalentes em cada amostra para então separar as proteínas por eletroforese em um gel SDS-PAGE. Após a separação, as proteínas foram transferidas, também por eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose onde foram incubadas com uma solução de leite desnatado (Nestlé®) a 5% em tampão TBS-T (Tris-NaCl com 1% de Tween 20), durante 2 horas. Após esse período as

membranas foram lavadas 3 vezes, cada lavagem com 10 minutos de duração, utilizando o tampão TBS-T, procedeu-se então a incubação das membranas com anticorpos primários equivalentes a cada dosagem. Os anticorpos primários foram diluídos em Tampão TBS (Tris-NaCl) na proporção de 1:600, e deixados em contato com a membrana sobre refrigeração e agitação branda durante todo o período da noite. Na manhã seguinte as membranas foram novamente lavadas e os anticorpos secundários, diluídos em leite desnatado a 5%, foram incubados durante 2 horas. Após esse período uma nova lavagem foi realizada e as marcações foram reveladas utilizando-se o corante BCIP®/NBT (Sigma Aldrich).

3.14 Análise de expressão do IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA

A produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram mensuradas através da determinação quantificação dessas citocinas no fígado. As amostras do tecido hepático foram colhidas, centrifugadas (1500g/10min.) e o procedimento de ELISA foi realizado como descrito a seguir: (1) Incubação com 2 μ g/ml de anticorpo anti-IL-1 β anti IL-6 e anti IL-10 (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100 μ l/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4° C; (2) Lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) Bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 2h à temperatura ambiente; (4) Lavagem da placa (3x); (5) Incubação com a curva padrão de IL-1 β , IL-6 e IL-10 diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ l/poço por 16-24h à 4° C); (6) Lavagem da placa (3x); (7) Incubação com anticorpo biotilado (anticorpo de detecção) diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente; (8) Lavagem da placa (3x); (9) Incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 15 min à temperatura ambiente; (10) Lavagem da placa (3x); (11) Incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μ l/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente; (12) A reação foi parada com 150 μ l/poço de H₂SO₄ 1M; (13) Leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos em μ g/ml como a curva padrão.

3.15 Análise estatística

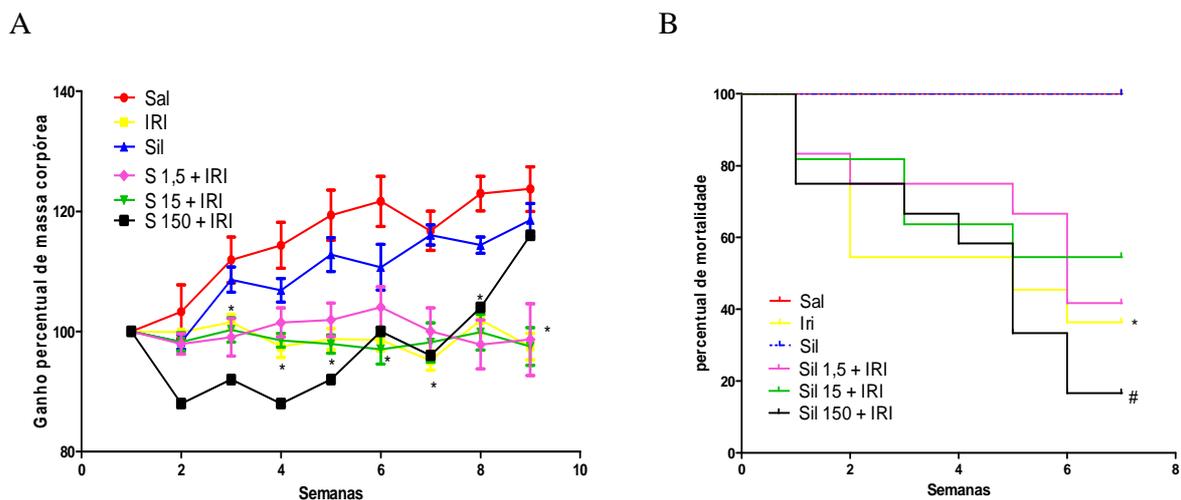
A análise estatística realizada nas curvas de poderais foi o teste Two-way ANOVA. Para os dados observados em que foram atribuídos escores, utilizou-se o teste para dados não paramétricos de Kruskal Wallis/Teste de múltiplas comparações de Dunn. Para as demais amostras, empregou-se o teste ANOVA/Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (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 sobrevivida foi expressa em termos de percentagem de animais vivos, realizando-se o teste de Mantel-Cox log rank para determinar a diferença entre as curvas. Um valor de $p < 0,05$ foi aceito como significante.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com silimarina sobre a diarreia, perda ponderal e sobrevida em animais submetidos a NASH induzida pelo irinotecano.

Os animais submetidos ao modelo de NASH induzida pelo irinotecano apresentaram aumento tanto na perda ponderal e na mortalidade (Figura 5) quanto na diarreia (Tabela 2), quando comparados ao grupo que recebeu apenas salina ($p < 0,05$). A silimarina não foi capaz de prevenir nem a mortalidade nem a perda de peso desses animais em nenhuma das doses utilizadas ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo irinotecano. Adicionalmente, o irinotecano frequentemente induziu diarreia da segunda até quinta semana, quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$). A diarreia grave foi observada apenas até a terceira semana e após isso os animais passaram a não mais apresentar esse parâmetro. A silimarina em nenhuma das doses foi capaz de prevenir o aparecimento desse achado ($p < 0,05$). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 5 - O tratamento com a silimarina não interfere na mortalidade e na curva ponderal dos animais injetados com irinotecano.



A injeção de irinotecano aumenta a perda ponderal e a mortalidade dos animais quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$), sendo observada significância estatística na perda ponderal a partir da terceira semana de tratamento (A), essa perda de peso se iniciou no mesmo período de tempo em que os animais começaram a morrer (B). Adicionalmente o pré-tratamento com a silimarina não mostrou eficácia em diminuir a perda ponderal e a

mortalidade em nenhuma das doses testadas. Os * significam diferença estatística do grupo irinotecano ao ser comparado com o grupo salina, com $p < 0,05$ para o teste Two-way ANOVA para curva ponderal e Mantel-Cox log rank para curva de sobrevivência. Os # significam a diferença estatística observada ao compararmos os grupos teste com o grupo irinotecano, com $p < 0,05$ ($n=9$).

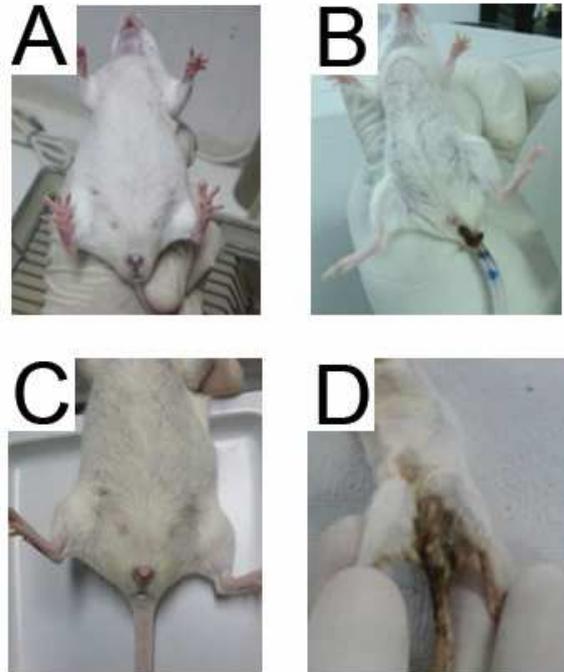
Tabela 2 - Avaliação da diarreia em animais submetidos a NASH induzida pelo irinotecano e tratados com silimarina

	Escore semanal de diarreia					
	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	5ª Semana	6ª Semana	7ª Semana
Sal	0,5 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
Sil	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
Iri	2 (0-3)*	2 (0-3)*	1 (0-2)*	1 (0-1)*	0,5 (0-2)	0,5 (0-1)
S 1,5+IRI	1 (1-3)#	1,5 (1-3)#	1 (1-2)#	1 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)
S15+IRI	1 (1-3)#	1 (0-2)#	1 (1-2)#	1 (1-1)#	1,5 (0-2)	0,5 (0-2)
S150+IRI	1 (1-2)	1 (0-1)	1 (0-2)#	1 (0-1)	1 (0-3)	0

A injeção de irinotecano induziu o aparecimento de diarreia moderada e grave nos animais estudados, sendo observada significância estatística, ao comparar-se com o grupo salina, da segunda à quinta semana. O tratamento com a silimarina não foi capaz de prevenir o aparecimento de diarreia em nenhuma das doses testadas. Os * significam diferença estatística do grupo irinotecano quando comparado ao grupo salina, com $p < 0,05$ no teste de Kruskal-Wallis/Teste de Múltiplas comparações de Dunn. Enquanto os # representam a significância estatística ao comparar-se os grupos teste com o grupo salina com a mesma margem de aceitação para o referido teste. ($n=9$).

Após a quinta semana os animais não apresentaram diarreia, quando então passaram a apresentar contrações de abdômen e pelve em todos os grupos injetados com irinotecano. Esse achado se antecipou no grupo tratado com silimarina 150 mg/kg, quando comparado com o grupo irinotecano. Além disso, verificou-se a perda ponderal, eriçamento de pelo e alopecia nesses animais durante todo o período experimental (Figura 6).

Figura 6 - Principais parâmetros clínicos observados frente a administração de irinotecano.

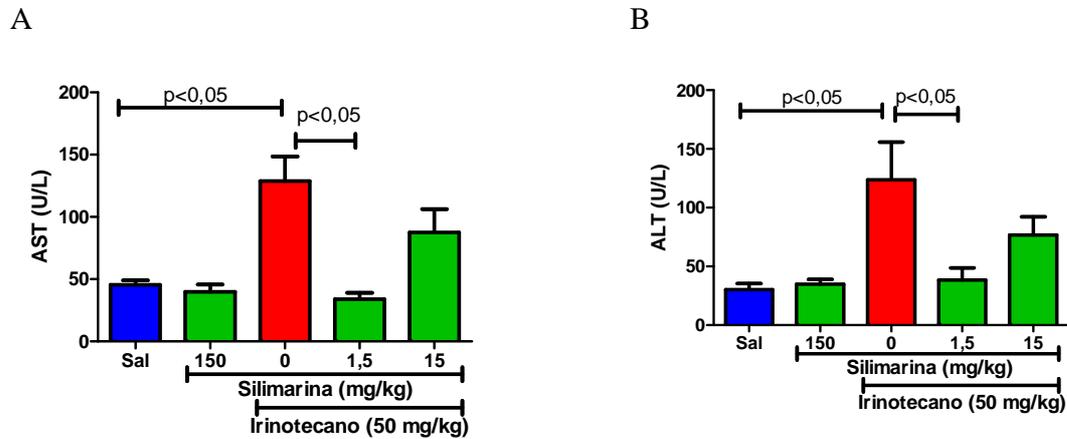


Comparação da alopecia do grupo salina (A) com a do grupo irinotecano (B) e ilustração da sujidade perianal do grupo salina (C) e do grupo irinotecano (D).

4.2 Marcadores bioquímicos e histopatológicos de lesão hepática.

Na indução da NASH o irinotecano alterou todos os parâmetros de toxicidade hepáticas avaliados nesse trabalho, ao comparamos esses mesmos parâmetros no grupo salina. A quantidade sérica de transaminases hepáticas foi significativamente aumentada pela injeção do irinotecano quando comparada ao grupo salina ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com silimarina 1,5 mg/kg aboliu esse aumento do ALT e do AST (Figura 7). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 7 - Dosagem sérica de transaminases hepáticas.

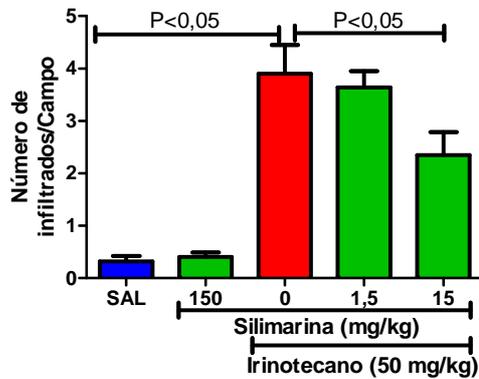


Os animais com NASH induzida por irinotecano apresentam elevação nas quantidades de transaminases hepáticas circulantes e o tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg aboliu o aumento nas quantidades plasmáticas de AST (Painel A) e de ALT (Painel B) (n= 5 – 7; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

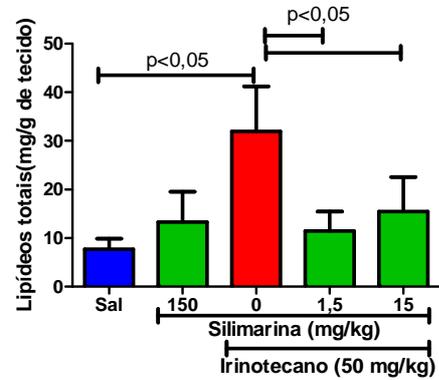
Com relação ao infiltrado neutrofílico, os animais injetados com o irinotecano apresentaram um aumento significativo no número de infiltrados por campo, quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 8). Também observou-se que o tratamento com a silimarina na dose de 15 mg/kg reduziu o número de infiltrados de neutrófilos quando comparados com os animais do grupo irinotecano ($p < 0,05$). No que diz respeito ao acúmulo de lipídeos, o irinotecano aumentou essa quantidade hepáticos quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$), e a silimarina por sua vez, aboliu esse acúmulo de lipídeos em ambas as doses testadas quando comparadas ao grupo irinotecano ($p < 0,05$). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 8 - Contagem de infiltrados neutrofílicos e dosagem bioquímica de lipídeos.

