



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Kívia Queiroz de Andrade

**MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DA
N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS COM COLITE ULCERATIVA GRAVE
INDUZIDA POR SULFATO DE SÓDIO DEXTRANA**

Maceió - AL

2017

KÍVIA QUEIROZ DE ANDRADE

**MANIFESTAÇÕES HEPÁTICAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DA
N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS COM COLITE ULCERATIVA GRAVE
INDUZIDA POR SULFATO DE SÓDIO DEXTRANA**

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

Orientador (a): Prof^a. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Coorientador (a): Prof^a. Dra. Juliana Célia de Farias Santos

Maceió – AL

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

A553i Andrade, Kívia Queiroz de.

 Manifestações hepáticas após administração da N-acetilcisteína em camundongos com colite ulcerativa grave induzida por sulfato de sódio dextrana / Kívia Queiroz de Andrade. – 2017.
 140 f. : il.

 Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

 Coorientadora: Juliana Célia de Farias Santos.

 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2017.

 Bibliografia: f. 62-74.

 1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Doenças do fígado. 4. N-acetilcisteína.
 I. Título.

CDU: 616.36



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Kívia Queiroz de Andrade

Manifestações hepáticas após administração da N-acetilcisteína em camundongos com colite ulcerativa grave induzida por sulfato de sódio dextrana

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 17 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora

Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart (Orientador)

Prof.ª Dr.ª Suzana Lima de Oliveira – (UFAL)

Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam - (UFS)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades surgidas, por ter me proporcionado força nos momentos ruins e alegres, além de proteção, amor, paz, saúde, sabedoria e por sempre iluminar o meu caminho;

Aos meus pais, Edvânia Bezerra e Sandro Rodrigues, por terem me apoiado nas decisões tomadas, pelo companheirismo, amor, proteção, atenção e cuidado que me deram e dão;

Aos meus amigos Joelma Carvalho e Lucas David, por sempre estarem comigo em diversos momentos da minha vida, sejam eles ruins ou alegres, pelo apoio, companheirismo, conselhos, força e amizade;

À minha orientadora Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, pelas oportunidades oferecidas, apoio, incentivo, por ser um exemplo de superação, de força, de trabalho, de persistência e de grande pesquisadora;

À Profa. Dra. Fabiana Moura, John Marques, Me. Orlando de Araújo e Profa. Dra. Juliana Célia, por todo o apoio, carinho, ensinamentos, aprendizados, desafios, amizade, força e oportunidades oferecidas;

À Dra. Junia Porto, pelo carinho, confiança, apoio, incentivo, conselhos e disponibilidade de tempo quando precisei;

Ao Prof. Charles Estevam, pela generosidade em fornecer animais no início do trabalho;

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Santana, LPqRN, CECA/UFAL, por nos permitir a usar o biofreezer e o espectrofotômetro do seu laboratório;

Aos alunos de iniciação científica Amylly Martins, pela ajuda com os cortes histológicos e coloração, e Nicholas Deymisson, pelos momentos agradáveis e auxílio quando precisei;

A todos que fazem parte do Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo do IQB/UFAL, pelo acolhimento e momentos de risada;

Aos Professores Doutores Emiliano Barreto e Salete Smaniotto do Laboratório de Biologia Celular do ICBS/UFAL, pela disponibilidade e auxílio sempre que o grupo Estresse Oxidativo precisa;

Aos colegas da pós-graduação, em especial ao Emanuel Tenório, Alex Wanderley, Kledson Lopes, Ithallo Sathio, Samário Lino, Jean Phellipe e Flávio Martins pela convivência, momentos agradáveis, palavras de apoio e incentivo, confiança e acolhimento;

Aos membros do Laboratório de Genética de Microrganismos e Microscopia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL), em especial ao Prof. Dr. Gildemberg Leal e aos alunos Livoney Barbosa e Ana Paula, pelo aprendizado na técnica de PCR, acolhimento, convivência e por terem me ensinado o significado de generosidade na Ciência;

A todos os professores das disciplinas que cursei, por todos os ensinamentos;

À Faculdade de Nutrição da UFAL, por ceder não só o biotério, mas todos os espaços e condições físicas para a realização da parte experimental;

À UFAL, CAPES, CNPq, FAPEAL e demais agências de financiamento;

Ao corpo técnico da UFAL, em especial a Elenita Barros e a Edneide Silva, por todo apoio logístico;

Ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas;

Aos demais amigos e colegas, pelo convívio, apoio e amizade e que também contribuíram para o meu crescimento profissional e como ser humano.

MUITO OBRIGADA!!

RESUMO

A colite ulcerativa (CUI) é uma doença inflamatória intestinal (DII) que acomete o intestino grosso. Pode desencadear dano hepático. A inflamação e o estresse oxidativo (EO) são os principais mediadores desse dano. A N-acetilcisteína (NAC) apresenta ação antioxidante, principalmente pela capacidade de estimular a síntese de glutatona reduzida (GSH), e ação anti-inflamatória, por meio de seu efeito inibitório sobre o fator nuclear κ B (NF- κ B). No entanto, há controvérsias em relação à sua eficácia farmacológica no dano hepático. Diante disso, o presente trabalho teve como proposta avaliar as repercussões da administração da NAC em camundongos com CUI grave, induzida por sulfato de sódio dextrano (SSD). Para tanto, camundongos machos Swiss (n=18), 8 semanas de idade, foram acondicionados aleatoriamente, segundo o grupo de tratamento: Controle (C) (n=6); Colite (CUI) (n=6) (SSD 5% (m/v), via oral, nos últimos 7 dias do total de 37 dias de período experimental) e Colite tratados com NAC (NACc) (n=6) (150 mg/kg/dia, via oral, água de beber, durante 37 dias, e induzida a colite nos últimos 7 dias). A análise da ingestão dietética e a pesagem dos animais foram realizadas semanalmente. Os níveis glicêmicos foram dosados antes do período experimental, após 30 dias e no dia da eutanásia. Após a eutanásia, foram verificados os pesos absoluto (PA) e relativo (PR) do fígado e baço e, em seguida foram feitas as seguintes análises no tecido hepático: histológica (incluindo a do intestino grosso), de dano oxidativo e defesa antioxidante e de inflamação. Foram usados ANOVA e teste de Tukey para variáveis paramétricas, e teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para variáveis não-paramétricas. Adotou-se até 5% de significância. Foi observada perda da arquitetura hepática no grupo CUI, no entanto a NAC não melhorou o dano. Não houve alteração da massa corporal dos animais decorrente da colite e do tratamento com a NAC ($p>0,05$), mesmo com o aumento da ingestão alimentar do grupo CUI em relação ao grupo C, durante a fase de indução da colite ($p<0,05$). O tratamento com a NAC e a colite não alterou PA e PR do fígado ($p>0,05$), no entanto foi observado aumento do PA e PR do baço nos animais do grupo NACc ($p<0,01$ entre C e NACc). Em relação aos dados bioquímicos, foi visto que a colite elevou a glicemia ($p<0,001$, CUI em relação ao C), e que o tratamento com a NAC não teve efeito hipoglicemiante ($p<0,001$, NACc em relação ao C). Níveis de MDA dos grupos CUI diferiram do grupo C ($p<0,001$), apresentando um aumento, no entanto, a NAC não atenuou a peroxidação lipídica ($p>0,05$ em relação ao CUI). Quando a NAC foi fornecida aos camundongos do grupo NACc, houve aumento dos níveis de GSH (diminuída no grupo CUI), semelhante ao apresentado pelo grupo C ($p<0,05$, CUI vs NACc; C vs CUI). Adicionalmente, a NAC elevou a razão GSH/GSSG do grupo tratado, em comparação com o grupo CUI ($p<0,05$). Por outro lado, observou-se uma diminuição significativamente da atividade da SOD nos grupos CUI e NACc em relação ao controle ($p<0,05$), devido, possivelmente, à diminuição estatisticamente da atividade de MPO hepática entre os grupos CUI e NACc em relação ao grupo C, ($p<0,05$, C vs CUI e NACc). Baixos níveis de IL-10 foram encontrados no grupo CUI e NACc ($p<0,05$, CUI e NACc vs C). Sobre os níveis de TNF- α , não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$). Conclui-se que a NAC não foi eficaz na atenuação do dano hepático.

Palavras-chaves: Antioxidantes. Estresse oxidativo. Dano hepático. N-acetilcisteína.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease (IBD) that affects the large intestine. It can trigger liver damage. Inflammation and oxidative stress (OS) are the main mediators of this damage. N-acetylcysteine (NAC) has an antioxidant action, mainly for the ability to stimulate the synthesis of reduced glutathione (GSH), and anti-inflammatory action, through its inhibitory effect on nuclear factor κ B (NF- κ B). However, there is controversy regarding its pharmacological efficacy in liver damage. Therefore, the present study aimed to evaluate the repercussions of NAC administration in mice with severe UC, induced by dextran sulfate sodium (DSS). For this, Swiss male mice (n=18), 8 weeks old, were randomly conditioned according to the treatment group: Control (C) (n=6); Colitis (UC) (n=6) (DSS) (5% (m/v), orally, in the last 7 days of the total of 37 days of the experimental period); Colitis treated with NAC (NACc) (n=6) (150 mg/kg/day, orally, drinking water for 37 days, and induced colitis in the last 7 days). The analysis of dietary intake and weighing of the animals were carried out weekly. The glycemic levels were measured before the experimental period, after 30 days and on the day of euthanasia. After the euthanasia, the absolute (PA) and relative (PR) weights of the liver and spleen were verified and, then the following analyzes were performed on hepatic tissue: histological (including large intestine), oxidative damage and antioxidant defense and inflammation. ANOVA and Tukey test were used for parametric variables, and Kruskal-Wallis test and Dunn test for non-parametric variables. Up to 5% significance was adopted. Loss of hepatic architecture was observed in the UC group, however the NAC did not improve the damage. There was no change in body mass of the animals due to colitis and treatment with NAC ($p>0.05$), even with increased dietary intake of the UC group in relation to group C, during the colitis induction phase ($p<0.05$). Treatment with NAC and colitis did not alter PA and PR of the liver ($p>0.05$), however an increase of PA and PR of the spleen was observed in the animals of the NACc group ($p<0.01$ between C and NACc). Regarding the biochemical data, it was observed that colitis increased blood glucose ($p<0.001$, UC in relation to C), and that treatment with NAC had no hypoglycemic effect ($p<0.001$, NACc in relation to C). MDA levels of the UC groups differed from the C group ($p<0.001$), showing an increase, however, the NAC did not attenuate the lipid peroxidation ($p>0.05$ in relation to the UC). When NAC was given to the mice in the NACc group, there was an increase in GSH levels (decreased in the UC group), similar to that presented by group C ($p<0.05$, UC vs NACc, C vs UC). In addition, NAC elevated the GSH/GSSG ratio of the treated group compared to the UC group ($p<0.05$). On the other hand, there was a significant decrease in SOD activity in the UC and NACc groups in relation to the control ($p<0.05$), possibly due to the statistically decreased hepatic MPO activity between the UC and NACc groups in ($P<0.05$, C vs UC and NACc). Low IL-10 levels were found in the UC and NACc group ($p<0.05$, CUI and NACc vs C). On TNF- α levels, there was no significant difference between the groups ($p>0.05$). We conclude that NAC was not effective in attenuating liver damage.

Key-words: Antioxidants. Oxidative stress. Hepatic damage. N-acetylcysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas da N-acetilcisteína e glutathiona reduzida	19
Figura 2 – Desenho experimental	33
Figura 3 – Eutanásia dos animais no trigésimo sétimo dia (37º) do experimento, em que foram anestesiados com tiopental, 40 mg/kg a 2,5% (via i.p.) e diazepam, 5 mg/kg (i.p.), para realização da punção cardíaca (A), seguida de perfusão ventricular (B), retirada dos órgãos (C), imersão em solução salina 0,9% (D), postos em vidros de relógio para pesagem (E), e posterior acondicionamento em eppendorfs (F), com um fragmento separado para imersão em solução de Bouin (G)	36
Figura 4 – Fragmento do fígado (A) e intestino grosso (B) (seta preta) utilizado para análise histológica	37
Figura 5 – Fluxograma experimental do tratamento dado ao tecido hepático para obtenção do homogeneizado	38
Figura 6 – Avaliação da ingestão de água, ganho ponderal, ingestão alimentar e glicemia, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)	47
Figura 7 – Pesos absoluto e relativo do baço e fígado, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)	50
Figura 8 – Aspectos morfológicos do fígado de camundongos	52
Figura 9 – Aspectos morfológicos do cólon de camundongos	53
Figura 10 – Efeito da CUI e da NAC sobre os marcadores de dano oxidativo hepático (A, B, C), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)	54
Figura 11 – Efeito da CUI e da NAC sobre os marcadores de defesa antioxidante hepático (A, B, C, D), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)	56
Figura 12 – Efeito da CUI e NACc sobre os marcadores de inflamação, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)	59

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss	23
Esquema 2 – Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH)	40
Esquema 3 – Reação entre o peróxido de hidrogênio e o vermelho de fenol	41
Esquema 4 – Reação entre o ânion radical superóxido e o WST-1	42
Esquema 5 – Reação de oxidação da GSH e da redução da GSSG	43
Esquema 6 – Reação entre o peróxido de hidrogênio e a <i>orto</i> -dianisidina	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citocinas envolvidas na patogênese da lesão hepática	27
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição da dieta comercial RHOSTER®	34
---	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AG: Ácidos graxos

AGPI: Ácidos graxos poli-insaturados

ANOVA: Análise de Variância

ABS: Absorvância

ALP: Fosfatase alcalina, *Alkaline phosphatase*

AP-1: Proteína ativadora 1

AST: Aspartato aminotransferase

ALT: Alanina aminotransferase

ARE: Elemento de Resposta Antioxidante, *Antioxidant response element*

BHT: Butil hidroxitolueno

CAT: Catalase

CUI: Colite ulcerativa

DII: Doença inflamatória intestinal

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

DC: Doença de Crohn

DNPH: 2,4-dinitrofenilidrazina

DTNB: Ácido 5,5'-bisditionitro-2-nitrobenzóico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

EHNA: Esteato-hepatite não alcoólica

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

ERONs: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EO: Estresse oxidativo

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

GSH: Glutathiona reduzida

GSSG: Glutathiona oxidada

GPx: Glutathiona peroxidase

GR: glutathiona redutase

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSCs: Células estreladas hepáticas

HE: Hematoxilina-esoina

IQB: Instituto de Química e Biotecnologia

IL: Interleucina

IKK: I κ B cinase, *inhibitor of κ B kinase*

INF- γ : Interferon- γ

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1, *Intercellular Adhesion Molecule 1*

LPS: Lipopolissacarídeo

LEO₂: Laboratório de Eletroquímica

MDA: Malondialdeído

NF- κ B: Fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa das células ativadas B, *nuclear fator kappa-light-chain enhancer of activated B cells*

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida

NADP⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidada

NQO1: NADPH ubiquinona oxidorredutase

NEM: N-etilmaleimida

Nrf2: Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2, *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*;

PAMPs: Padrão molecular associado ao patógeno, *pathogen-associated molecular pattern*

PBS: Tampão fosfato

PR: Peroxidase de rabanete

PON: paraoxonases

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões

p/v: Porcentagem em massa/volume

R-SH: Tiol

-SH: Grupo sulfidril

SEC: Células endoteliais sinusoidais, *sinusoidal endothelial cells*

SOD: Superóxido dismutase

SSD: Sulfato de sódio dextrano

SREBP: Proteínas de ligação ao elemento de regulação de esterol, *sterol regulatory element-binding protein*

Trx(SH)₂/TrxS-S: Tiorredoxina reduzida/oxidada

TCA: Ácido tricloroacético

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α , *Tumor necrosis factor- α*

TLR-4: Receptor Toll-like-4, *Toll-like receptor 4*

TLRs: Receptores semelhantes ao Toll, *Toll-like receptors*

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

UV: Ultravioleta

UFAL: Universidade Federal de Alagoas

Vis: Visível

γ -GT: Gama-glutamil transferase

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

HCl: Ácido clorídrico

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HO $\cdot$: Radical hidroxila

CO₃ $\cdot^-$: Radical carbonato

O₂ $\cdot^-$: Ânion radical superóxido

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlete

4-HNE: 4-hidroxinonenal

NO: Óxido nítrico

ONOO⁻: Peroxinitrito

HClO: Ácido hipocloroso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Doença inflamatória intestinal.....	21
2.2	Colite ulcerativa na indução do dano hepático: envolvimento do estresse oxidativo e inflamação.....	23
2.3	Possibilidades terapêuticas da N-acetilcisteína no dano hepático.....	27
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Geral.....	31
3.2	Específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Material e equipamentos.....	32
4.2	Animais de experimentação.....	32
4.3	Desenho experimental.....	32
4.4	Estimativa da ingestão alimentar.....	34
4.5	Determinação do ganho de massa corporal.....	34
4.6	Determinação da glicemia de jejum.....	35
4.7	Eutanásia, coleta de órgãos e análises bioquímicas.....	35
4.7.1	Análise histológica dos órgãos.....	38
4.7.2	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	38
4.7.3	Determinação dos marcadores de dano oxidativo.....	39
4.7.4	Determinação dos marcadores de defesa antioxidante.....	41
4.7.5	Determinação dos marcadores de inflamação.....	43
4.8	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Estimativa da ingestão de água e efeito da NAC sobre a massa corporal, ingestão alimentar e glicemia.....	46
5.2	Efeito da NAC sobre os pesos absoluto e relativo do fígado e baço.....	49
5.3	Observações histológicas no fígado e cólon.....	50
5.4	Efeito da NAC sobre os marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático.....	53
5.5	Efeito da NAC sobre os marcadores de inflamação no tecido hepático.....	58

6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICE.....	75

1 INTRODUÇÃO

A colite ulcerativa (CUI) e a doença de Crohn (DC) fazem parte de um grupo de desordens inflamatórias gastrointestinais (DII) com respostas imunológicas e desfechos clínicos adversos de caráter recidivante (TRIVEDI; JENA, 2013). A CUI acomete predominantemente o cólon e o reto, enquanto que a DC compromete qualquer região do trato gastrointestinal (SUNG; PARK, 2013). A etiologia de ambas as doenças é multifatorial, podendo ser decorrente de uma resposta imunológica inadequada a um fator ambiental, como um micro-organismo intestinal, como pode ser causada por predisposição genética, fatores alimentares e alterações na permeabilidade intestinal (PEARL et al., 2013).