A



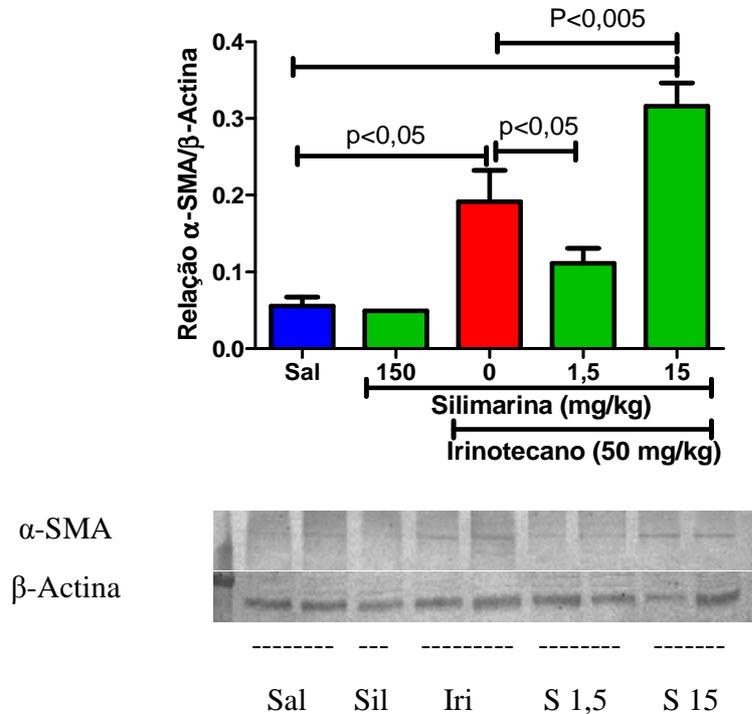
B



O irinotecano aumentou de forma significativa o número de infiltrados neutrofílicos no fígado, e o tratamento com a silimarina na dose de 15mg/kg reduziu o número desses infiltrados (A). A dosagem bioquímica de lipídeos, mostrou que a silimarina foi capaz de abolir o aumento no acúmulo de lipídeos causado pela injeção de irinotecano em todas as doses testadas (B) (n = 4 – 5; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

Os animais submetidos ao modelo de NASH induzida pelo irinotecano apresentaram um aumento na expressão de α -SMA quando comparados com os animais do grupo salina ($p<0,05$). Adicionalmente, o tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg foi capaz de reduzir essa deposição quando comparado ao grupo irinotecano ($p<0,05$), enquanto o tratamento com a dose de 15 mg/kg aumentar essa deposição (Figura 9). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p<0,05$).

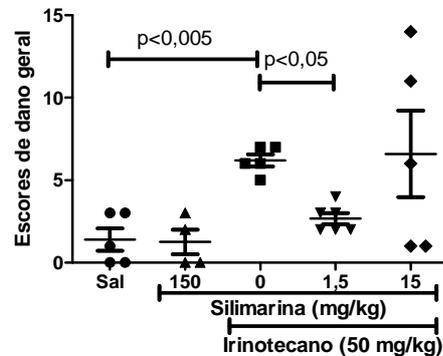
Figura 9 - O efeito da silimarina sobre a expressão hepática de α -SMA.



A injeção de irinotecano durante 7 semanas levou ao aumento da expressão de α -SMA quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$). O tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg conseguiu reduzir essa expressão quando comparado com o grupo irinotecano, porém o tratamento com a dose de 15 mg/kg intensificou essa expressão quando comparado com o grupo irinotecano ($n = 3$; One-way ANOVA / Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

A injeção do irinotecano causou um aumento no escore de Kleiner atribuído aos animais desse grupo, quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$). Adicionalmente, o tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg foi eficaz em reduzir esses escores quando comparados ao grupo irinotecano ($p < 0,05$) (Figura 10). O detalhamento desses escores é descrito na Tabela 3.

Figura 10 - Sumário dos escores de Kleiner.



A indução da NASH com o irinotecano aumentou de forma significativa os escores de Kleiner quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$). O tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg foi capaz de reduzir esses escores de forma significativa quando comparado ao grupo irinotecano ($p < 0,05$) ($n = 4 - 5$; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

Tabela 3 - Estratificação dos escores de Keliner.

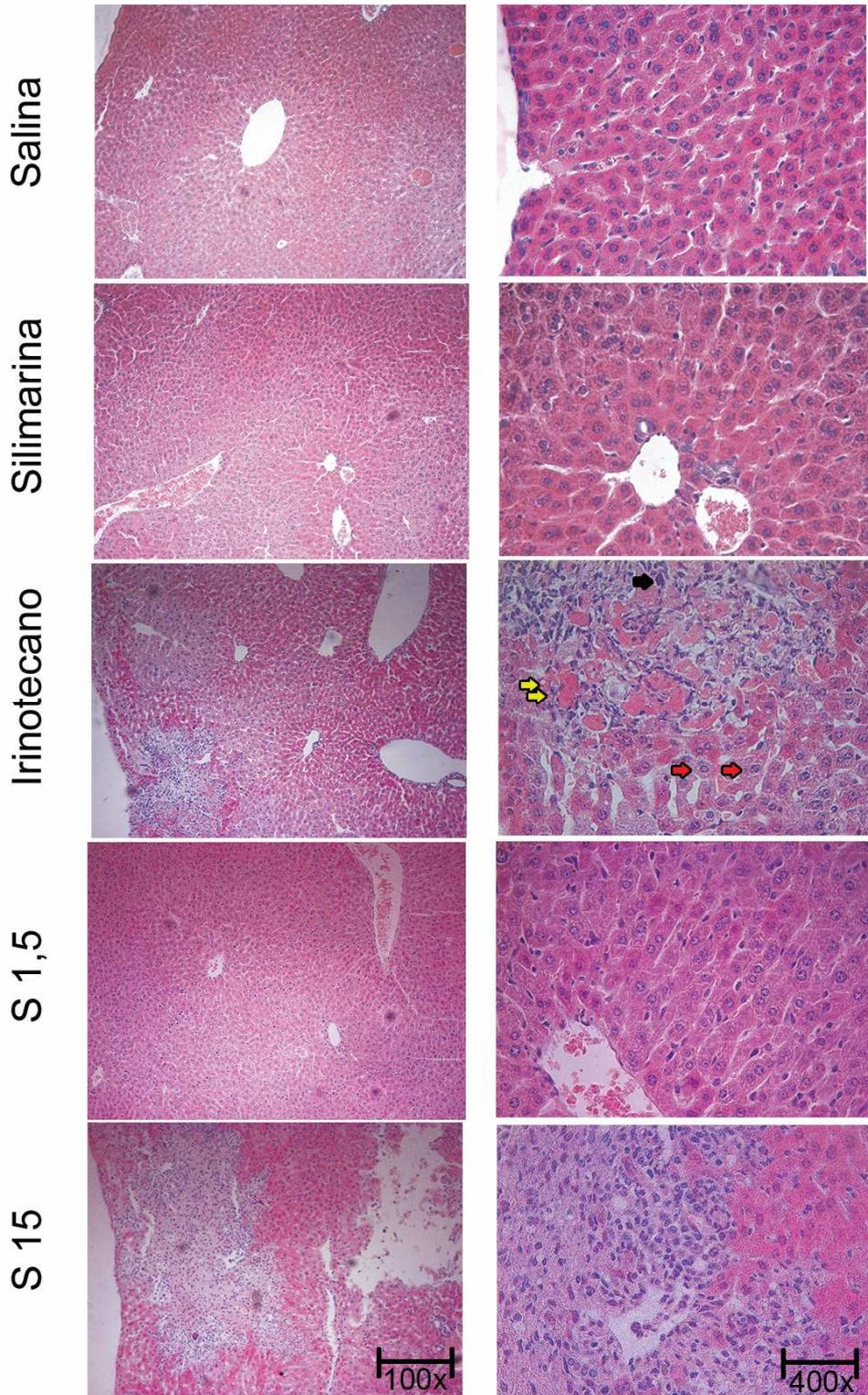
	Escores de Kleiner			
	Infiltração Lobular	Esteatose	Balonização	Total
Salina	1(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	1(0-2)
Silimarina 150	0,5(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0,5(0-2)
Irinotecano	1,5(1-2)	0(0-1)	1,5(1-2)*	3(3-4)*
Sil 1,5 + Iri	1,5(1-2)	0(0-1)	0(0-0)#	2(1-2)#
Sil 15 + Iri	1(1-3)	0(0-0)	0(0-2)	1(1-5)

A injeção de irinotecano aumentou de forma significativa o somatório dos escores de Kleiner quando comparado aos escores do grupo salina ($p < 0,05$), e o tratamento com a silimarina foi capaz de reduzir o somatório desses escores. Os * significam diferença estatística do grupo irinotecano quando comparado com o grupo salina, com $p < 0,05$ no teste de Kruskal-Wallis/Teste de Multiplas comparações de Dunn. Enquanto os #, significam diferença estatística na comparação entre o grupo teste e o grupo irinotecano com $p < 0,05$ no teste de Kruskal-Wallis/Teste de Multiplas comparações de Dunn ($n = 4 - 5$).

A Figura 11 representa as fotomicrografias dos fígados dos animais do estudo, onde é possível observar no grupo irinotecano o desarranjo do parênquima hepático, a balonização (setas vermelhas), a esteatose (setas amarelas) e os infiltrados (setas pretas) contrastando com o grupo

salina. Além disso, o grupo controle silimarina (150 mg/kg, figura) também apresentou, como o grupo salina, arquitetura hepática normal. O grupo tratado com silimarina 1,5 mg/kg apresenta um parênquima mais íntegro, quando comparado com o grupo irinotecano, observando-se o arranjo cordonal de hepatócitos e dos sinusoides e preservação da arquitetura. Os animais que receberam 15 mg/kg de silimarina apresentam áreas extensas de necrose e a arquitetura tecidual comprometida.

Figura 11 - Fotomicrografia do tecido hepático de animais submetidos a NASH induzida pelo irinotecano.



A injeção de irinotecano induz uma destruição do parênquima hepático, onde é possível se

observar balonização (setas vermelhas), esteatose (setas amarelas), infiltrações (setas pretas) e áreas de necrose. Os animais pré-tratados com silimarina 1,5 mg/kg apresentam uma arquitetura integra dos hepatócitos muito semelhante a observada no grupo controle, apesar de haverem numerosos infiltrados inflamatórios. Os animais que receberam 15 mg/kg de silimarina como tratamento apresentam grande variabilidade individual nos resultados, além padrões de lesão muito avançados não condizentes com NASH, onde se pode observar grandes áreas de necrose. A coloração utilizada foi H&E.

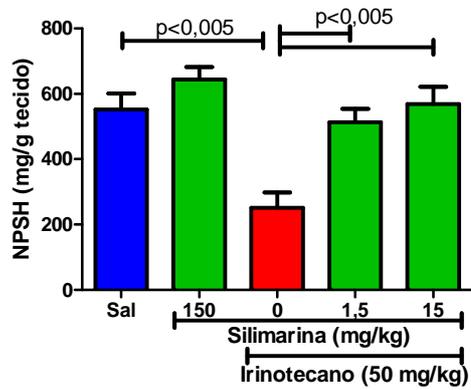
4.3 Efeito da silimarina sobre os componentes oxidativos da NASH induzida pelo irinotecano.

A indução da NASH com irinotecano causou um aumento significativo do acúmulo de MDA no tecido hepático e uma diminuição significativa na quantidade de NPSH disponíveis nesse órgão, quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$). O tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg preveniu o aparecimento desses parâmetros de forma significativa quando comparados ao grupo irinotecano ($p < 0,05$). A dose de 15 mg/kg de silimarina não apresentou redução significativa de MDA. Contudo, a quantidade de NPSH nos fígados dos animais tratados com 15 mg/kg de silimarina estava significativamente aumentada ($p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo irinotecano (Figura 12). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

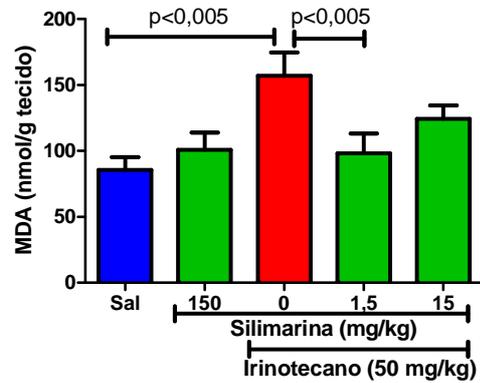
O estresse oxidativo foi observado também pela expressão da enzima iNOS (Figura 13) e pela quantificação dos resíduos de NTyr (Figura 14) no tecido hepático. No grupo irinotecano, observou-se um aumento tanto da expressão de iNOS quanto da presença de resíduos de NTyr, quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$). O tratamento com silimarina na dose de 1,5 mg/kg não preveniu o aumento na expressão de iNOS quando comparados com o grupo irinotecano ($p > 0,05$), entretanto, reduziu de forma significativa a marcação para NTyr, quando comparado ao grupo irinotecano ($p < 0,05$). Adicionalmente, a silimarina na dose de 15 mg/kg também foi capaz de reduzir a quantidade de resíduos de NTyr acumulados quando comparados com o grupo irinotecano ($p < 0,05$). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 12 - Efeito da silimarina no acúmulo de MDA e redução do NPSH causados pela indução de NASH pelo irinotecano.

A

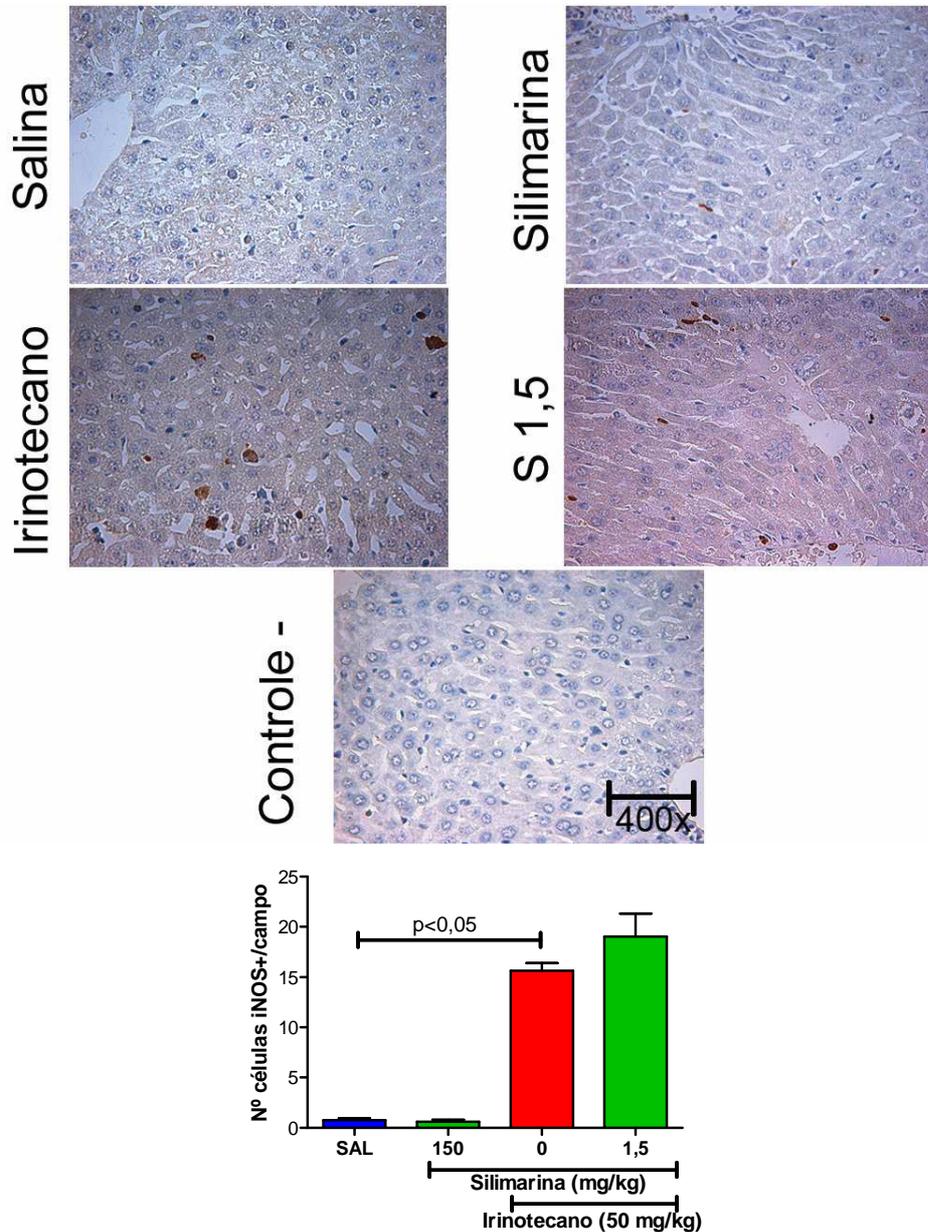


B



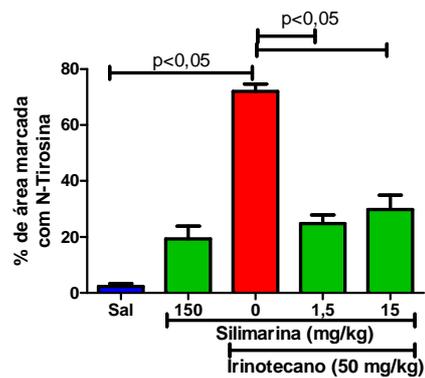
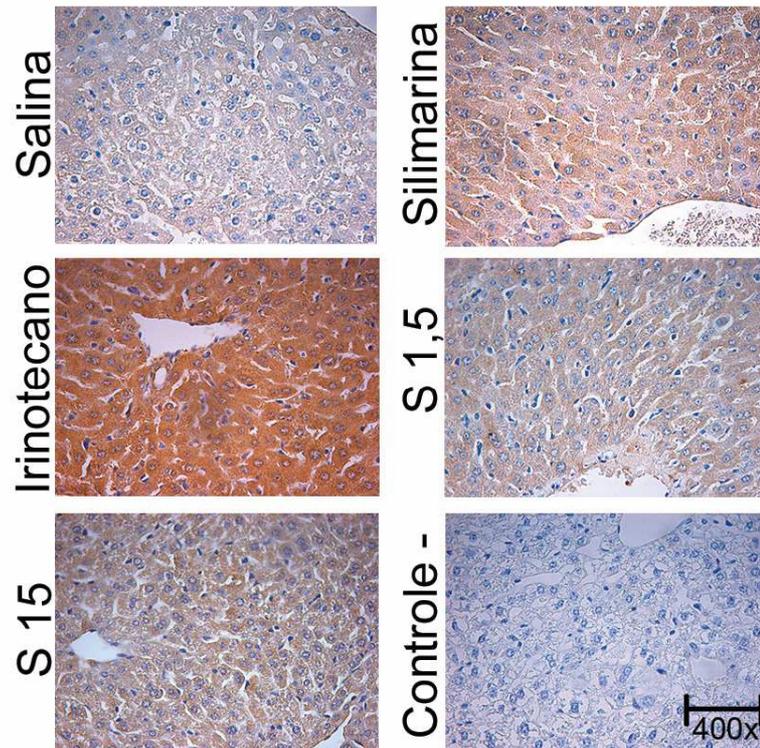
O modelo de NASH induzida pelo irinotecano causa uma diminuição da maquinaria antioxidante fisiológica no fígado e um aumento no acúmulo de MDA. O tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg reduziu o acúmulo e aumentou de forma significativa as quantidades disponíveis de NPSH. A dose de 15 mg/kg interferiu de forma significativa apenas na disponibilidade de NPSH (n = 5 - 6; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

Figura 13 - Efeito da silimarina na expressão de iNOS observada no modelo de NASH induzida pelo irinotecano.



O modelo de NASH relacionado ao uso de irinotecano induz um aumento significativo na expressão de iNOS quando comparados ao grupo salina ($p < 0,05$) e o tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg não interfere nessa expressão ($n = 6 - 8$; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

Figura 14 - Efeito da silimarina sobre a nitrosilação proteica do tecido hepático de animais submetidos a indução de NASH pela injeção de irinotecano.



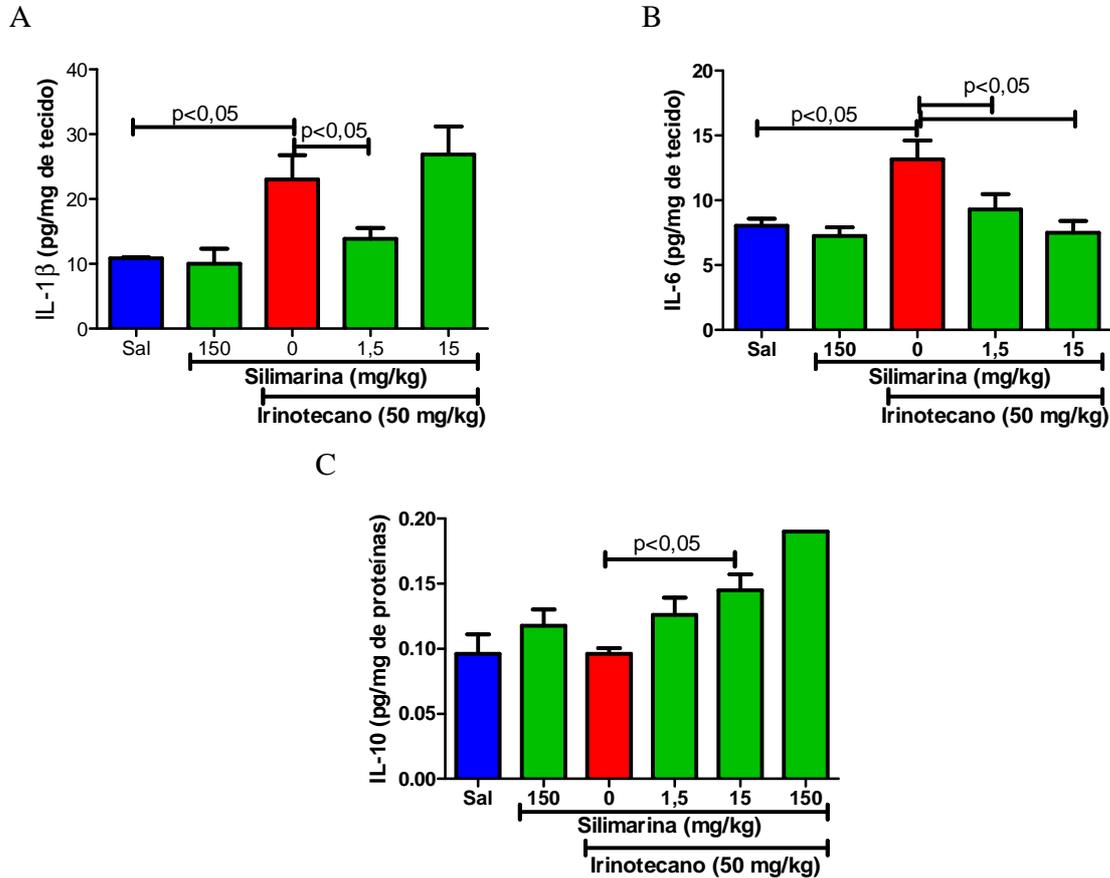
A injeção de irinotecano aumenta a nitrosilação proteica quando comparada a injeção de salina ($p < 0,05$). O tratamento com a silimarina é capaz de prevenir a nitrosilação das proteínas dos animais submetidos a esse modelo ($p < 0,05$) ($n = 4 - 6$; One-way ANOVA / Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

4.4 Efeito da silimarina sobre os componentes inflamatórios do modelo de NASH induzida pelo irinotecano.

A IL-1 β (Figura 15 A) e a IL-6 (Figura 15 B) encontravam-se aumentadas nos fígados dos animais que receberam irinotecano, quando comparadas com o grupo salina ($p < 0,05$). Adicionalmente, o tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg foi capaz de reduzir o acúmulo das duas citocinas, enquanto a dose de 15 mg/kg reduziu apenas a expressão IL-6, quando comparadas com o grupo irinotecano ($p < 0,05$). A expressão IL-10 (Figura 15 C) não foi alterada nos animais injetados com irinotecano, quando comparados com o grupo salina ($p < 0,05$), porém o tratamento com silimarina na dose de 15 mg/kg apresentou um aumento significativo nos níveis hepáticos dessa interleucina ($p < 0,05$). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

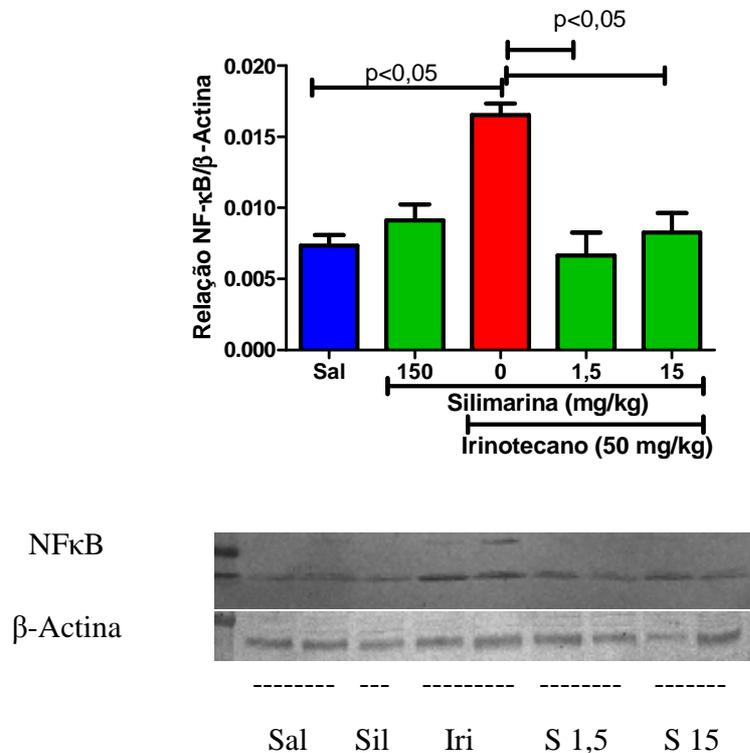
A expressão do NF κ B (figura 16) também se encontrava aumentada nos animais injetados com irinotecano quando comparados com os animais do grupo salina ($p < 0,05$). Em adição, o tratamento com a silimarina reduziu a expressão do NF κ B em relação ao grupo irinotecano ($p < 0,05$) em todas as doses testadas. O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Figura 15 - Efeito do tratamento com silimarina na dosagem de citocinas no tecido hepático de animais submetidos a indução de NASH pelo uso de irinotecano.



No modelo de NASH induzida por irinotecano a IL-1 β (A) e a IL-6 (B) têm sua expressão significativamente aumentada no fígado dos animais injetados com irinotecano quando comparados com os animais injetados apenas com salina ($p < 0,05$). O tratamento com silimarina na dose de 1,5 mg/kg é capaz de reduzir a liberação de ambas as citocinas, enquanto a dose de 15 mg/kg é capaz de reduzir apenas a IL-6. Em contraste, encontramos a IL-10 (C) não alterada no grupo irinotecano quando comparado com o grupo salina ($p < 0,05$), porém o tratamento com a silimarina na dose 15 mg/kg aumenta essa expressão. A dose de 150 mg/kg mostra uma tendência a um aumento, porém não havia amostras suficientes para se fazer uma comparação ($n = 4 - 6$; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

Figura 16 – Expressão relativa de NFκB no fígado de animais submetidos ao modelo de NASH induzida pelo irinotecano e tratados com silimarina.



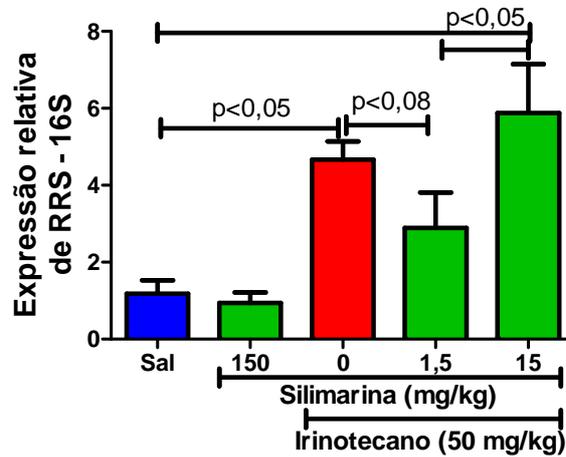
A injeção de irinotecano durante 7 semanas levou ao aumento da expressão de NFκB quando comparados com o grupo salina ($p<0,05$). O tratamento com a silimarina conseguiu reduzir essa expressão quando comparado com o grupo irinotecano ($p<0,05$) ($n = 2 - 4$; One-way ANOVA /Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

4.5 Efeito da silimarina na expressão de TLR4 e presença de bactérias no fígado.

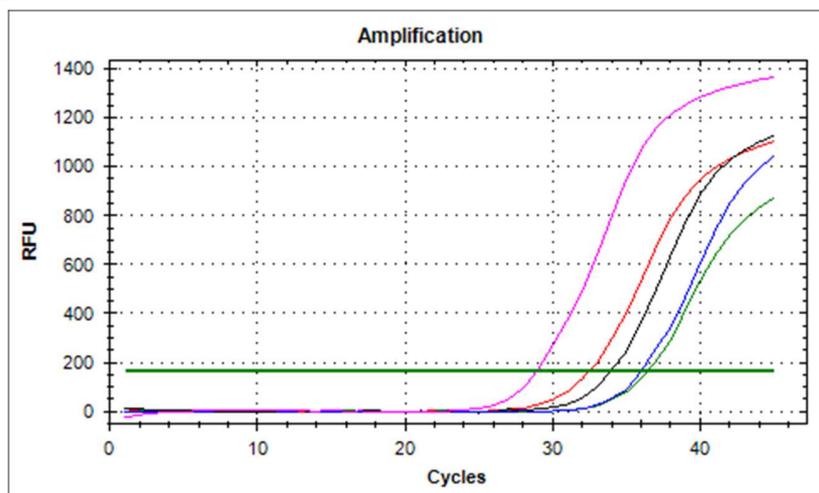
A Figura 17 mostra o aumento significativo da quantidade DNA bacteriano no fígado dos animais submetidos NASH induzida pelo irinotecano quando comparados ao grupo salina ($p<0,05$). Adicionalmente, a silimarina não teve interferência significativa na quantificação desse DNA bacteriano. Convergentemente, grupo irinotecano apresentou uma imunexpressão de TLR4 (Figura 18) significativamente aumentada quando comparados com o grupo salina ($p<0,05$), enquanto o tratamento com silimarina na dose de 1,5 mg/kg, mas não na dose de 15 mg/kg, foi capaz de reduzir essa expressão versus o grupo irinotecano ($p<0,05$). O grupo controle da silimarina não apresentou diferença quando comparado ao grupo salina ($p<0,05$).