Propõe-se que a inflamação da mucosa intestinal provoca alteração na defesa antioxidante e torna o tecido mais susceptível a danos oxidativos (TUZUNA et al., 2002), levando a um estado de estresse oxidativo (EO), definido como uma perturbação do equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e defesas antioxidantes, que resulta em danos a proteínas, carboidratos e lipídios e alteração na sinalização celular e controle redox. Por sua vez, ao longo do processo fisiopatológico, o EO pode desencadear alterações estruturais da mucosa intestinal elevando, consideravelmente, o risco de translocação bacteriana (QUIGLEY; STANTON; MURPHY, 2013), definida como o deslocamento de bactérias e/ou produtos bacterianos (lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ácido desoxirribonucleico – DNA bacteriano, etc.) a partir do intestino para outros órgãos, circulação sistêmica e nódulos linfáticos mesentéricos (WIEST; LAWSON; GEUKING, 2014).

O fígado é um órgão intimamente ligado ao intestino através da veia porta, e, portanto, passa a ser alvo direto do processo inflamatório crônico intestinal, o que leva à indução e à progressão de lesão hepática (CESARO et al., 2011), podendo gerar um quadro de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), caracterizada por esteatose, esteato-hepatite, cirrose e com risco de hepatocarcinoma (TRIVEDI; JENA, 2013). O excesso de gordura hepática é frequentemente encontrado em 38-49% dos pacientes com DC ou CUI, apresentando algumas vezes elevações das transaminases. Esse fato vem sendo evidenciado em publicações de relatos de casos e séries (SOURIANARAYANANE et al., 2013).

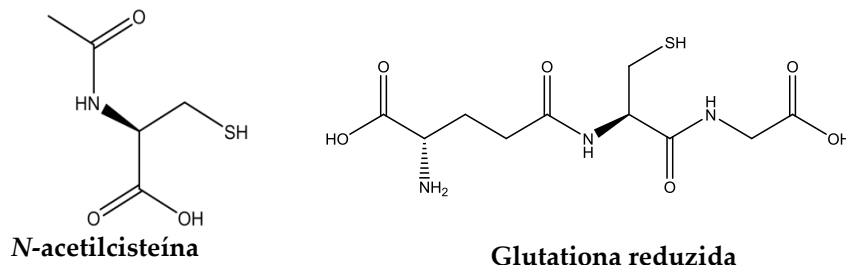
O grupo de pesquisa Estresse Oxidativo do Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO) (IQB/UFAL), coordenado pela Prof.^a Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, vem trabalhando com a fisiopatologia e terapêutica do dano hepático desde 2012. Dentre os trabalhos realizados e publicados pelo grupo, foi observado, em estudo de Moura et

al. (2016) que a colite ulcerativa aguda leve, induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD) (2% m/v), não ocasionou lesão hepática, avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de dano oxidativo lipídico, e pelos níveis plasmáticos de transaminases (MOURA et al., 2016). Os resultados deste último sugeriram que as manifestações extra-intestinais das DII poderiam ser mais prevalentes só em pacientes com grau de severidade moderada a grave, corroborando com as informações descritas em guias internacionais, como o *Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee*, 2010 (KORNBLUTH et al., 2010).

Sugere-se que o mecanismo fisiopatológico do comprometimento hepático decorrente da CUI ocorra mediante efeitos diretos de bactérias ou de seus produtos, como a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS), que é um potente ativador do receptor Toll-like-4 (*Toll-like receptor 4* - TLR-4), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral - α (TNF- α), e enzimas envolvidas com o EO, como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ocasionando um quadro de inflamação e desequilíbrio redox no fígado (KOPPE, 2014). Sabe-se que o TNF- α tem um papel central no desenvolvimento da esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado superior a 5-10% em peso) (FELDSTEIN et al., 2004; HENAO-MEJIA et al., 2012; SOURIANARAYANANE et al., 2013). Além disso, a endotoxemia metabólica pode afetar a via de sinalização da insulina, contribuindo para a resistência à insulina, e assim colaborar com o desenvolvimento e evolução da lesão hepática (MOSCHEN; KASER; TILG, 2013).

O manejo terapêutico utilizando compostos antioxidantes vem sendo testado em diversas doenças que apresentam atividade inflamatória e EO como parte do seu processo fisiopatológico. Dentre essas substâncias, a *N*-acetilcisteína (NAC) (Figura 1) tem sido investigada para o tratamento de algumas enfermidades, tais como a insuficiência hepática, inflamação, nefropatia e distúrbios cerebrais. O papel da NAC resulta no aumento do pool de glutathiona reduzida (GSH) (Figura 1), que apresenta grupo sulfidríla (-SH) sendo assim, capaz de eliminar diretamente as EROs, incluindo o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), através da formação de glutathiona oxidada (GSSG) e água (MOREIRA et al., 2016; SZKUDLINSKA et al., 2016). Além disso, a NAC tem função anti-inflamatória através da inibição do fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa das células B ativadas (NF- κ B) e diminuição de algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e interleucina-6 (IL-6) (ARRANZ et al., 2008; DHOUIB et al., 2016; KASPERCZYK et al., 2014).

Figura 1: Estruturas químicas da *N*-acetilcisteína e glutathiona reduzida



Fonte: ANDRADE, K. Q.

Muitos estudos mostraram que a NAC inibe a expressão do TNF- α e da NF- κ B, ambos envolvidos na fisiopatologia da lesão hepática (WANG et al., 2006). No entanto, há controvérsia na literatura quanto à sua eficácia farmacológica, devido ao fato da NAC ter apresentado ação pró-oxidante, toxicidade por acúmulo de amônia em agravos hepáticos e efeitos adversos, como vômito e diarreia, além de ter falhado em apresentar ação antioxidante e anti-inflamatória *in vivo* (AITIO, 2005; KHAYYAT et al., 2016; PENUGONDA, ERCAL, 2011).

Por apresentar a função de precursora de GSH, a capacidade hepatoprotetora da NAC tem sido associada à prevenção de doenças hepáticas caracterizadas pela diminuição de GSH e/ou aumento do EO (LASRAM et al., 2014). Uma revisão sistemática, realizada por Andrade et al. (2015), sobre o efeito antioxidante e anti-inflamatório da NAC nas lesões hepáticas, demonstrou que esse composto em qualquer forma de administração (intraperitoneal – i.p. –, intramuscular – i.m. –, intravascular – i.v. –, oral ou subcutânea – s.c.) e tipo de estudo (em humanos, *in vivo* e *in vitro*) foi satisfatório em 86,30% (número de estudos=63) dos casos avaliados (número de estudos=73, 100%), ou seja dentre os marcadores de estresse oxidativo e inflamação analisados no tecido hepático e/ou no plasma/soro, a NAC melhorou ao menos um marcador de defesa antioxidante e/ou anti-inflamatório.

Diante disso, sabendo que a CUI é de caráter recidivante, e que o grau de severidade grave leva a vários processos metabólicos, incluindo EO e inflamação, que desencadeiam o dano hepático, para a interrupção desses processos de dano, é necessária uma eficaz capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Considerando que na literatura não existem estudos, até a presente data, sobre os efeitos hepáticos da administração da NAC em animais com CUI aguda grave e que a ação farmacológica desse composto vem levando a resultados

contraditórios na literatura, investigações que avaliem a sua eficácia farmacológica, do ponto de vista antioxidante e anti-inflamatório, são de fundamental importância, contribuindo para o estabelecimento de intervenções seguras. Portanto, este trabalho visa avaliar as manifestações hepáticas, no contexto do estresse oxidativo e da inflamação, a partir da administração subcrônica da *N*-acetilcisteína, em camundongos com colite ulcerativa grave induzida por sulfato de sódio dextrana, a 5%.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença inflamatória intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem duas enfermidades que afetam os intestinos cronicamente: a CUI e a DC (GARN et al., 2013). Ambas se caracterizam pela recorrência e por serem imunologicamente mediadas, tendo como principal evento, o processo inflamatório crônico (WALSH et al., 2013).

A etiologia das DII é multifatorial e envolve fatores genéticos, imunes, ambientais, alimentares e alterações na permeabilidade intestinal (CAMILLERI, 2009). A CUI é delimitada ao comprometimento da mucosa do cólon, e, com maior frequência, o cólon sigmoide e reto; ocorre de forma ininterrupta com resposta inflamatória confinada, em grande parte, à mucosa e submucosa, tendo como manifestação clínica mais comum a diarreia sanguinolenta (MELGAR; SHANAHAN, 2010). Em contraste, a DC pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, é de caráter segmentar com padrão transmural, acometendo desde a mucosa até a serosa, com sintomas de dor abdominal, diarreia e perda ponderal (CARTER et al., 2004).

As DII são diagnosticadas com base na apresentação clínica, exames bioquímicos e da mucosa, usando endoscopia, biópsia e exames imagiológicos (GARN et al., 2013). A terapia medicamentosa para as DII utiliza aminossalicilatos, antibióticos, corticosteroides, agentes biológicos, imunomoduladores e imunossupressores. Atualmente não há cura para DC e, portanto, a terapêutica tem como objetivo, manter o indivíduo acometido em fase de remissão por longo período e com boa qualidade de vida. A mesma abordagem é realizada para a CUI. O procedimento cirúrgico é geralmente reservado para pacientes com intratabilidade medicamentosa, câncer colorretal, megacólon tóxico, hemorragia, estenose e fístulas (NASIM et al., 2016).

Há algum tempo atrás, as DII ocorriam, principalmente, em populações brancas da Europa, América do Norte e Austrália; no entanto, tem sido observado um aumento na sua incidência em países em desenvolvimento, pertencentes aos continentes da Ásia, África e América Latina. Os dados de prevalência e incidência das DII no mundo variam segundo a região geográfica e grupos étnicos. Sabe-se que o pico de início da DC ocorre em indivíduos com idade entre 20 e 30 anos, enquanto que em CUI, entre 30 e 40 anos de idade (MALIK, 2015). No mundo, a incidência de DC varia de 0,7 a 14,6 indivíduos por 100.000 habitantes, ao passo que para CUI, varia de 1,5 a 24,5 indivíduos por 100.000 habitantes, a depender da região (NEUMAN; NANAU, 2012). No Brasil, existem relatos regionais das DII,

descrevendo um aumento no número de casos novos, no entanto não se dispõe de dados epidemiológicos do país, como um todo (ZALTMAN, 2007; CAMBUI; NATALI, 2015).

Modelos animais de colite induzida são muito utilizados para a compreensão da fisiopatologia, planejamento e avaliação de tratamentos. O modelo experimental proposto por Okayasu et al. (1990) utiliza o SSD, um polissacarídeo semelhante à heparina, constituído de porções de *D*-glicose anidra (ligação α -1,6-glicosídica) e sulfato. Este modelo é considerado de fácil execução, por ser o SSD administrado na água de beber dos animais, proporciona alta reprodutibilidade e mimetiza as características clínicas da CUI em humanos, tais como perda de massa corporal, diarreia, sangue oculto nas fezes e sangramento retal, além de provocar a ruptura da arquitetura da mucosa intestinal (ARAKI et al., 2012; TRIVEDI; JENA, 2013).

A concentração de SSD numa variação de 1% – 5% (m/v), administrada durante 7 dias, é utilizada para a indução de CUI aguda (CLAPPER et al., 2007). No presente estudo, optou-se por utilizar a dose de 5% de SSD, baseado no trabalho de Farombi et al. (2016), que observou hepatotoxicidade em ratos *Wistar* com CUI induzida por 5% SSD, administrada durante 5 dias. SSD é uma molécula de alta massa molecular e carregada negativamente que não atravessa as membranas celulares facilmente, sendo fracamente absorvida quando administrada por via oral. Dessa forma, é geralmente aceito que o SSD exerce seus efeitos diretos sobre a superfície luminal da mucosa do cólon, tornando-se tóxico para as células epiteliais colônicas, e assim, provocando defeitos na integridade da barreira epitelial (MASUBUCHI; HORIE, 2004).

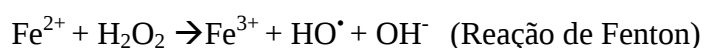
Apesar das DII envolverem principalmente o intestino, podem ocasionar manifestações em outros sistemas do organismo, cuja atividade clínica pode ou não está correlacionada com a atividade das DIIs (BROWN; COVIELLO, 2015), sendo a artrite, a complicação extra-intestinal mais comum (PEYRIN-BIROULET et al., 2016).

As manifestações hepatobiliares também são manifestações extra-intestinais prevalentes entre os pacientes com DII, com destaque para a DHGNA, pericolangite, hepatite granulomatosa, colangite esclerosante primária, colelitíase e amiloidose hepática. A pericolangite é a complicação hepática mais comum da DII, ocorrendo elevações dos níveis séricos de fosfatase alcalina e das bilirrubinas. A hepatotoxicidade também pode ocorrer devido ao uso de medicamentos usados no tratamento da DII, tais como os aminossalicilatos, o metotrexato e a ciclosporina. Em até 20% dos pacientes com DII, têm sido observadas alterações em testes de função hepática. No entanto, a prevalência do dano hepático na DII não está clara, devido às diferenças no método diagnóstico, seleção de indivíduos e tipos de estudos (WIESER et al., 2013).

2.2 Colite ulcerativa na indução do dano hepático: envolvimento do estresse oxidativo e inflamação

Estudos demonstraram que em portadores de CUI ocorre um excesso de H_2O_2 produzido no interior das células colônicas e/ou de macrófagos, e que essa molécula, ao se deslocar (devido sua alta permeabilidade à membrana plasmática) para outros ambientes, é convertida em $HO^\bullet$, através da reação de Haber-Weiss e/ou Fenton (Esquema 1). O radical $HO^\bullet$, por sua vez, lesa a membrana basal e a junção intercelular da mucosa colônica, permitindo a entrada de antígenos bacterianos (FIOCCHI, 1998) e, em consequência, a infiltração de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e linfócitos) e o processo inflamatório característico da CUI, bem como seu típico quadro clínico (PRAVDA, 2005).

Esquema 1: Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss



Com níveis aumentados de células do sistema imune no local do dano intestinal, há uma exacerbação da respiração celular, devido ao aumento do consumo de oxigênio com elevação na liberação e acúmulo de EROs. Adicionalmente, a atuação dessas células no combate à lesão leva à produção de EROs, o que gera um quadro de EO, definido como um estado em que há desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, com aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), causando a disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle e danos a biomoléculas (REUTER et al., 2010; SITI et al., 2015).

O termo EROs é genérico e descreve uma ampla variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron desemparelhado) derivados do oxigênio molecular, dentre os quais, o oxigênio singlete (1O_2), o $O_2^{\bullet -}$, o H_2O_2 e o $HO^\bullet$. Enquanto que as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) correspondem a uma família de oxidantes derivados do nitrogênio, incluindo o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Tais espécies possuem propriedades biológicas distintas, diferindo quanto à reatividade química, meia vida e solubilidade lipídica. A toxicidade e a alta reatividade das EROs resultam da meia vida curta, que, por sua vez, limita sua difusão (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

As EROs podem atacar os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e iniciar a peroxidação lipídica nas membranas de células e organelas, o que resulta na formação de

subprodutos: aldeídos, tais como o MDA e o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Estes dois compostos têm tempos de meia-vida maiores que as EROs e, assim, um potencial de se difundirem a partir do local de origem para atingirem alvos intra- e extracelulares distantes, amplificando os efeitos do EO (COSTA SILVA et al., 2011).

Existem mecanismos abrangentes para a eliminação de EROs, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, constituindo o sistema antioxidante, o qual inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), a NADPH ubiquinona oxidoredutase (NQO1), paraoxonases (PON), e moléculas como a GSH, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), os carotenoides, os flavonoides e polifenóis, entre outros (LEPETSOS; PAPAVALASSIOU, 2016).

A SOD está envolvida na dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , e a CAT ou a GPx reduz o H_2O_2 à água e oxigênio livre ou parcialmente em $HO^{\cdot}$ (MACHADO et al., 2016).

As principais formas de SOD encontradas em humanos são a Cobre/Zinco-SOD (Cu/ZnSOD - forma dimérica) localizada no citosol e a Manganês-SOD (MnSOD - forma tetramérica) localizada na mitocôndria (VASCONCELOS et al., 2007). A CAT está localizada em maior abundância em peroxissomos, já a GPx está relacionada à função antioxidante da GSH, com atividade peroxidásica contra H_2O_2 e peróxidos orgânicos (HALLIWELL, 2007).

A GSH é um tripeptídeo presente em todas as células de mamíferos, considerada o tiol de baixa massa molecular mais abundante em nível celular (0,1 – 10 mM) (ATKURI et al., 2007; HUBER et al., 2008), que mantém um ambiente redox intracelular para o bom funcionamento das biomoléculas e, por isso é considerada a referência da capacidade antioxidante no ambiente celular (ATKURI et al., 2007; CIRCU; AW, 2010). Sua capacidade redutora é atribuída ao seu grupamento $-SH$, sendo considerada um dos mais importantes antioxidantes endógenos, agindo, dentre outras ações, na detoxificação de agentes químicos e na eliminação de produtos da peroxidação lipídica e, indiretamente, mantém o estado reduzido (formas funcionais) das vitaminas C e E (GARAIÓVÁ et al., 2004). Por conseguinte, a atenuação dos níveis de GSH pode refletir uma resposta diminuída contra a lesão oxidativa (BASKOL et al., 2007). Diante disso, a avaliação dos níveis de GSH se torna um parâmetro importante para várias condições patológicas (ALTINOZ et al., 2015).

Os biomarcadores do EO podem ser utilizados como indicadores de processos biologicamente normais e patogênicos ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica, podendo ser utilizados em diagnósticos, prognósticos e terapia individualizada (HO et al., 2013). Os marcadores de dano oxidativo e de defesa antioxidante, descritos anteriormente, são

bem utilizados pelos estudos que avaliam o EO hepático (ANDRADE et al., 2015), devido à importância funcional deles e do que eles representam, tornando-se, portanto, válidos como biomarcadores e, foram os escolhidos no presente estudo.

Como foi visto no tópico anterior, o processo inflamatório intestinal crônico está associado com o desenvolvimento de várias manifestações extra-intestinais, entre as quais, as alterações hepatobiliares são uma das mais prevalentes das DII (TRIVEDI; JENA, 2013), sendo mais comumente observadas em pacientes com CUI. Cerca de 5% dos adultos com DII desenvolvem desordens hepatobiliares, associado ou não com a normalidade nos testes bioquímicos hepáticos (RESELLINI et al., 2016). Há uma grande variabilidade nos dados de prevalência da disfunção hepática nas DII, mas segundo Trivedi et al. (2013), aproximadamente 5 – 10% dos indivíduos com DII desenvolvem lesão hepatobiliar.

O fígado pode ser alvo direto de danos durante a resposta inflamatória exacerbada do cólon nas DII (CESARO et al., 2011; TRIVEDI; JENA, 2013), visto que este órgão está intimamente ligado ao intestino através da drenagem venosa mesentérica ascendente, que se une à veia esplênica para formar a veia porta hepática (COMPARE et al., 2012).