Figura 17 - Detecção da presença de DNA bacteriano no tecido hepático através de PCR em tempo real.

A



B



Os animais do grupo irinotecano apresentam um significativo menor CT quanto comparados ao grupo salina (A), e o tratamento com a silimarina não apresenta diferença na quantidade de DNA bacteriano amplificado em nenhuma das doses. Em B é possível observar as curvas de CT do grupo salina (azul), do grupo silimarina (verde) do grupo irinotecano (vermelho), silimarina 1,5 mg/kg (preto) e silimarina 15 mg/kg (rosa) (n = 3 - 6; One-way ANOVA / Teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls).

conseguiu modular a maioria dos marcadores de lesão hepática, além disso, conseguiu modular os parâmetros oxidativos prevenindo a exacerbação do processo inflamatório.

Tabela 4 - Resumo dos achados observados alterados ou não pelo tratamento com a silimarina.

Parâmetros	S 1,5	S 15
Sobrevida	-	-
Perda ponderal	-	-
Escore de diarreia	-	-
ALT e AST	+	-
Contagem de infiltrados	-	+
α -SMA	+	-
Escores de Kleiner	+	-
MDA	+	-
NPSH	+	+
iNOS	-	
NTyr	+	+
IL-1 β	+	-
IL-6	+	+
IL-10	-	+
NF κ B	+	+
RRS	-	-
TLR4	+	-

5 DISCUSSÃO

A silimarina é uma mistura de compostos com ações antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antivirais e antiproliferativas, sendo essas ações bastante variáveis de acordo com a dose e a via de administração. Suas indicações clínicas mais frequentes incluem doenças hepáticas, como a doença alcoólica do fígado gorduroso e hepatite viral. Contudo, até onde conhecemos não há relatos, de sua aplicabilidade como tratamento curativo para, ou profilático contra, lesões hepáticas relacionadas ao tratamento oncológico.

Dessa forma, o presente trabalho descreveu o efeito dessa droga sobre a esteato-hepatite induzida pelo irinotecano. Verificou-se que a ação da silimarina é dual, onde seu efeito protetor é observado apenas em baixas doses, enquanto doses maiores contribuem para uma exacerbação do dano hepático associado ao uso do irinotecano. Além disso, esses resultados dão suporte aos dados de Costa e colaboradores (2014) acerca da importância da oxidação, da inflamação e da translocação bacteriana na fisiopatologia da NASH relacionada ao irinotecano, uma vez que a silimarina ao inibir o estresse oxidativo conseguiu proteger o fígado na NASH. Em contrapartida, o aumento dessa inibição associado à modulação da resposta imunológica, permitiu uma maior presença de bactérias no parênquima hepático, possivelmente contribuindo para o agravamento do dano.

É reconhecido, ainda, que o irinotecano causa uma mucosite intestinal importante que cursa com diarreia grave contribuindo para a diminuição de peso corpóreo e mortalidade (MELO et al., 2008; LIMA-JÚNIOR et al., 2012). O padrão de diarreia descrito nos trabalhos que descrevem a mucosite intestinal experimental induzida pelo irinotecano é, de fato, mais grave que o aqui observado. Esse fato pode ser explicado pela dose utilizada, uma vez que, naqueles estudos, o irinotecano é injetado na dose de 75 mg/kg/dia/4 dias. Entretanto, no presente estudo trabalhou-se com a dose de 50 mg/kg. Após a 5ª semana de tratamento, os animais do grupo modelo passam a não mais apresentar diarreia. Contudo, verificaram-se contrações pélvicas condizentes com cólica. Esse fenômeno foi observado inclusive em animais tratados com silimarina. Como o tratamento com a silimarina não protegeu os animais da diarreia em nenhuma das doses testadas, é provável que não tenha protegido também da mucosite intestinal associada a este sinal, possivelmente explicando a perda ponderal e a elevada mortalidade.

Esses dados corroboram com a literatura. Vargas-Mendoza e colaboradores (2014) demonstraram que a silimarina, apesar de atenuar a lesão hepática, não parece influenciar a sobrevida dos pacientes com cirrose alcoólica. Além disso, a silimarina pode não ter apresentado efeito sobre a mucosite, pois após sua administração oral, ela apresenta uma recirculação entero-hepática tão intensa que sua concentração hepática é 4 vezes maior que sua concentração plasmática (RAIONE, 2005).

Com essas informações a acerca do estado clínico dos animais, questionou-se se a silimarina apresentaria efeito positivo sobre a lesão hepática característica da NASH induzida pelo irinotecano. Para isso, avaliaram-se os parâmetros gerais de lesão hepática, como, por exemplo, a dosagem plasmática de transaminases hepáticas, a infiltração neutrofílica, o acúmulo de lipídeos no parênquima hepático e a expressão da α -actina de músculo liso (α -SMA), um indicador de fibrose em fase de estabelecimento.

As transaminases hepáticas são marcadores plasmáticos clássicos de lesão hepática (CACCIAPUOTI et al., 2013; COSTA et al., 2014; AL-HARBI et al., 2014; OBOGWU et al., 2014; PRAKASH et al., 2014; VARGAS-MENDOZA et al., 2014). No presente estudo, a silimarina na dose de 1,5 mg/kg conseguiu reduzir os níveis séricos de ALT e AST, o que corrobora com dados da literatura, pois à silimarina é relatada uma capacidade de reduzir transaminases séricas causadas pela hepatotoxicidade do tetracloreto de carbono (AL-HARBI et al., 2014) e da tioacetamida (CHEN et al., 2011). Nos referidos estudos, tais resultados foram obtidos com doses mais elevadas. Entretanto, o processo patológico estudado era de natureza diferente, pois no modelo ora empregado há uma combinação de componentes oxidativos, inflamatórios e infecciosos (COSTA et al., 2014).

O componente inflamatório também é importante no contexto de todos os tipos NASH, principalmente para a NASH relacionada ao uso de irinotecano. Nesse modelo, Costa e colaboradores relataram que os eventos inflamatórios pareciam ser o fenômeno iniciador do problema. Com isso, a contagem do número de infiltrados inflamatórios nos tecidos hepáticos dos animais do estudo evidenciou que a silimarina conseguiu reduzir a migração de células inflamatórias apenas na dose de 15 mg/kg, mas não na menor dose. A migração de neutrófilos para o local de inflamação é um evento observado principalmente durante a resposta imune inata, com a participação de citocinas pró-inflamatórias características da fase aguda, como o TNF- α e a IL-1 β (ABBAS; LICHTMAN, 2011). Dessa forma, acredita-se que a dose de 15 mg/kg tenha

influenciado a migração de neutrófilos, uma vez que a silimarina é constantemente relatada como anti-inflamatória e inibidora da expressão das citocinas pró-inflamatórias de fase aguda, em doses a partir de 10 mg/kg (TÄGER et al., 2001; STEPHEN et al., 2007).

No que diz respeito ao acúmulo de lipídeos no parênquima hepático, três mecanismos são conhecidos pelos quais esse fenômeno pode ocorrer: aumento do aporte de ácidos graxos devido à dieta ou devido a uma quebra de adipócitos da periferia; aumento da síntese endógena de lipídeos; ou pela disfunção mitocondrial que leva a uma diminuição da β -oxidação lipídica (CHITTURI; FARRELL, 2001). Em nosso estudo não houve aporte dietético indutor de esteatose, nem havia motivos para uma síntese aumentada de ácidos graxos nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Portanto, é provável que o mecanismo de acúmulo de lipídeos deva-se à disfunção mitocondrial e à consequente inibição da oxidação fisiológica dos ácidos graxos.

Costa et al. (2014), ao estabelecerem o modelo NASH causada pelo quimioterápico irinotecano, levantaram a hipótese de que uma possível translocação bacteriana advinda do intestino em direção ao fígado via veia porta hepática. Essa hipótese foi levantada a partir da demonstração, mediante sementeira do sangue portal em meio de cultura, do aumento de unidades formadoras de colônias de amostras coletadas dos animais injetados com irinotecano quando comparados ao grupo controle. Adicionalmente, identificou-se, principalmente, a presença de *Escherichia coli* em amostras provenientes desses animais que receberam o quimioterápico.

A principal via de sinalização endotoxêmica secundária a uma infecção por bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, é mediada pelo TLR4 (RAETZ et al., 1991), produzindo uma série de mediadores inflamatórios secundários que recrutam a primeira linha de combate à infecção. Uma exacerbação desse processo leva a um quadro inflamatório característico da endotoxemia causada pela estimulação desses receptores com LPS (SAMAVATI et al., 2009). Contudo, existem outras vias de lesão celular associadas à infecção por *E. coli*. Dentre elas, tem-se descrito um grupo de proteínas que são reconhecidas pelas células de mamíferos através de outros receptores que não a família dos receptores *Toll-like* (KEGG, 2014). Neste contexto, as proteínas do sistema de secreção tipo III da *E. coli* (T3SSs), presentes nos revestimentos celulares dessas bactérias, poderiam ser importantes. Essas proteínas permitem que as bactérias injetem proteínas efetoras diretamente no citoplasma de outras células (COBURN et al., 2007). Elas são

reconhecidas nas células animais pela proteína efetora associada à mitocôndria (map) e pelos efetores EspF. O map e o EspF atuam por cascatas de fosforilação que ativa mediadores intracelulares como N-WAS e WAVE-2 que atuam através do complexo Arp2/3, culminando em um rearranjo das proteínas do citoesqueleto (COBURN et al., 2007). Esse complexo de proteínas também é responsável por causar danos aos tecidos infectados. O dano associado à ação do T3SS inclui citotoxicidade direta que leva ativação de vias de necrose ou de apoptose devido à disfunção mitocondrial, mediada principalmente por map e EspF. (COBURN et al., 2007; KEGG, 2014).

A função mitocondrial é vital para o metabolismo celular em geral, pois ela é a mais importante unidade de produção de energia nas células de mamíferos (ALBERTS et al., 2002). Essa função pode ter sido afetada por eventos característicos da NASH induzida pelo irinotecano, como o estresse oxidativo e a endotoxemia causada pela infecção com bactérias gram-negativas. Como os resultados desse trabalho mostram uma diminuição no acúmulo de lipídeos no fígado de animais pré-tratados com silimarina apenas na menor dose, acreditam-se que a diminuição do estresse oxidativo e uma menor ativação TLR4 permitiram a preservação da função mitocondrial. Como não há relatada na literatura qualquer ação da silimarina sobre o metabolismo de lipídeos e o estudo de Zhu e colaboradores demonstrou a ação da silimarina sobre a disfunção mitocondrial, melhorando a fluidez e o potencial de membrana (ZHU et al., 2014), acreditamos que o aumento de lipídeos observado nos animais tratados com irinotecano seja uma consequência direta da disfunção mitocondrial.

Agindo de forma sinérgica nesse processo está a inflamação. Existem relatadas duas consequências inflamatórias que culminam com o acúmulo de lipídeos no fígado. De forma direta, a produção de citocinas inflamatórias interfere com o metabolismo de lipídeos através da inibição da produção da lipoproteína lipase nos hepatócitos (BUTTERWITH; GRIFFIN, 1989). De forma indireta, a inflamação contribui com a disfunção mitocondrial, pois a resposta inflamatória aumenta a produção de substâncias oxidantes (ABBAS; LICHTMAN, 2011). Em um cenário de estresse oxidativo exacerbado esse fenômeno pode ter um papel importante. Esses dados dão suporte ao achado de Costa e colaboradores (2014), os quais propuseram que o acúmulo de gordura no fígado era secundário à inflamação, diferentemente do que se tem relatado para a fisiopatologia da NASH desencadeada por outros estímulos patológicos.

Assim, a fibrose hepática no modelo de NASH induzida pelo irinotecano pode ser observada apenas com a extensão do tratamento por 9 semanas, mas não em tempos menores. A fibrose hepática é um processo crônico que pode ser causado por diversos estímulos danosos como, álcool, infecção viral e outras toxinas que causam danos hepáticos (CHEN et al., 2012). A principal característica da fibrose é o acúmulo de matriz extracelular, cuja observação em estágios iniciais é difícil, sendo necessário, para tal, a utilização de técnicas especiais de preparação da lâmina, como, por exemplo, a coloração com o tricrômico de Masson. Ainda assim, nesses estágios esse achado é observado muito discretamente (KLEINER; BRUNT, 2012).

As células hepáticas que sofrem dano produzem mediadores como proteína ativadora-1 (AP-1), Fator 6 semelhante a Kruppel (KLF-6) e NF- κ B, que ativam as células estelares do fígado, ativando células positivas para α -SMA semelhantes a miofibroblastos. Essas são as responsáveis pela formação da cicatriz fibrótica (MANN; SMART, 2002; BATALLER; BRENNER, 2005). O aumento da α -SMA no tecido hepático é, portanto, um indicativo de uma fibrose que começa a se instalar. Como é possível se dosar essa proteína pela técnica de Western Blot em quantidades bastante pequenas, esse achado mostra que a lesão iniciada pelo uso do irinotecano está caminhando para uma fibrose posterior nesses animais. Os dados do presente trabalho mostram que os animais tratados com a silimarina na menor das doses não iniciaram esse processo devido provavelmente à prevenção do dano associado ao uso do irinotecano.

No estudo de Costa e colaboradores (2014), demonstrou-se o estabelecimento da NASH nos animais por meio dos critérios clínicos de Kleiner, além da dosagem das transaminases séricas. Dos critérios considerados relevantes, três deles, quais sejam, infiltração lobular, esteatose e fibrose, foram evidenciados no presente estudo por meio de outra abordagem, além da análise por escores. No estabelecimento do modelo, Costa e colaboradores encontraram as 3 alterações histopatológicas principais da NASH: a tumefação hepatocítica, a esteatose e a inflamação lobular. Em nossa abordagem, apenas duas dessas alterações foram encontradas com frequência nos animais do grupo modelo: a tumefação e a inflamação. A esteatose foi observada em baixa frequência, porém a dosagem de lipídeos totais no fígado pelo método bioquímico mostrou que o grupo lesão apresentou um maior acúmulo hepático de gorduras.

Quando o fígado acumula lipídeos em excesso, este padrão pode ser de duas formas. Uma distribuição macrovesicular, que representa um curso clínico benigno, com hepatócitos distendidos por um vacúolo único que desloca o núcleo para a periferia (TILG, 2010). A segunda

forma de arranjo de gorduras hepáticas é a forma microvesicular difusa, a qual está associada a processos mais graves e agudos que apresentam disfunção mitocondrial, sendo essa última forma altamente correlacionada a um pior prognóstico e ao desenvolvimento de insuficiência hepática (DAY; JAMES, 1998a). A esteatose microgotas, o padrão encontrado no modelo por Costa e colaboradores, é um achado bastante subjetivo e pode haver dificuldades de observação dependendo do corte histopatológico. Portanto, utilizamos os achados histopatológicos e a dosagem bioquímica de lipídeos totais para conseguirmos diagnosticar com precisão a NASH nos animais.

Kleiner e colaboradores consideram importantes para a NASH dois outros achados histopatológicos, a fibrose e a infiltração portal. Contudo, esses autores consideraram que esses achados tinham importância na predição dos prognósticos dos pacientes e não no fechamento do diagnóstico de NASH, uma vez que são achados que aparecem em etapas mais avançadas da doença quando o problema assume uma característica de cronificação.

Cientes até aqui de que a silimarina na dose 1,5 mg/kg foi capaz de interferir positivamente em todos os marcadores de lesão hepática avaliados, exceto o infiltrado neutrofílico, e que a silimarina na dose de 15 mg/kg foi eficaz apenas na prevenção do infiltrado neutrofílico e no acúmulo de lipídeos, questionou-se a razão para tal discrepância nos resultados obtidos com as duas doses.

De acordo com a teoria mais aceita acerca da fisiopatologia da NASH (*two hits theory*), o estresse oxidativo assume um papel vilão em potencial. Corroborando com essa premissa, Costa e colaboradores (2014) relataram a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da NASH induzida pelo irinotecano. Há também relatos de que a silimarina protege o fígado contra danos através de dois mecanismos antioxidantes. Primeiramente, ela aumenta a disponibilidade da maquinaria antioxidante natural do fígado, evidenciada principalmente pelo aumento de NPSH disponível. Além disso, a silimarina possui um efeito antioxidante direto, pois ela age como um quelante de radicais livres e superóxidos (FRASCHINI et al., 2002). De qualquer maneira, ambos esses mecanismos são altamente dose-dependentes e via de administração-dependentes. Johnson e colaboradores relataram que os efeitos da silimarina podem variar desde anti-inflamatórios até pró-inflamatórios, dependendo da dose administrada, sendo relatadas exacerbações de processos inflamatórios quando são administradas doses elevadas em camundongos. Adicionalmente, a via

de administração mostrou impacto na farmacocinética e na ação farmacológica da droga (JOHNSON et al., 2003).

Observando os efeitos do estresse oxidativo no modelo de NASH induzida por irinotecano desenvolvido por Costa e colaboradores, avaliou-se o MDA presente nas amostras, um indicativo de peroxidação lipídica. Sua presença indica um estresse oxidativo, que causa desnaturação de membranas e peroxidação (ZHANG et al., 2013). Como esse aldeído é o principal resultado da peroxidação da membrana poli-insaturada de ácidos graxos, ele é usado para indicar dano tecidual envolvendo cadeias de reações de peroxidação (ZHU et al., 2014).

No presente estudo, evidenciou-se uma diminuição da quantidade de MDA no fígado dos animais dos grupos tratados com silimarina na dose de 1,5 mg/kg. A diferença estatística não foi observada na dose intermediária (15 mg/kg), porém, a dosagem de NPSH mostrou que todos os grupos tratados com silimarina apresentaram níveis de NPSH bastante próximos dos animais tratados apenas com salina, levando-nos a acreditar que os efeitos antioxidantes da silimarina foram bastante eficazes no modelo de NASH.

Outro componente importante do estresse oxidativo é a formação dos radicais livres, como o peroxinitrito (ONOO⁻). Essa formação pode ser por via inflamatória, secundária a ativação de receptores TLR4, com aumento da expressão da iNOS levando a formação de NO, que ao reagir com o superóxido (O₂⁻) produz o ONOO⁻, causando danos celulares (ABBAS; LICHTMAN, 2011; HUIE; PADMAJA, 1993). Quando o ONOO⁻ reage com proteínas do tecido normal, formam-se subprodutos de nitro-tirosina (NTyr), os quais permitem a detecção da atuação desse potente radical livre sobre os tecidos (HUIE; PADMAJA, 1993). A via de sinalização mais importante para a expressão da iNOS é dependente de NFκB, recrutado após a sinalização do TLR4. Os monômeros de NFκB se ligam a dois sítos de reconhecimento do gene iNOS e só então a transcrição do gene é iniciada (MURPHY et al., 1996). No presente estudo, verificou-se que a expressão de iNOS não foi diminuída pelo tratamento com a silimarina na dose de 1,5 mg/kg. Em contraste, a expressão do KfκB estava diminuída nesse grupo. Como a silimarina inibe o recrutamento do NFκB uma via alternativa de produção de iNOS pode ter ganho importância nesse sistema. Há relatos recentes da partição da via JNK/c-Jun na ativação de mediadores inflamatórios incluindo a iNOS. Vo e colaboradores (2014) demonstraram a correlação da inibição da fosforilação da c-Jun com a diminuição da expressão da iNOS.

Apesar silimarina na menor dose não ser capaz de diminuir a expressão de iNOS, à imunohistoquímica verificou-se uma menor imunomarcção de NTyr, sugerindo que talvez o peroxinitrito não tenha se formado em quantidades significativas capazes de causar danos ao parênquima hepático, a despeito da maior produção de NO, com menor potencial lesivo, naquele tecido.

De forma controversa, ainda que dos dados sobre o perfil antioxidante da silimarina sejam positivos em ambas as doses, ela conseguiu reverter o dano hepático causado pela injeção do irinotecano apenas na dose mais baixa. Esse achado foi evidenciado pelos marcadores de lesão hepática utilizados nesse estudo. Nesse ponto, a discrepância entre os efeitos dessas duas doses de silimarina ainda permanecia sem explicação clara. Além disso, novos questionamentos surgiram. O que poderia desencadear esse estresse oxidativo observado no grupo irinotecano? Devido a isso, a avaliação do componente inflamatório parecia relevante, pois poderiam ser encontradas diferenças nos mediadores inflamatórios presentes nos grupos testes, bem como seria possível determinar um possível desencadeador do estresse oxidativo.

Como explicado anteriormente, a produção de citocinas pró-inflamatórias interferem no metabolismo de lipídeos no fígado (BUTTERWITH; GRIFFIN, 1989). Além disso, o próprio estresse oxidativo parece ter grande importância nesse processo. Contraditoriamente, apesar da presença dos principais marcadores de lesões hepáticas, nos animais do grupo pré-tratados com silimarina na dose intermédia, não encontramos processo inflamatório importante nas amostras desses animais e nem um estresse oxidativo pronunciado.

O mecanismo pelo qual a silimarina geralmente atua é bastante complexo. Há relatos de que ela possui ação anti-inflamatória e imunomodulatória, sendo capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , óxido nítrico (NO) e IL-6 (STEPHEN et al., 2007), além de aumentar a liberação do antagonista endógeno do receptor de IL-1, o IL-1ra (TÄGER et al., 2001). Essas ações são alcançadas, provavelmente, pois essa droga também é capaz de reduzir a produção de um fator de transcrição que está envolvido na produção de todos esses mediadores, o NF- κ B (LEE et al., 2013). Em células não estimuladas, o NF- κ B existe no citoplasma na forma inativa, em dímeros com o I κ B. A ativação desse fator de transcrição pode se dar de diversas formas, incluindo danos à membrana celular, estresse oxidativo e infecção bacteriana. Uma vez ativado, ele se separa do I κ B e migra para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta ao

fator de transcrição promovendo a expressão de diversas moléculas, incluindo proteínas de adesão, citocinas, quimiocinas e iNOS (ZHANG et al., 2013).

Costa e colaboradores (2014) ao definir o modelo encontrou um aumento da citocina IL-1 β no tecido hepático dos camundongos tratados com irinotecano, associando esse achado à estimulação dos receptores TLR4 encontrados superexpressos nesses mesmos tecidos. Na presente investigação, a dose mais baixa de silimarina diminuiu a concentração de IL-1 β e a dose mais alta não apresentou efeito sobre essa citocina.

A resposta fisiológica a infecções por microrganismos sejam elas virais, bacterianas ou de qualquer outra natureza, envolve uma resposta imediata (ínata) e uma resposta adaptativa (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; NUNEZ MIGUEL et al., 2007). A resposta imediata envolve o reconhecimento de padrões moleculares de constituintes desses patógenos (RAETZ et al., 1991; HUNTER, 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2011). Esse reconhecimento é feito por um grupo de receptores chamados de 'receptores de reconhecimento de padrão' (PRR's) sendo a família dos TLR um dos mais importantes componentes dos PRR's (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

O LPS é um importante estimulador do sistema imunológico, pois ele é um dos principais constituintes da membrana celular de bactérias gram-negativas (RAETZ et al., 1991), tendo correlação com o desenvolvimento de doenças inflamatórias que podem estar associadas com danos em diversos órgãos e morte (RAETZ et al., 1991; HUNTER, 2006). O principal receptor de reconhecimento do LPS pertence à família dos TLR, o TLR4. Esse consiste de um domínio transmembrana que conecta o domínio extracelular, de reconhecimento do LPS, ao domínio intracelular (NUNEZ MIGUEL et al., 2007).

O TLR4 possui uma região bastante semelhante ao receptor de interleucina 1, chamado atualmente de domínio Toll/IL-1 (TIR). Em sua porção intracelular, há ligação às proteínas adaptadoras MyD88 e o recrutamento da quinase associada a IL-1R (IRAK-1), com subsequentemente fosforilação e ativação de kinases como MAPKs, ERK1/2, JNK que levam à ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. Esses últimos são os principais promotores de transcrição de proteínas pró-inflamatórias (GAY et al., 2006; NUNEZ MIGUEL et al., 2007; SAMAVATI et al., 2009).

A silimarina já foi relatada como inibidora da ação do NF- κ B e, portanto, da ação das citocinas pró-inflamatórias produzidas por sua ativação (FRASCHINI et al., 2002; JOHNSON et al., 2003; RAINONE, 2005), sendo descrito na literatura que doses a partir de 10 mg/kg já

apresentavam essa ação de forma bastante significativa (JOHNSON et al., 2003). Em nosso estudo, encontramos que a IL-1 β foi diminuída pela dose de 1,5 mg/kg de silimarina, mas não pela dose de 15 mg/kg. Esse dado parece inicialmente controverso, mas se voltarmos nossa atenção para o fato de que os animais tratados com a dose menor não apresentavam ativação aumentada dos receptores TLR4 e nem estresse oxidativo associado de dano tecidual, então é normal que esses animais não apresentem, no fígado, um aumento de citocinas pró-inflamatórias.

Com base na literatura sabemos que a dose média usada nesta pesquisa seria responsável por uma possível redução em citocinas pró-inflamatória, porém os dados obtidos em trabalhos publicados não se referem especificamente a uma redução da IL-1 β , mas sim a uma redução na sua ação. Tager e colaboradores (2001) estudaram a recuperação do estatus tiol, promovida pelo tratamento com a silimarina, de macrófagos peritoneais provenientes de pacientes em diálise peritoneal contínua (CAPD), mantendo uma observação do componente inflamatório do processo através da dosagem por ELISA de citocinas como IL-6, IL-1 β e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Esses autores encontraram, nesse contexto, uma diminuição da expressão da IL-6 e um aumento da expressão de IL-1ra, assim como uma não alteração da expressão de IL-1 β (TÄGER et al., 2001).

Além disso, a IL-1 β é produzida fisiologicamente como um precursor chamado de pró-IL-1 β , uma proteína de 35kDa que deve ser processada para se tornar a molécula ativa e então ser secretada (DINARELLO, 1998). A principal molécula que cliva a pró-IL-1 β é a Caspase-1, ela corta essa molécula após o resíduo de ácido aspártico na posição 116, resultando em uma IL-1 β altamente reativa e pronta para ser secretada. (DINARELLO, 1998; SAMAVATI et al., 2009).

Outra possibilidade para o aumento dessa citocina nos animais tratados com a dose média de silimarina, seria a existência de uma via alternativa de produção de IL-1 β . Sabemos que a principal ação anti-inflamatória da silimarina vem de sua ação de inibição sobre o NF- κ B, mas a ativação de receptores *toll-like* também pode levar à ativação de MAP3K e, posteriormente, à fosforilação de ERK1/2, JNK e p38, que agem através do fator de transcrição AP-1 e podem aumentar a expressão de IL-1 β (SAMAVATI et al., 2009). Samavati e colaboradores demonstraram que, tanto em uma linhagem de macrófagos, quanto em uma cultura primária de células dendríticas da medula óssea de camundongos e uma cultura primária de macrófagos peritoneais, a expressão de IL-1 β é dependente da fosforilação do STAT3, uma vez que a utilização de inibidor da fosforilação do STAT3 inibe a produção de IL-1 β após a estimulação

LPS (SAMAVATI et al., 2009). Okugawa e colaboradores estudaram a ativação de macrófagos induzida pelo LPS buscando o envolvimento de JAK2 nesse processo. Nesse estudo, eles trataram a linhagem celular de macrófagos com inibidores de JAK2, PI3K, e JNK. A utilização do inibidor de JNK diminuiu a expressão de IL-1 β de forma tão marcante quanto a combinação da utilização dos inibidores de JAK2 e PI3K, observando inclusive, que a utilização desses dois inibidores separadamente apresentava apenas uma influência parcial sobre a produção dessa interleucina (OKUGAWA et al., 2003).