Com a alteração da integridade da mucosa intestinal na CUI, através da expansão das junções gap e destruição do citoesqueleto, decorrentes do processo inflamatório, distúrbios na homeostase redox, bem como entre bactéria e sinais derivados das células do hospedeiro (COMPARE et al., 2012), os portadores dessa doença apresentam risco elevado para translocação bacteriana (TRIVEDI; JENA, 2013). Esse fenômeno é definido como a migração das bactérias ou dos seus produtos a partir do intestino para os linfonodos mesentéricos, circulação sistêmica ou outros órgãos (WIEST et al., 2014). Isso eleva os níveis de LPS, um padrão molecular associado ao patógeno (*pathogen-associated molecular pattern* - PAMPs) e considerado uma endotoxina, que está presente na membrana externa de bactérias gram-negativas (EDWARDS; WANLESS, 2013), relatado por promover respostas inflamatórias, fibrose, genotoxicidade e dano hepatocelular (TRIVEDI; JENA, 2013).

O LPS é transportado na circulação sistêmica a partir do intestino para tecidos-alvo e, dessa forma, correlaciona-se diretamente com a gravidade da doença hepática, cooperando com o início de uma série de eventos inter-relacionados, que conduzem ao desenvolvimento da cirrose e suas complicações (CESARO et al., 2011). Sugere-se que a endotoxemia seja a responsável pelo início do dano hepático através da interação de endotoxinas com os receptores semelhantes ao Toll (*Toll-like receptors* - TLRs) (HENAO-MEJIA et al., 2013). Estes compreendem uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem componentes bacterianos, virais e fúngicos. Desses, o TLR4 possui papel central

na ativação das células de Kupffer, um macrófago do fígado, através da resposta ao LPS (BAFFY, 2009).

Cada população de células no fígado envolvida com o sistema imune inato, tais como células de Kupffer, células *natural killer*, células T *natural killer*, células dendríticas hepáticas, células endoteliais sinusoidais (SECs) e células estreladas hepáticas, apresenta uma diferente expressão de TLR. A ativação deste sistema no fígado pode ser associada com aumento de transaminases e colestase. A interação dos PAMPs com seus receptores específicos resulta na síntese de mediadores pró-inflamatórios, que recrutam células do sistema imune, favorecendo o processo inflamatório (EDWARDS; WANLESS, 2013). O reconhecimento da LPS inicia um conjunto complexo de sinalização do TLR4, permitindo a ativação e localização nuclear dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1) (BAFFY, 2009).

Os dímeros (p50/p65) de NF- κ B estão ligados de forma não covalente a uma proteína inibidora do NF- κ B (I κ B) que impede sua translocação nuclear. Após fosforilação pela I κ B cinase (IKK) e poli-ubiquitinação, há a degradação proteolítica pelo proteossoma 26S e, subsequentemente, o transporte da NF- κ B para o núcleo (HADDAD, 2002), permitindo assim a expressão de genes envolvidos com a transcrição de citocinas inflamatórias, dentre estas, o TNF- α , que é central no desenvolvimento da esteatose hepática, através do aumento de proteínas de ligação ao elemento de regulação de esterol (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein* - SREBP), sendo a SREBP-1c a principal forma expressa no fígado (CARTER-KENT; ZEIN; FELDSTEIN, 2008). Essas proteínas são uma família de fatores de transcrição ligados à membrana, que ativam genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lipídios.

Além de estimular a esteatose, o TNF- α induz a produção de outras citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6) e de quimiocinas (moléculas capazes de atrair leucócitos), provoca a geração de EROs (COMPARE et al., 2012), estimula a indução do iNOS nas SECs para catalisar a reação envolvida na produção de NO , e aumenta a expressão de integrinas e outras moléculas de adesão necessárias para a translocação de neutrófilos (KOWALEWSKA et al., 2011; NOLAN, 2010; SZABO et al., 2002). Todos esses processos desempenham um papel no recrutamento de neutrófilos ativados e subsequente dano a hepatócitos e SECs (SZABO et al., 2002).

A endotoxemia além de ativar a imunidade inata, pode contribuir com a resistência à insulina, sendo esta também um mecanismo importante para o desenvolvimento da lesão hepática. Outro fator que pode levar a alterações do metabolismo glicêmico é o estado

hipermetabólico da CUI, desencadeando, dentre outras alterações, a hiperglicemia. Esta condição pode favorecer o EO e, assim, contribuir também para o dano hepático (MOSCHEN; KASER; TILG, 2013).

Dessa forma, torna-se claro o envolvimento do EO e da inflamação como mediadores do dano hepático desencadeado pela CUI.

A tabela 1 descreve as principais citocinas envolvidas na fisiopatogenia da lesão hepática, independente de sua etiologia.

Tabela 1: Citocinas envolvidas na patogênese da lesão hepática

Citocinas	Relação com a lesão hepática
TNF-α	Estimula o recrutamento de neutrófilos e macrófagos; induz macrófagos a produzirem citocinas; induz apoptose e necrose.
IL-6	Estimula a produção de mediadores de respostas inflamatórias e a regeneração hepática.
IL-1	Implicada na proliferação de células estreladas hepáticas, bem como na ativação miofibroblástica dessas células. Regula a expressão de metaloproteinases (que destroem componentes da matriz extracelular), bem como o <i>turnover</i> e a deposição da matriz.
TGF-β	Estimula a produção de proteínas da matriz extracelular e seus receptores
IL-8	Ativa e recruta neutrófilos para o local do dano; induz resposta do perfil imune T helper 1 (Th1), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias.
IL-10	Inibe ativação do NF- κ B e o perfil de citocinas pró-inflamatórias, oriundas de células T helper 1 (Th1), promove a secreção de anticorpos, apresenta efeito protetor na fibrogênese hepática.

Adaptado de Manna e Abdel-Wahhab (2016); Schmidt-Arras e Rose-John (2016)

2.3 Possibilidades terapêuticas da N-acetilcisteína no dano hepático

A doença hepática é considerada um problema social nos países ocidentais e vem aumentando, rapidamente, devido a elevação de diversos fatores de risco. Dada a sua localização central dentro da circulação sistêmica, o fígado desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase energética (ROLO et al., 2012). Portanto, lesões no fígado devem ser rapidamente e eficientemente tratadas. O tratamento atual das doenças hepáticas visa remover os fatores patogênicos, proteger a estrutura e a função hepática, corrigir os danos e os

mecanismos fisiopatológicos e diretamente melhorar os sintomas clínicos. Pesquisadores vêm buscando fármacos hepatoprotetores de baixo custo e mais eficazes para a prevenção e tratamento do dano hepático (HAN et al., 2016; LU et al., 2016).

A administração de antioxidantes tem sido estudada extensivamente como um método para combater doenças associadas ao EO e inflamação (ATKURI et al., 2007). Dentre essas substâncias destaca-se a NAC (SAMUNI et al., 2013), que apresenta resultados positivos tanto em modelos animais (CETINKAYA et al., 2005), quanto em ensaios clínicos (GUIJARRO et al., 2008), tendo sido utilizada no tratamento de diversos distúrbios caracterizados por EO, tais como intoxicação (SAMUNI et al., 2013), lesão cardíaca por isquemia-reperfusão (BAKER et al., 2009), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (SADOWSKA, 2012), bronquite (ATKURI et al., 2007), HIV/AIDS (DROGE et al., 1992), transtornos psiquiátricos (BERK et al., 2013), diabetes (CHEN et al., 2012), dentre outros.

Quimicamente, a NAC é um derivado da cisteína com um grupo acetil ligado a um átomo de nitrogênio, que age como precursor da GSH, por meio do fornecimento de cisteína (ATKURI et al., 2007; SAMUNI et al., 2013). Por ser um tiol (R-SH), pode ser oxidado por vários radicais e também servir como um nucleófilo (doador de pares de elétrons) (SAMUNI et al., 2013). A GSH é fonte de tiol no organismo e um importante antioxidante envolvido em inúmeros processos fisiológicos. Estes incluem a desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, modulação da regulação redox na transdução de sinal, regulação da resposta imunológica, metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, defesa antioxidante, sinalização de neurotransmissores, modulação da proliferação celular, entre outros (SIES, 1999).

Quanto à capacidade de eliminação direta das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), a NAC reage com os radicais altamente oxidantes, tais como o $\text{HO}^\bullet$, $\text{NO}_2^\bullet$ e radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) (SAMUNI et al., 2013). Além disso, é capaz de quelar íons de metais de transição, tais como cobre (Cu^{+2}) e Fe^{+3} e íons de metais pesados, tais como cádmio (Cd^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}) e Chumbo (Pb^{+2}) (KASPERCZYK et al., 2014), principalmente através de sua cadeia lateral tiólica, formando estruturas complexas, as quais são facilmente excretadas do corpo, sendo removidas assim do meio intra e extracelular (SAMUNI et al., 2013). A atividade anti-inflamatória da NAC vem sendo estudada também através do seu efeito inibitório sobre o NF- κ B, que é central na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta ao EO e inflamação (HADDAD, 2002).

Sabendo que a hiperglicemia e a resistência à insulina podem levar ao dano hepático

(KAWAGUCHI et al., 2011), mediante envolvimento do EO e inflamação, estudos vêm demonstrando um efeito protetor da NAC sobre esses dois parâmetros, devido ao seu papel antioxidante e anti-inflamatório (HABER et al., 2003; DINIZ et al., 2006; SOUZA et al., 2008), além de afetar várias vias de sinalização, tais como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-quinase)/proteína quinase B (AKT) e AP-1, que resultam no aumento dos efeitos metabólicos da insulina nas células alvo, bem como na ação mitogênica da insulina nas células β pancreáticas (LASRAM et al., 2015).