Esses autores demonstram que a produção de IL-1 β pela estimulação do LPS nos receptores TLR4 pode se dar por diversas vias sendo algumas independentes de NF- κ B. Então, a explicação para a não redução da expressão de IL-1 β pela silimarina poderia ser pela liberação da IL-1 β proveniente de uma produção prévia com clivagem no momento do estímulo inflamatório e/ou ainda de uma via alternativa de produção. Porém, esse mediador não estaria agindo de forma efetiva devido a uma possível competição com o seu antagonista endógeno de receptor.

Além de estimular a produção de IL-1 β , a ativação dos receptores de TLR4 leva à produção de vários outros mediadores pró-inflamatórios, como, por exemplo, TNF- α e IL-6. Em nossos dados não foi encontrado um aumento expressivo de TNF- α (dados não exibidos). Isso pode ser devido ao tempo em que a avaliação foi realizada, uma vez que essa citocina é comumente observada em processos inflamatórios agudos (ABBAS; LICHTMAN, 2011) e esse é um modelo de lesão subcrônica. Contudo, não é descartada a possibilidade de que essa citocina seja relevante nesse processo fisiopatológico.

A IL-6 é um monômero de 184 aminoácidos com 26 kD, encontrada em um único gene na posição 7p21, secretada principalmente por células T e macrófagos para estimular a resposta imune durante infecções e traumas (SEHGAL et al., 1995; STREETZ et al., 2000; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Essa interleucina é um dos principais mediadores da febre e é um potente estimulador da produção das proteínas de fase aguda (Proteína C Reativa – PCR, Soro Amiloide A – SAA), e fibrinogênio, além de atuar como fator de crescimento e diferenciação para células B- e T- do sistema imunológico (STREETZ et al., 2000).

A produção de IL-6 após a estimulação com LPS, é devida, principalmente, à via clássica de ativação do NF- κ B (FEDER et al., 1993). Além disso, o aumento da ativação dos receptores de IL-1 leva a um considerável aumento de IL-6 por dois mecanismos distintos que atuam em paralelo, a via PI3K/AKT/IKK α que leva a ativação do AP-1 e a via dependente de PI3K/AKT

que precede a ativação do NFκB (TOSATO E JONES, 1990; KANDERE-GRZYBOWSKA et al., 2003; CAHILL; ROGERS, 2008). Contudo, os relatos mais recentes mostram que a primeira dessas vias é a via decisiva na produção de IL-6 após a estimulação com IL-1.

Uma vez que a silimarina, através de seu mecanismo inibidor de NFκB (LEE et al., 2013) e inibidor de IL-1β (TÄGER et al., 2001), foi capaz de reduzir a produção de IL-6, e como a IL-6 tem notória função de diferenciação das células B em plasmócitos e também de aumentar a produção de anticorpos, principalmente IgG e IgA (STREETZ et al., 2000), o sistema de defesa do organismo pode ficar comprometido.

O estudo de Cressman e colaboradores (1996) demonstrou de maneira bastante elegante que a IL-6 é importante também para a regeneração hepática. Esses autores observaram que camundongos deficientes de produção de IL-6 (IL-6 -/-) falhavam em regenerar o fígado após hepatectomia e os hepatócitos apresentavam-se em fase G1 de ciclo celular, sem síntese de DNA (CRESSMAN et al., 1996). Além disso, demonstraram que o tratamento desses animais com IL-6 resultava na normalização da capacidade regenerativa. Esses dados nos dão uma ideia do motivo pelo qual os animais tratados com silimarina na dose média apresentavam um maior dano hepático e uma maior produção de α-SMA, uma vez esses animais além de não conseguirem combater a infecção adequadamente, apresentavam uma capacidade de regeneração hepática deficiente.

A função da IL-6 também é regulada pela presença da citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (KNOLLE et al., 1997). Menezes e colaboradores relatam que o fígado apresenta uma secreção espontânea de IL-10 (MENEZES et al., 2009), que modula a constantemente a inflamação nesse órgão. Além disso, Knolle e colaboradores demonstraram que as células de Kupffer secretam IL-6 frente ao desafio com LPS, de forma dose-dependente, e que essas mesmas células expressam espontaneamente IL-10 (KNOLLE et al., 1997). Além disso, esse grupo estudou a interferência da IL-10 sobre a secreção de IL-6 encontrando que a suplementação exógena de IL-10 consegue diminuir a expressão de IL-6 de maneira dose dependente até o ponto em que essa expressão seja totalmente abolida (KNOLLE et al., 1997).

A IL-10 é uma interleucina essencialmente anti-inflamatória que possui diversas possibilidades de ação em seu sítio promotor (MOORE et al., 1993; OPAL et al., 1998). Esta age ativando elementos de transcrição gênica como, por exemplo, elementos de resposta a glicocorticoides, AMPc, AP-1 e NFκB (MOORE et al., 1993). A IL-10 é produzida por diversas

tipos celulares, incluindo monócitos, linfócitos CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B, keratinócitos e células de Kupffer. Sendo ela produzida pela ativação do NFκB e do AMPc (OPAL et al., 1998) é liberada em estágios mais tardios das respostas inflamatórias sistêmicas, como um mecanismo natural de defesa contra a exacerbação do estímulo pró inflamatório (HOWARD et al., 1993; OPAL et al., 1998).

A IL-10 é liberada principalmente frente a duas situações: a presença de estímulos inflamatórios sistêmicos e a presença de uma infecção severa (HOWARD et al., 1993; de VRIES, 1995). Sua síntese diminuída pela presença de IL-4, IL-1β e INF-γ (TE VELDE et al., 1992; DÖCKE et al., 1997) e a própria IL-10 inibe a produção de IL-12, INF-γ, óxido nítrico e TNF (GAZZINELLI et al., 1992; MARCHANT et al., 1994). A IL-10 também foi reportada por diminuir a atividade de células apresentadoras de antígenos, por diminuir a expressão de moléculas como a molécula de histocompatibilidade principal tipo II (MHC-II) e a molécula de adesão intercelular tipo I (ICAM-1) (MOORE et al., 1993; WILLEMS et al., 1994).

A estimulação do receptor TLR4 também pode levar a produção de IL-10. Siegemund e Sauer demonstraram o mecanismo molecular pelo qual a ativação de TLR4 muda o perfil de citocinas produzidas. Eles reportaram que a enzima P110δ diminui a abundância do lipídeo PtdIns(4,5)P2, que tem função de ancoragem da proteína TIRAP. Essa age em conjunto com a proteína adaptadora Myd88, formando o complexo TIRAP-MyD88 que ativa a transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios. Quando o PtdIns(4,5)P2 não está presente, o complexo TLR4-ligante é endocitado e o estímulo subcelular passa a ser mediado pelo complexo TRAM-TRIF que ativa a transcrição de genes de mediadores anti-inflamatórios, principalmente IL-10 e IFN-β (SIEGEMUND; SAUER, 2012).

Em nosso estudo, encontramos um aumento significativo de IL-10 nos animais tratados com silimarina nas duas maiores doses. Esse achado era esperado, pois a literatura mostra que a silimarina promove uma maior produção de IL-10 (RAINONE, 2005).

No fígado, ao enfrentar uma infecção severa, a ação excessiva da IL-10 pode ser um problema, uma vez que fisiologicamente há uma produção intrínseca desse mediador nesse órgão. O trabalho de Menezes e colaboradores demonstra bem a importância da IL-10 para o combate a infecções no fígado. Eles demonstraram que a migração de neutrófilos para o fígado frente a estimulação com LPS apresenta um padrão diferente do visto sistemicamente e em outros órgãos, e que essa mudança no padrão de proteínas de adesão era devida a uma produção local excessiva

de IL-10 após o estímulo endotoxêmico (MENEZES et al., 2009). A IL-10 diminui a expressão da proteína de superfície MAC-1 nos neutrófilos que circulam pelos sinusoides, ficando a cargo da proteína CD44 a fixação dos neutrófilos nesses vasos. A fixação promovida pela CD44 é eficiente para adesão, mas não para a diapedese. Como consequência, uma camada de neutrófilos é formada nos sinusoides, promovendo uma certa filtração, visto que os neutrófilos poderiam encontrar as bactérias ainda nos vasos e lá promover sua ação bactericida sem prejudicar, por consequência disso, as células do parênquima hepático (MENEZES et al., 2009).

Esse mecanismo de defesa criado pelo fígado para se proteger ao mesmo tempo de intoxicações e de danos oxidativos pode ter falhado em nosso modelo devido à grande capacidade antioxidante da silimarina. Nesse ponto, encontramos uma diferença essencial entre os animais dos grupos de doses baixa e média de silimarina. Devido à ação antioxidante não exacerbada no grupo de menor dose, a reação de fase aguda, por intermédio dos neutrófilos, pode combater adequadamente a infecção. Entretanto, ao mesmo tempo, a ação oxidativa dos neutrófilos estava sendo modulada pela baixa dose do antioxidante, evitando assim os dois *hits* necessários para a instalação da lesão, como teorizado por Costa e colaboradores (2014). Já o grupo que recebeu a dose média, devido à uma baixa capacidade bactericida, necessitava, além do sistema de defesa eficiente, um sistema de regeneração adequado. Ao falhar nesses dois pontos, os animais desenvolveram uma lesão hepática pronunciável que terminou por propiciar um curso de lesão para a fibrose.

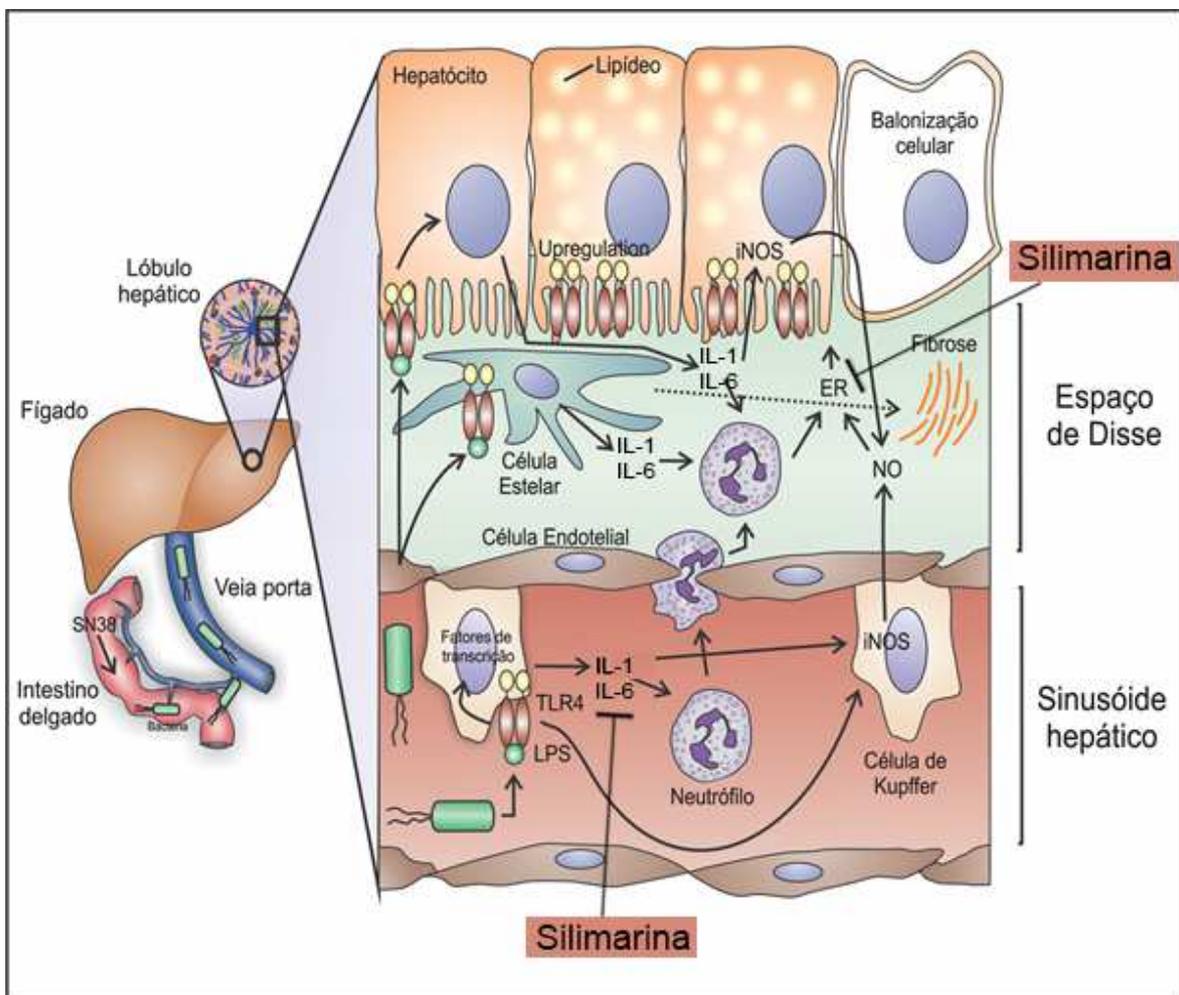
Em resumo, a dose menor de silimarina protegeu o fígado do dano tecidual relacionado ao uso do irinotecano e nossos dados apontam para uma proteção mediada pelo controle do estresse oxidativo sem comprometimento das funções imunológicas imediatas e adaptativas, pois a uma maior inibição da oxidação pode interferir com a ação bactericida dos neutrófilos permitindo que a endotoxemia se instale de fato. Esse parece ser o motivo pelo qual a maior dose não apresentou efeito protetor, uma vez que os parâmetros relacionados a estresse oxidativo se encontraram controlados, mas o fígado desses animais não se encontrava em bom estado à análise histopatológica.

Com isso, nossos dados mostram a eficácia de uma droga já utilizada na prática clínica para uma situação diferente de seu uso habitual. Além disso, fornece informações importantes que ajudaram a entender a fisiopatologia da NASH induzida por irinotecano, dando indícios de como modular o balanço de citocinas pró- e anti- inflamatórias, bem como o equilíbrio oxidativo para

que esse órgão possa combater adequadamente a infecção advinda da translocação bacteriana consequente à mucosite intestinal instalada nesses animais. Isso, traz perspectivas de novos testes inclusive clínicos, como uma combinação da silimarina com outros fármacos.

A figura 19 mostra a adição da IL-6 como um ponto importante na fisiopatologia da NASH induzida pelo irinotecano. Além disso, aponta os pontos modulados pela silimarina que são importantes para proteção hepática, nesse contexto.

Figura 19 - Adaptação do modelo de Costa e colaboradores (2014).



A silimarina protege do dano hepático característico da NASH induzida pelo irinotecano por provavelmente por reduzir os parâmetros inflamatórios e oxidativos.

6 CONCLUSÃO

A silimarina apresentou efeito hepatoprotetor no modelo de NASH induzida pelo irinotecano evidenciado pela diminuição dos escores histopatológicos e ensaios bioquímicos. O mecanismo envolve a inibição do estresse oxidativo e a nitrosilação proteica. Adicionalmente, a silimarina diminui a expressão de NFκB e produção de IL-1 e IL-6, além de aumentar a produção de IL-10.

REFERÊNCIAS

ABBAS; A. K.; LICHTMAN; A. H. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2011.

ADAM; R.; DELVART; V.; PASCAL; G.; VALEANU; A.; CASTAING; D.; AZOULAY; D.; GIACCHETTI; S.; PAULE; B.; KUNSTLINGER; F.; GHÉMARD; O.; LEVI; F. E BISMUTH; H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastasis downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. **Ann. Surg.** v. 240; n. 4; p. 644-657; 2004

AKIRA; S.; ISSHIKI; H.; SUGITA; T.; TANABE; O.; KINOSHITA; S.; NISHIO; Y.; NAKAJIMA; T.; HIRANO; T.; KISHIMOTO; T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. **The EMBO Journal.** v. 9; n. 6; p. 1897–1906; 1990.

ALBERTS; B.; JOHNSON; A.; LEWIS; J.; RAFF; M.; ROBERTS; K. AND WALTER; P. 2002. **The Mitochondrion**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26894/>> Acessado em: 24 Jul. 2014.

AL-HARBI; N. O.; IMAM; F.; NADEEM; A.; AL-HARBI; M. M.; IQBAL; M. AND AHMAD; S. F. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. **International Immunopharmacology.** v. 21; n. 2; p. 383–388; 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **History of cancer**. Disponível em: <www.cancer.org>. Acesso em: 18 jul. 2014.

BATALLER; R. AND BRENNER; D. ALiver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation.** v. 115; n. 2; p. 209–218; 2005.

BISMUTH; H.; ADAM; R.; LÉVI; F.; FARABOS; C.; WAECHTER; F.; CASTAING; D.; MAJNO; P. E ENGERRAN; L. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Ann Surg.** V. 224; n. 4; p. 509–522; 1996.

BRUNT; E.M.; JANNEY; C.G.; DI BISCEGLIE; A.M.; NEUSCHWANDER-TETRI; B.A. E BACON; B.R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol.** V. 94 n. 9; p. 2467-2474; 1999.

BUTTERWITH; S. C.; GRIFFIN; H. D. The effects of macrophage-derived cytokines on lipid metabolism in chicken (*Gallus domesticus*) hepatocytes and adipocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. A; Comparative Physiology.* v. 94 n. 4; p 721–724; 1989.

CACCIAPUOTI; F.; SCOGNAMIGLIO; A.; PALUMBO; R.; FORTE; R. AND CACCIAPUOTI; F. Silymarin in non alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology.** v. 5; n. 3; p. 109–113; 2013.

CAHILL; C. M. AND ROGERS; J. T. Interleukin (IL) 1beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha pathway targeting activator protein-1. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 283 n. 38; p. 25900–25912; 2008.

- CALANI; L.; BRIGHENTI; F.; BRUNI R. E DEL RIO D. Absorption and metabolism of milk thistle flavanolignans in humans. **Phytomedicine**. 20: 40-46. 2012.
- CHAMPOUX; J. J. DNA topoisomerases: structure; function; and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.** v. 70; p. 369-413; 2001.
- CHEN; I.-S.; CHEN; Y.-C.; CHOU; C.-H.; CHUANG; R.-F.; SHEEN; L.-Y. AND CHIU; C.-H. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92 n. 7; p. 1441–1447; 2012.
- CHEN; J.; LI; Q.; WANG; C.; ZHU; H.; SHI; Y. E ZHAO; G. Simultaneous vs staged resection for synchronous colorectal liver metastasis: a metaanalysis. **Int J Colorectal Dis**. v. 26; n. 2; p. 191-199; 2011.
- CHESTER; J.D.; JOEL; S.P.; CHEESEMAN; S.L.; HALL; G.D.; BRAUN; M.S.; PERRY; J.; DAVIS; T.; BUTTON; C.J. E SEYMOUR; M.T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol**. v. 21; n. 6; p. 1125-1132; 2003.
- CHITTURI; S. E FARRELL; G.C. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**. v. 21; n. 1; p. 27-41; 2001.
- COBURN; B.; SEKIROV; I. AND FINLAY; B. B. Type III Secretion Systems and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20; n. 4; p. 535–549; 2007.
- CORTEZ-PINTO; H.; DE MOURA; M.C. E DAY; C.P. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. **J Hepatol**. v. 44; n. 1; p. 197-208; 2006.
- COSTA; M.L.; LIMA-JÚNIOR; R.C.; ARAGÃO; K.S.; MEDEIROS; R.P.; MARQUES-NETO; R.D.; DE SÁ GRASSI; L.; LEITE; L.L.; NUNES; L.G.; DE MESQUITA NETO; J.W.; DE CASTRO BRITO; G.A.; DE SOUZA; M.H.; DE ALMEIDA; P.R.; RIBEIRO; R.A. Chemotherapy-associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 74; n. 2; 2014.
- CRESSMAN; D. E.; GREENBAUM; L. E.; DEANGELIS; R. A.; CILIBERTO; G.; FURTH; E. E.; POLI; V. AND TAUB; R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. **Science** (New York; N.Y.). v. 274; n. 5291; p. 1379–1383; 1996.
- D'ANDREA; A.; ASTE-AMEZAGA; M.; VALIANTE; N. M.; MA; X.; KUBIN; M. AND TRINCHIERI; G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 178; n. 3; p. 1041–1048; 1993.
- DAY; C. P. e JAMES; O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**. v. 114; n. 4; p. 842-845; 1998b.
- DAY; C. P.; JAMES; O. F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**. v. 27; n. 6; p. 1463-1466; 1998a.

- DE VRIES; J. E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. **Annals of Medicine**. v. 27; n. 5; p. 537–541. 1995.
- DINARELLO; C. A. Interleukin-1 β ; Interleukin-18; and the Interleukin-1 β Converting Enzyme. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 856; n:1; p. 1–11; 1998.
- DÖCKE; W. D.; RANDOW; F.; SYRBE; U.; KRAUSCH; D.; ASADULLAH; K.; REINKE; P.; VOLK; H. D.; KOX; W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. **Nature Medicine**. v. 3; n. 6; p. 678–681; 1997.
- ENZINGER; P.C.; KULKE; M.H.; CLARK; J.W.; RYAN; D.P.; KIM; H.; EARLE; C.C.; VINCITORE; M.M.; MICHELINI; A.L.; MAYER; R.J.; FUCHS; C.S. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. v. 50; n. 12; p. 2218-23; 2005.
- FEDER; L. S.; TODARO; J. A. AND LASKIN; D. L. Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 53; n. 2; p. 126–132; 1993.
- FRASCHINI; D. F.; DEMARTINI; G. AND ESPOSTI; D. Pharmacology of Silymarin. *Clinical Drug Investigation*. v. 22; n. 1; p. 51–65; 2002.
- FREITAS; H.C. **Envolvimento da interleucina-18 (IL-18) na patogênese da mucosite gastrintestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11)**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina; Universidade Federal do Ceará; Fortaleza; 104f; 2007.
- FUJII; H.; KOSHIYAMA; M.; KONISHI; M.; YOSHIDA; M. E TAUCHI; K. Intermittent; repetitive administrations of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects. **Cancer Detect Prev**. v. 26; n. 3; p. 210-212. 2002.
- GAY; N. J.; GANGLOFF; M. AND WEBER; A. N. R. Toll-like receptors as molecular switches. **Nature Reviews Immunology**. v. 6; n. 9; p. 693–698; 2006.
- GAZZINELLI; R. T.; OSWALD; I. P.; JAMES; S. L. AND SHER; A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **Journal of Immunology** (Baltimore; Md.: 1950) v. 148; n. 6; p. 1792–1796; 1992.
- GHARAGOZLOO; M. AND AMIRGHOFAN; Z. Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 133; n. 8; p. 525–532; 2007.
- GIBSON; R.J.; BOWEN; J.M.; INGLIS; M.R.; CUMMINS; A.G.; KEEFE; D.M. Irinotecan causes severe small intestinal damage; as well as colonic damage; in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 18; n. 9; p. 1095-1100; 2003.
- GUYTON; A. C.; HALL; J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro; Elsevier Ed; 2006.

HAMAGUCHI; M.; KOJIMA; T.; TAKEDA; N.; NAKAGAWA; T.; TANIGUCHI; H.; FUJII; K.; OMATSU; T.; NAKAJIMA; T.; SARUI; H.; SHIMAZAKI; M.; KATO; T.; OKUDA; J. E IDA; K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.* v. 143; n. 10; p. 722-728; 2005.

HAMMOND; J.S.; GUHA; I.N.; BECKINGHAM; I.J.; LOBO; D.N. Prediction; prevention and management of postresection liver failure. **British J Surg.** v. 98; n. 9; p. 1188-1200; 2011.

HANAHAN; D.; WEINBERG; R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell.** v. 144; n. 5; p. 646-674; 2011.

HOWARD; M.; MUCHAMUEL; T.; ANDRADE; S. AND MENON; S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 177; n. 4; p. 1205–1208; 1993.

HUIE; R.E. E PADMAJA; S. The reaction of NO with superoxide. **Free Radic Res Commun.** v. 18; p. 195–199; 1993.

HUNTER; P. Sepsis under siege: a new understanding of sepsis might lead to the development of therapies to treat septic shock. **EMBO reports.** v.7; n. 7; p. 667–669; 2006.

IKUNO; N.; SODA; H.; WATANABE; M.; OKA; M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. **J Natl Cancer Inst.** v. 87; n. 24; p. 1876-1883; 1995.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência de câncer no Brasil.** Ministério da Saúde. 2014.

JANEWAY; C. A. AND MEDZHITOV; R. Innate Immune Recognition. **Annual Review of Immunology.** v. 20; n. 1; p. 197–216; 2002.

JOHNSON; V. J.; HE; Q.; OSUCHOWSKI; M. F. AND SHARMA; R. P. Physiological Responses of a Natural Antioxidant Flavonoid Mixture; Silymarin; in BALB/c Mice: III. Silymarin Inhibits T-Lymphocyte Function at Low Doses but Stimulates Inflammatory Processes at High Doses. **Planta Medica.** v. 69; n. 1; p. 44–49; 2003.

KANDERE-GRZYBOWSKA; K.; LETOURNEAU; R.; KEMPURAJ; D.; DONELAN; J.; POPLAWSKI; S.; BOUCHER; W.; ATHANASSIOU; A. AND THEOHARIDES; T. C. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. **Journal of Immunology** (Baltimore; Md.: 1950). v. 171; n. 9; p. 4830–4836; 2003.

KANDUTSCH; S.; KLINGER; M.; HACKER; S.; WRBA; F.; GRUENBERGER; B. AND GRUENBERGER; T. Patterns of hepatotoxicity after chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. **European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology.** v. 34; n. 11; p. 1231–1236; 2008.

KEGG. **Escherichia coli pathway**. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/>. Acessado em 15/08/2014.

KIM; B.-R.; SEO; H.-S.; KU; J.-M.; KIM; G.-J.; JEON; C. Y.; PARK; J. H.; JANG; B.-H.; PARK; S.-J.; SHIN; Y.-C. AND KO; S.-G. Silibinin inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through inhibition of NF- κ B signaling pathway in HMC-1 human mast cells. **Inflammation Research**. v. 62; p. 941–950; 2013.

KLEINER; D. E.; BRUNT; E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. **Semin Liver Dis**. v. 32; n. 1; p. 3-13; 2012.

KLEINER; D.E.; BRUNT; E.M.; VAN NATTA; M.; BEHLING; C.; CONTOS; M.J.; CUMMINGS; O.W.; FERRELL; L.D.; LIU; Y.C. E TORBENSON; M.S. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. v. 4; n. 6; p. 1313-21; 2005.

KNAUL; F.M.; ORNELAS-ARREOLA; H.; MÉNDEZ; O.; ASLAN; M.; SEINFELD; J.; MARX; A. E ATUN; R. The Global economic burden of cancer. **World Cancer Report; International Agency for Research on Cancer (IARC) Control 6; Chapter 6.7**; 2014.

KNOLLE; P.A.; LOSER; E.; PROTZER; U.; DUCHMANN; R.; SCHMITT; E.; ZUM BUSCHENFELDE; K.-H. M.; ROSE-JOHN; S. E GERKEN; G. Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 107; n. 3; p. 555–561; 1997.

KOIZUMI; F.; KITAGAWA; M.; NEGISHI; T.; ONDA; T.; MATSUMOTO; S.; HAMAGUCHI; T. E MATSUMURA; Y. NOVEL. SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res**. v. 66; n. 20; p. 10048-10056; 2006.

KUVSHINOV; B. E FONG; Y. Surgical Therapy of Liver Metastasis. **Semin Oncol**. v. 34; n. 3; p. 177-185; 2007.

LANGER; C. J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. *Oncology (Williston Park)*. v. 18; n. 7; s. 4; p. 17-28; 2004.

LEE; M.-H.; HUANG; Z.; KIM; D. J.; KIM; S.-H.; KIM; M. O.; LEE; S.-Y.; XIE; H.; PARK; S. J.; KIM; J. Y.; KUNDU; J. K.; BODE; A. M.; SURH; Y.-J. AND DONG; Z. Direct targeting of MEK1/2 and RSK2 by silybin induces cell-cycle arrest and inhibits melanoma cell growth. **Cancer Prevention Research (Philadelphia; Pa.)**. v. 6; n. 5; p. 455–465; 2013.

LIMA; J. M. C.; SANTOS; A. A.; COSTA J. I. F. **Gastroenterologia e Hepatologia: Sinais; sintomas; diagnósticos e tratamento**. 1a edição. Fortaleza; Editora Universidade Federal do Ceará. 2010.