A superioridade da NAC em relação a outros antioxidantes, tais como a vitamina C, vitamina E e ácido lipoico (DENEKE, 2000; HALLIWELL, 1996), foi descrita devido a sua eficácia na síntese e reabastecimento de GSH, além de atuar como varredor de radical. A NAC apresenta diversas ações farmacológicas chave, o que a coloca como um importante antioxidante em várias patologias associadas ao EO (SUNITHA et al., 2013). Esses mecanismos, bem como seu metabolismo encontram-se na revisão sistemática escrita pela autora e colaboradores (ANDRADE et al., 2015).

A NAC pode ser administrada oralmente, por via i.v., topicamente ou por inalação. A maioria das condutas terapêuticas adota a administração da NAC por via oral, por questões de conveniência, segurança e menor custo, apesar de existirem situações clínicas que demandem administração intravenosa (ATKURI et al., 2007). Não são reconhecidos efeitos clínicos adversos com a administração oral da NAC, em doses de até 8000 mg/dia (ROSA et al., 2000).

Trabalhos anteriores demonstraram que a NAC fornecida na dieta a longo prazo é bem tolerada em humanos (SERIAL et al., 2003) e que, segundo Johnston et al. (1983), a DL_{50} (dose letal mediana necessária para matar 50% de uma população em teste) é aproximadamente 10g/kg, em roedores. No presente estudo, utilizamos uma dose de 150 mg/kg/dia, devido ao trabalho prévio de Moura et al. (2016), que usou uma dose de 100 mg/kg/dia fornecida na dieta de ratos com colite aguda leve induzida com SSD 2% (m/v), e apresentou atenuação do dano oxidativo e melhora da defesa antioxidante. No entanto, ao se trabalhar com colite grave, a ideia do estudo atual foi aumentar a dose em 50 mg para se observar uma resposta terapêutica deste antioxidante no dano hepático. Além disso, os trabalhos apresentados na revisão sistemática elaborada por Andrade et al. (2015) que usaram a dose de 150 mg/kg/dia em roedores, independente da via de administração e tempo de uso, demonstraram melhora em quase 100% dos marcadores da defesa antioxidante e atenuação dos marcadores de dano oxidativo e inflamatórios nas doenças hepáticas. Devido à limitação de animais cedidos pelo biotério e em face das recomendações do Comitê de Ética da UFAL,

não foi possível realizar estudos com doses alternativas.

Apesar de a NAC apresentar benefícios em estudos experimentais e ensaios clínicos, algumas revisões sistemáticas e metanálises, não necessariamente voltados para o contexto do estresse oxidativo e inflamação, mas em outras condições fisiológicas ou clínicas, incluindo desempenho físico (RHODES; BRAAKHUIS, 2017), colocam em dúvida sua aplicação farmacológica/terapêutica (AITIO et al., 2006; GIUSTARINI et al., 2012; SUNITHA et al., 2013). Assim, novas pesquisas com objetivos e desenhos experimentais bem delineados são de fundamental importância, para se identificar as reais ações terapêuticas da NAC e assim, assegurar a sua prescrição.

Diante do exposto, a hipótese do estudo se baseia na administração subcrônica da NAC, por via oral em camundongos, buscando verificar o controle do estresse oxidativo e da inflamação no fígado dos animais com colite ulcerativa aguda grave induzida por sulfato de sódio dextrana, considerando o caráter recidivante dessa doença inflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Investigar o efeito hepático da administração de N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo e a inflamação causada pela colite ulcerativa grave, em camundongos.

3.2 Específicos:

- Realizar uma revisão sistemática sobre os efeitos da administração da N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo e a inflamação nas lesões hepáticas;
- Verificar a repercussão da administração da N-acetilcisteína sobre a histologia do tecido hepático, em camundongos saudáveis e com colite ulcerativa grave;
- Conferir a consequência da administração da N-acetilcisteína sobre a glicemia em camundongos saudáveis e com colite ulcerativa grave;
- Determinar a influência da administração da N-acetilcisteína sobre o dano oxidativo (MDA, proteínas carboniladas e H_2O_2) e a defesa antioxidante (SOD, CAT, GSH e GSH/GSSG) hepática em camundongos saudáveis e com colite ulcerativa grave;
- Avaliar o efeito da administração da N-acetilcisteína sobre a inflamação (TNF- α e mieloperoxidase) e anti-inflamação (IL-10) hepática em camundongos saudáveis e com colite ulcerativa grave

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e equipamentos

Reagentes

SSD (MW 36,000-40,000 Da) foi adquirido da MP Biomedicals[®]. LiChrolut[®], RP-18 P foi obtido da Merck[®], comprimidos do cocktail de inibidor de protease foram adquiridos da Roche[®]. O tampão RIPA (10X) foi obtido da Cell Signaling[®] e os kits de Citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) foram da PeproTech[®] Brasil, FUNPEC, Ribeirão Preto, SP, BR. Todos os outros produtos químicos, enzimas, albumina de soro bovino (BSA) e a NAC foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, EUA) e utilizados como recebidos.

Equipamentos

Aagitador magnético AP 55, Phoenix; Biofreezer VIP Serie Sanyo; espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific; microscópio óptico Olympus BX51 ligado a um sistema de câmera DP70 Digital, Tóquio, Japão; HPLC acoplado à detecção UV (Shimatzu, Serial n°. L201550).

4.2 Animais de experimentação

Camundongos machos Swiss (n=18), com 8 semanas de idade (média de massa corporal: 31 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL), tiveram seus pesos registrados para acondicionamento, aleatoriamente, em gaiolas conjuntas de polietileno, durante sete dias para adaptação ao Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição da UFAL (24 $\pm$ 1°C; ciclo claro/escuro de 12 h). A fase experimental foi realizada após a aprovação da proposta deste estudo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFAL, sob o número do processo 45/2016. Durante todas as etapas do estudo foram seguidos os cuidados propostos pelo Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (1996) e a quantidade de animais foi baseada no número mínimo necessário para demonstrar, de forma sólida, o efeito do tratamento.

4.3 Desenho experimental

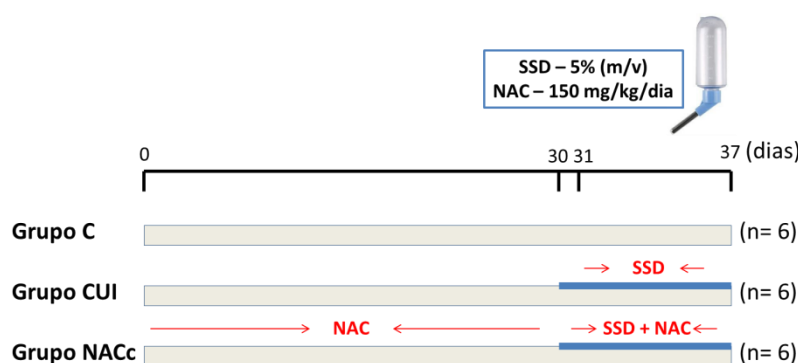
Os camundongos ficaram em gaiolas conjuntas de polietileno, conforme o grupo de tratamento: Controle (C - 6 animais); Colite (CUI - 6 animais) e, animais com colite tratados com NAC (NACc - 6 animais). Após o período de adaptação ao biotério setorial, o protocolo

experimental foi dividido em duas etapas: na 1ª etapa, os animais do grupo NACc receberam 150 mg/kg de peso corporal/dia de NAC na água de beber, durante 30 dias (AMROUCHE-MEKKIOUI; DJERDJOURI, 2012). A 2ª etapa constituiu na indução da colite ulcerativa grave nos animais do grupo CUI e NACc, usando sulfato de sódio dextrana (SSD), na concentração de 5% (m/v) (FAROMBI et al., 2016), na água de beber dos animais do 31º ao 37º dia do experimento, e os camundongos do grupo NACc continuaram recebendo a NAC, totalizando 37 dias de período experimental (Figura 2).

- **Grupo controle (C) (n=6):** Veículo (via oral – água de beber). Sem tratamento com NAC e sem indução de colite ulcerativa grave;
- **Grupo colite (CUI) (n=6):** Veículo (via oral – água de beber). Sem tratamento com NAC e indução de colite ulcerativa grave, usando SSD na concentração de 5% (m/v), via oral – água de beber;
- **Grupo colite recebendo NACc (n=6):** Tratamento com NAC (150 mg/kg de peso corporal/dia, via oral – água de beber) e indução de colite ulcerativa grave, usando sulfato de sódio dextrana (SSD) na concentração de 5% (m/v), na água de beber.

A possibilidade de fornecer a NAC juntamente com o SSD na água de beber dos animais foi baseada no trabalho de Amrouche-Mekkioui e Djerdjouri (2012), que induziram a colite grave com 5% de SSD (m/v), em camundongos, durante 5 dias por três ciclos, com período de remissão (água sem SSD) de 10 dias entre cada ciclo, e objetivaram avaliar o efeito protetor da NAC (150 mg/kg/dia) sobre os marcadores oxidativos nesses animais, sendo fornecida por 45 dias. Segundo esses autores, a interação entre essas duas substâncias, bem como a administração conjunta, não interferiram nos resultados do estudo, a partir de testes preliminares.

Figura 2: Desenho experimental



Fonte: ANDRADE, K. Q.

As soluções de NAC e/ou SSD foram preparadas imediatamente antes da administração. Os animais receberam a dieta Comercial RHOSTER® Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil) (Quadro 1) e tiveram livre acesso a ela e à água durante todo o experimento. A água contendo SSD e/ou NAC foi mudada diariamente. A ingestão e a pesagem dos animais foram avaliadas semanalmente.

Quadro 1: Composição da dieta comercial RHOSTER®

COMPOSIÇÃO	
Total de energia (kcal/kg)	0,003 kcal/kg
Proteína (%)	25,14 kcal%
Carboidratos (%)	61,93 kcal%
Lipídios (%)	12,93 kcal%
Umidade (máx)	10,29%
Proteína Bruta (min)	21,25%
Extrato Etéreo (min)	6,57%
Matéria Mineral (min)	8,35%
Cálcio (máx)	1,23%
Fósforo (min)	1,01%
Sódio	2 g
Lisina	0,82 g
Metionina	0,3 g
Cistina	0,29 g

Fonte: RHOSTER®

4.4 Estimativa da ingestão alimentar

Para o cálculo da ingestão alimentar estimada, o consumo foi medido uma vez por semana, durante todo o período experimental.

O consumo alimentar semanal foi calculado pela diferença de peso entre a dieta ofertada e a sobra desta dieta.

$$\text{Consumo alimentar (g)} = \text{dieta ofertada (g)} - \text{sobra da dieta ofertada (g)}$$

4.5 Determinação do ganho de massa corporal

A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente até o 37^a dia do período experimental. Para o cálculo do ganho de massa corporal semanal foi utilizada a fórmula:

massa semana atual – massa semana anterior, em gramas.

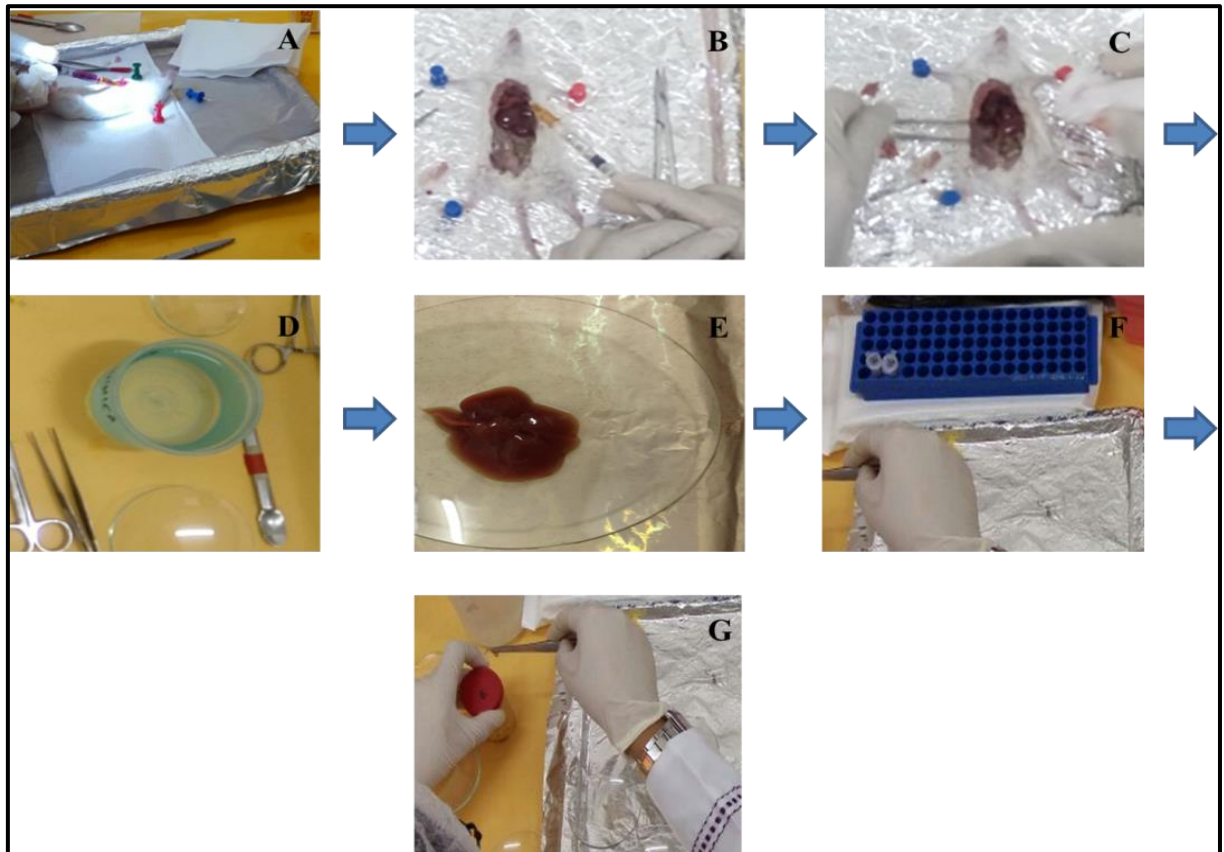
4.6 Determinação da glicemia de jejum

Após o período de jejum de 12 horas, foi obtido o sangue da veia da cauda do camundongo e a glicose foi mensurada, utilizando-se um glicosímetro portátil G-TECH[®] Free, de acordo com as especificações do fabricante. Essa dosagem foi realizada no 1º dia da fase de tratamento com a NAC, no 1º dia da fase de indução à colite e no 37º dia do período experimental, antes da eutanásia dos animais.

4.7 Eutanásia, coleta de órgãos e análises bioquímicas

Ao final do período experimental, no 37º dia, após jejum noturno de 12 horas, os animais foram pesados e anestesiados (tiopental, 40 mg/kg a 2,5% e diazepam, 5 mg/kg, via intraperitoneal no quadrante inferior direito do camundongo) e submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca (Figura 3 A). Após a realização da perfusão ventricular com solução de heparina a 2% (Figura 3 B), houve a retirada do fígado, baço e intestino grosso (Figura 3 C) e, em seguida, os órgãos foram imersos em solução salina 0,9% para retirada de resíduos (Figura 3 D) e, posteriormente, foram pesados para registro de peso absoluto e relativo (peso absoluto do órgão/peso final do animal). O peso do baço é utilizado como marcador de inflamação, sendo retirado do animal para tal objetivo. Os órgãos foram colocados em vidros de relógio (Figura 3 E) previamente tarados e pesados em balança analítica (Shimadzu, Brazil). Posteriormente, o fígado foi subdividido e cada nova fração foi pesada. Essas frações foram acondicionadas, separadamente, em eppendorfs (Figura 3 F) e armazenados em biofreezer a – 80 °C. Cada órgão, exceto o baço, teve um fragmento imerso em solução de Bouin, para fixação e análise histológica posterior (Figura 3 G).

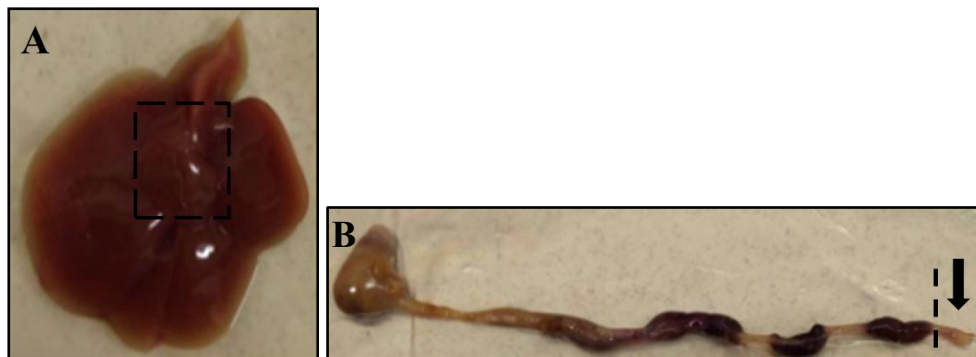
Figura 3: Eutanásia dos animais no trigésimo sétimo dia (37º) do experimento, em que foram anestesiados com tiopental, 40 mg/kg a 2,5% (via i.p.) e diazepam, 5 mg/kg (i.p.), para realização da punção cardíaca (A), seguida de perfusão ventricular (B), retirada dos órgãos (C), imersão em solução salina 0,9% (D), postos em vidros de relógio para pesagem (E), e posterior acondicionamento em eppendorfs (F), com um fragmento separado para imersão em solução de Bouin (G).



Fonte: ANDRADE, K. Q.

A morfologia microscópica do intestino foi realizada com o objetivo de avaliar lesão por SSD. A região do fígado (Figura 4 A) utilizada para a histologia é a comumente afetada pela CUI , enquanto, para a avaliação histológica do intestino grosso, foi retirada a região do reto, sendo a mais comprometida e onde geralmente se inicia o dano (Figura 4 B).

Figura 4: Fragmento do fígado (A) e intestino grosso (B) (seta preta) utilizado para análise histológica.