LIMA-JÚNIOR; R. C. P.; FIGUEIREDO; A. A.; FREITAS; H. C.; MELO; M. L. P.; WONG; D. V. T.; LEITE; C. A. V. G.; MEDEIROS; R. P.; MARQUES-NETO; R. D.; VALE; M. L.; BRITO; G. A. C.; ORIÁ; R. B.; SOUZA; M. H. L. P.; CUNHA; F. Q. AND RIBEIRO; R. A.

Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 69; n. 4; p. 931–942; 2012.

MAIONE; D.; DI CARLO; E.; LI; W.; MUSIANI; P.; MODESTI; A.; PETERS; M.; ROSE-JOHN; S.; DELLA ROCCA; C.; TRIPODI; M.; LAZZARO; D.; TAUB; R.; SAVINO; R. AND CILIBERTO; G. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. **The EMBO Journal**. v. 17; n. 19; p. 5588–5597; 1998.

MANN; D. A.; SMART; D. E. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. **Gut**. v. 50; n. 6; p. 891–896; 2002.

MARCHANT; A.; BRUYNS; C.; VANDENABEELE; P.; DUCARME; M.; GÉRARD; C.; DELVAUX; A.; DE GROOTE; D.; ABRAMOWICZ; D.; VELU; T. AND GOLDMAN; M. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. **European Journal of Immunology**. v. 24; n. 5; p. 1167–1171; 1994.

MARTIN; G.R.; WALLACE; J.L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 231; n. 2; p. 130-137; 2006.

MATTEONI; C.A.; YOUNOSSEI; Z.M.; GRAMLICH; T.; BOPARAI; N.; LIU; Y.C. E MCCULLOUGH; A.J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. v. 116; n. 6; p. 1413-1419; 1999.

MAYER; K. E.; MYERS; R. P.; LEE; S. S. Silymarin treatment of viral hepatitis: a systematic review. **J Viral Hepat**. v.12; n. 6; p. 559-567; 2005.

MELO; M. L. P.; BRITO; G. A. C.; SOARES; R. C.; CARVALHO; S. B. L. M.; SILVA; J. V.; SOARES; P. M. G.; VALE; M. L.; SOUZA; M. H. L. P.; CUNHA; F. Q. AND RIBEIRO; R. A. Role of cytokines (TNF- α ; IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. v. 61; n. 5; p. 775–784; 2008.

MENEZES; G. B.; LEE; W.-Y.; ZHOU; H.; WATERHOUSE; C. C. M.; CARA; D. C.; KUBES; P. Selective down-regulation of neutrophil Mac-1 in endotoxemic hepatic microcirculation via IL-10. **Journal of Immunology**. (Baltimore; Md.: 1950) v. 183; n. 11; p. 7557–7568; 2009.

MEYER; C.F.; WANG; X.; CHANG; C.; TEMPLETON; D.; TAN; T.H. Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase 1 signaling cascade in mediating κ B enhancer activation. **J Biol Chem**. v. 271; p. 8971–8976; 1996.

MOORE; K. W.; O’GARRA; A.; DE WAAL MALEFYT; R.; VIEIRA; P. AND MOSMANN; T. R. Interleukin-10. **Annual Review of Immunology**. v. 11; p. 165–190; 1993.

MULHALL; B.P.; ONG; J.P. E YOUNOSSEI; Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 17; n. 11; p.1136-1143; 2002.

MURPHY; W.J.; MUROI; M.; ZHANG; X.; SUZUKI; T. E RUSSELL; S.W. Both a basal and an enhancer IB element is required for full induction of the mouse inducible nitric oxide synthase gene. **J Endotoxin Res.** v. 3; p. 381–393; 1996.

NUNEZ MIGUEL; R.; WONG; J.; WESTOLL; J. F.; BROOKS; H. J.; O'NEILL; L. A. J.; GAY; N. J.; BRYANT; C. E. AND MONIE; T. P. A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. **PLoS ONE.** v. 2; n. 8; 2007.

OBOGWU; M. B.; AKINDELE; A. J. AND ADEYEMI; O. O. Hepatoprotective and in vivo antioxidant activities of the hydroethanolic leaf extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) in antitubercular drugs and alcohol models. **Chinese Journal of Natural Medicines.** v. 12; n. 4; p. 273–283; 2014.

OKUGAWA; S.; OTA; Y.; KITAZAWA; T.; NAKAYAMA; K.; YANAGIMOTO; S.; TSUKADA; K.; KAWADA; M. AND KIMURA; S. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. **American Journal of Physiology - Cell Physiology.** v. 285; n. 2; p. C399–C408; 2003.

OPAL; S. M.; WHERRY; J. C. AND GRINT; P. Interleukin-10: Potential Benefits and Possible Risks in. **Clinical Infectious Diseases.** v. 27; n. 6; p. 1497–1507; 1998.

PEREZ; E.A.; HILLMAN; D.W.; MAILLIARD; J.A.; INGLE; J.N.; RYAN; J.M.; FITCH; T.R.; ROWLAND; K.M.; KARDINAL; C.G.; KROOK; J.E.; KUGLER; J.W.; DAKHIL; S.R. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline; a taxane; or both. **J Clin Oncol.** v. 22; 14; p. 2849-2855. 2004.

POLYAK; S. J.; MORISHIMA; C.; SHUHART; M. C.; WANG; C. C.; LIU; Y. AND LEE; D. Y.-W. Inhibition of T-cell inflammatory cytokines; hepatocyte NF-kappaB signaling; and HCV infection by standardized Silymarin. **Gastroenterology.** v. 132; n. 5; p. 1925–1936; 2007.

POZZO; C.; BASSO; M.; CASSANO; A.; QUIRINO; M.; SCHINZARI; G.; TRIGILA; N.; VELLONE; M.; GIULIANTE; F.; NUZZO; G. E BARONE; C. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5- fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. **Ann Oncol.** v.15; n. 6; p. 933-939; 2004.

PRAKASH; P.; SINGH; V.; JAIN; M.; RANA; M.; KHANNA; V.; BARTHWAL; M. K. AND DIKSHIT; M. Silymarin ameliorates fructose induced insulin resistance syndrome by reducing de novo hepatic lipogenesis in the rat. **European Journal of Pharmacology.** v. 727; p. 15–28; 2014.

RAETZ; C. R.; ULEVITCH; R. J.; WRIGHT; S. D.; SIBLEY; C. H.; DING; A. AND NATHAN; C. F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **The FASEB Journal.** v.5; 12; p. 2652–2660; 1991.

RAINONE; F. Milk thistle. **American Family Physician.** v. 72; n. 7; p. 1285–1288; 2005.

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

RIBRAG; V.; KOSCIELNY; S.; VANTELON; J.M.; FERME; C.; RIDELLER; K.; CARDE; P.; BOURHIS; J.H. E MUNCK; J.N. Phase II trial of irinotecan (CPT-11) in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma.** v. 44; n. 9; p. 1529-1533; 2003.

ROBINSON; S.M.; WILSON; C.H.; BURT; A.D.; MANAS; D.M.; WHITE; S.A. Chemotherapy-associated liver injury in patients with colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis. **Ann Surg Oncol.** v. 19; n. 13; p. 4287-4299; 2012.

ROUGIER; P.; MILAN; C.; LAZORTHE; F.; FOURTANIER; G.; PARTENSKY; C.; BAUMEL; H. E FAIVRE; J. Prospective study of prognostic factors in patients with unresected hepatic metastases from colorectal cancer. Fondation Française de Cancérologie Digestive. **Br J Surg.** v. 82; n. 10; p. 1397-400; 1995.

RUBBIA-BRANDT; L.; AUDARD; V.; SARTORETTI; P.; ROTH; A.D.; BREZAULT; C.; LE CHARPENTIER; M.; DOUSSET; B.; MOREL; P.; SOUBRANE; O.; CHAUSSADE; S.; MENTHA; G. E TERRIS; B. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Ann Oncol.** v. 15; n. 3; p. 460-466; 2004.

SALTZ; L. Oral chemotherapy for colorectal cancer: some economic considerations. **Oncology (Williston Park).** v. 15; n. 1; Suppl. 2; p. 29-32; 2001.

SAMAVATI; L.; RASTOGI; R.; DU; W.; HÜTTEMANN; M.; FITE; A. AND FRANCHI; L. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. **Molecular Immunology.** v. 46; n. 8–9; p. 1867–1877; 2009.

SCHINDELIN; J.; ARGANDA-CARRERAS; I.; FRISE; E.; KAYNIG; V.; LONGAIR; M.; PIETZSCH; T.; PREIBISCH; S.; RUEDEN; C.; SAALFELD; S.; SCHMID; B.; TINEVEZ; J.-Y.; WHITE; D. J.; HARTENSTEIN; V.; ELICEIRI; K.; TOMANCAK; P. AND CARDONA; A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods.** v. 9; n. 7; p. 676–682; 2012.

SEHGAL; P. B.; WANG; L.; RAYANADE; R.; PAN; H. AND MARGULIES; L. Interleukin-6-Type Cytokines. **Annals of the New York Academy of Sciences.** v. 762; n. 1; p. 1–14; 1995.

SIEGEMUND; S. AND SAUER; K. Balancing pro- and anti-inflammatory TLR4 signaling. **Nature Immunology.** v. 13; n. 11; p. 1031–1033; 2012.

SINGH; R. P. AND AGARWAL; R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. **European Journal of Cancer.** v. 41; n. 13; p. 1969–1979; 2005.

STRADER; D. B.; BACON; B. R.; LINDSAY; K. L.; LA BRECQUE; D. R.; MORGAN; T.; WRIGHT; E. C.; ALLEN; J.; KHOKAR; M. F.; HOOFNAGLE; J. H.; SEEFF; L. B. Use of

complementary and alternative medicine in patients with liver disease. **Am J Gastroenterol.** v. 97; n. 9; p. 2391-2397; 2002.

STREETZ; K. L.; LUEDDE; T.; MANNS; M. P. AND TRAUTWEIN; C. Interleukin 6 and liver regeneration. **Gut.** v. 47; n. 2; p. 309-312; 2000.

TAGA; K. AND TOSATO; G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **Journal of Immunology.** (Baltimore; Md.: 1950) v. 148; n. 4; p. 1143-1148; 1992.

TÄGER; M.; DIETZMANN; J.; THIEL; U.; NEUMANN; K. H. AND ANSORGE; S. Restoration of the cellular thiol status of peritoneal macrophages from CAPD patients by the flavonoids silibinin and silymarin. **Free Radical Research.** v. 34; n. 2; p. 137-151; 2001.

TAKASUNA; K.; HAGIWARA; T.; HIROHASHI; M.; KATO; M.; NOMURA; M.; NAGAI; E.; YOKOI; T. E KAMATAKI; T. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.** v. 56; n. 16; p. 3752-3757; 1996.

TALLMAN; M.N.; RITTER; J.K. E SMITH; P.C. Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Drug Metab Dispos.** v. 33; n. 7; p. 977-983; 2005.

TE VELDE; A. A.; DE WAAL MALEFIJT; R.; HUIJBENS; R. J.; DE VRIES; J. E. AND FIGDOR; C. G. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma; IL-4; and IL-10. **Journal of Immunology.** (Baltimore; Md.: 1950) v. 149; n. 12; p. 4048-4052; 1992.

TILG; H.; MOSCHEN; A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology.** v. 52; n. 5; p. 1836-1846; 2010.

TOSATO; G. AND JONES; K. D. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. **Blood.** v. 75; n. 6; n. 1305-1310; 1990.

TROUILLAS; P.; MARSAL; P.; SVOBODOVÁ; A.; VOSTÁLOVÁ; J.; GAZÁK; R.; HRBÁČ; J.; SEDMERA; P.; KREN; V.; LAZZARONI; R.; DUROUX; J. L.; WALTEROVÁ; D. Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: a joint experimental and theoretical study. **J Phys Chem A.** v. 112; n. 5; p. 1054-1063; 2008.

VALENZUELA; A. E GARRIDO; A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. **Biol Res.** v. 27; p. 105-112; 1994.

VARGAS-MENDOZA; N.; MADRIGAL-SANTILLAN; E.; MORALES-GONZALEZ; A.; ESQUIVEL-SOTO; J.; ESQUIVEL-CHIRINO; C.; GARCIA-LUNA Y GONZALEZ-RUBIO; M.; GAYOSSO-DE-LUCIO; J. A.; MORALES-GONZALEZ; J. A. Hepatoprotective effect of silymarin. **World Journal of Hepatology.** v. 6; n. 3; p. 144-149; 2014.

VAUTHEY; J.N.; PAWLIK; T.M.; RIBERO; D.; WU; T.T.; ZORZI; D.; HOFF; P.M.; XIONG; H.Q.; ENG; C.; LAUWERS; G.Y.; MINO-KENUDSON; M.; RISIO; M.; MURATORE; A.; CAPUSSOTTI; L.; CURLEY; S.A. E ABDALLA; E.K. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. **J Clin Oncol.** v. 24; n. 13; p. 2065-2072; 2006.

VO; V.A.; LEE; J.W.; PARK; J.H.; KWON; J.H.; LEE; H.J.; KIM; S.S.; KWON; Y.S. E CHUN; W. N-(p-Coumaryol)-Tryptamine Suppresses the Activation of JNK/c-Jun Signaling Pathway in LPS-Challenged RAW264.7 Cells. **Biomol Ther (Seoul).** v. 22; n. 3; p. 200-206; 2014.

WEI; A.C.; GREIG; P.D.; GRANT; D.; TAYLOR; B.; LANGER; B.; GALLINGER; S. Survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a 10-year experience. **Ann Surg Oncol.** v. 13 n. 5; p. 668-676; 2006.

WILASRUSMEE; C.; KITTUR; S.; SHAH; G.; SIDDIQUI; J.; BRUCH; D. WILASRUSMEE; S. E KITTUR; D.S. Immunostimulatory effect of Silybum Marianum (milk thistle) extract. **Med Sci Monit.** v. 8; n. 11; p. 439-443; 2002.

WILLEMS; F.; MARCHANT; A.; DELVILLE; J. P.; GÉRARD; C.; DELVAUX; A.; VELU; T.; DE BOER; M. AND GOLDMAN; M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. **European Journal of Immunology.** v. 24; n. 4; p. 1007–1009; 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em: 14/08/2014.

ZHANG; W.; HONG; R. AND TIAN; T. Silymarin's Protective Effects and Possible Mechanisms on Alcoholic Fatty Liver for Rats. **Biomolecules & Therapeutics.** v. 21; n. 4; p. 264–269; 2013.

ZHU; S. Y.; DONG; Y.; TU; J.; ZHOU; Y.; ZHOU; X. H. AND XU; B. Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. **Pharmacognosy Magazine.** v. 10; Suppl. 1; p. S92–S99; 2014.