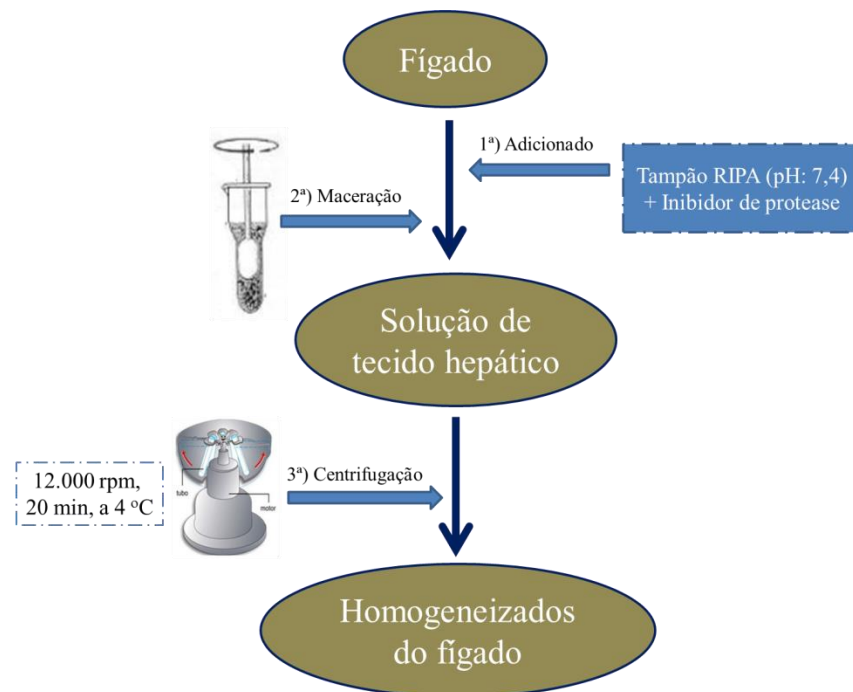


Fonte: ANDRADE, K. Q.

As carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas em bombonas para recolhimento durante a coleta de lixo de material biológico e químico na UFAL. Os resíduos perfuro-cortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário (HUPAA).

Homogeneizados do fígado foram preparados com tampão RIPA (do inglês *Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (pH 7,4) (em um volume de nove vezes a massa do tecido) e cocktail de inibidor de protease (um comprimido para 50 mL de tampão RIPA), visando preservar o tecido da ação de proteases, solubilizar proteínas e manter um ambiente iônico favorável à manutenção das estruturas celulares, e, em seguida, centrifugados a 12.000 rpm, durante 20 min, a 4 °C (Figura 5). As alíquotas (sobrenadantes) foram armazenados a -80 °C, para posteriores análises bioquímicas.

Figura 5: Fluxograma experimental do tratamento dado ao tecido hepático para obtenção do homogeneizado



Fonte: ANDRADE, K. Q.

4.7.1 Análise histológica dos órgãos

Depois de fixados, os fragmentos dos órgãos foram submetidos ao processamento: inclusão em parafina, e posteriormente foram feitos cortes de 5µm e coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE), para proporcionar uma visão geral de todo o tecido, de modo a permitir a identificação dos elementos teciduais e avaliar as alterações das microestruturas dos órgãos. Os cortes foram fotografados em microscópio óptico ligado a um sistema de câmera DP70 Digital e avaliados pela professora de Histologia da UFAL (Profa. Salete Smaniotto/ICBS).

4.7.2 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para a preparação do homogeneizado, foi feita uma diluição de 1:20 do fígado com tampão fosfato (PBS) (50mM, pH 7,4). Em seguida, o preparado foi agitado em vórtex para homogeneizar. Posteriormente, foram pipetados, em duplicata, 20 µL da amostra/ponto da curva (BSA) nos poços da placa (Visível), e foram adicionados 200 µL de reagente de Bradford, aguardando 5 min (protegido da luz). Após, foi feita a leitura a 595 nm (BRADFORD, 1976).

4.7.3 Determinação dos marcadores de dano oxidativo

- Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

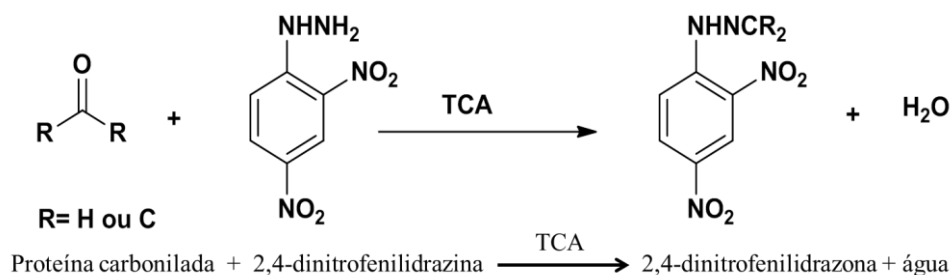
Os níveis de MDA foram medidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa de par iônico, acoplada à detecção por UV a 270 nm, com um protocolo adaptado de Vickie et al. (1990). Os parâmetros para o sistema de HPLC usados foram as seguintes: coluna C18 ultraesfera 150 mm x 4,6 mm e coluna de proteção 45 mm x 4,6 mm, fase móvel composta por acetonitrila HPLC/UV e tampão Trizma (pH 7,4) (1:9). Resumidamente, cerca de 50 mg de tecido hepático foram homogeneizados com 400 µL de tampão Trizma-Base (pH 7,4), 40 µL de solução antioxidante de butil-hidroxitolueno (BHT) e 440 µL de acetonitrila. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 4.000 rpm, por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado através de unidade filtrante com membrana durapore de 0,22 µm de poro, e homogeneizado com auxílio de vórtex. O volume de 20 µL do filtrado foi injetado no HPLC e a leitura realizada a 270 nm. O tempo de retenção é em torno de 2'48''. O MDA foi calculado a partir da curva padrão gerada, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (precursor de MDA) e expresso em nM MDA.mg de tecido⁻¹ e corrigidos para o peso em miligrama (mg) do tecido avaliado, obedecendo o fator de correção, de acordo com a equação:

$$\text{MDA tecidual real} = \frac{\text{MDA encontrado} \times 1000}{\text{Peso do tecido (mg)}}$$

- Determinação dos níveis de proteínas carboniladas

A oxidação da proteína por EROs leva à formação de derivados carbonílicos. Estes podem ser mensurados, baseando-se na reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). O DNPH reage com grupos carbonílicos, em meio ácido (ex: ácido tricloroacético – TCA), gerando a hidrazona correspondente (Esquema 2), a qual pode ser analisada espectrofotometricamente a 370 nm (LEVINE et al., 1994).

Esquema 2: Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)



O homogeneizado hepático foi preparado para se ter 1 mg de proteína presente na solução, tanto no *ependorf* com 100 μL de DNPH 10 mM (2,4-dinitrofenilhidrazina) como no *ependorf* com o 100 μL de HCl 2 M (considerado o branco). Em seguida, foram adicionados à solução, 100 μL de TCA 20%, para precipitação das proteínas, de modo que, ao final do preparo, a solução contivesse 10% de TCA presente no meio. Em seguida, as misturas foram agitadas em vórtex e mantidas em banho de gelo, por 5 min, para então centrifugar, por 5 min, a 3.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso com 100 μL de NaOH a 0,2 M, em vórtex. Após, as misturas foram incubadas por 1 h, agitando-se em vórtex a cada 15 min. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de TCA 20%, seguido de centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. Os péletes formados foram lavados 3 vezes, com 500 μL de etanol/acetato de etila (1:1), centrifugando-se a 12.000 rpm, por 10 min, para então se descartar o sobrenadante. Os péletes foram ressuspenso com 1mL de ureia 8 M, em pH 2,3, centrifugando-se por 10 minutos a 12.000 rpm, para remoção de qualquer material insolúvel. Por fim, 200 μL do sobrenadante foram plaqueados; todas as amostras foram feitas em duplicata, com leitura em comprimento de onda de 370 nm. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expresso por nmol de carbonila por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de carbonilas proteicas:

$$\text{nmol de carbonil/mg de PTn} = \frac{(\text{ABS}) \times 0,2 \times 5 \times 1000}{22 \times 0,67 \times m}$$

ABS = (Absorvância Tubo DNPH - Absorvância Tubo Branco);

Coeficiente de extinção (DNPH) = 22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

0,67 = distância do caminho óptico da placa (cm);

0,2 = volume (mL) usado na leitura da placa;

1000 = conversão em nmol de carbonila;

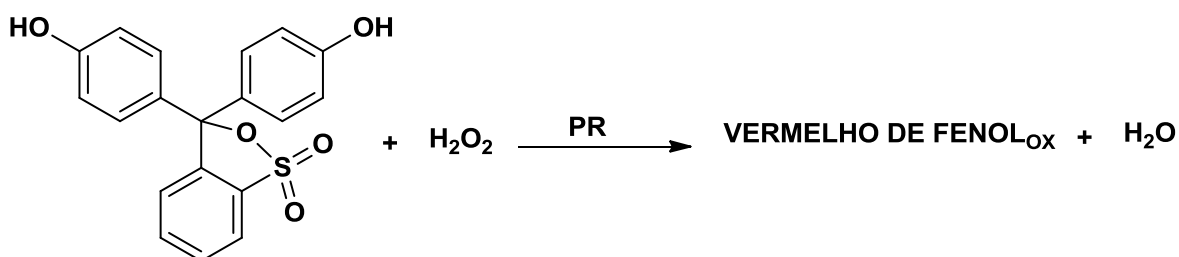
5 = razão do volume de proteína em ureia (1000 μL) e o usado para ler na cubeta (200 μL), ou seja, 1000/200 = 5

mg = miligrama de proteína usada no poço da placa de leitura

- Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 do homogeneizado hepático foi medida pelo método colorimétrico de vermelho de fenol, descrito por Pick e Keisari (1980), com modificações. Este método se baseia na oxidação do vermelho de fenol pelo H_2O_2 mediada pela peroxidase de rabanete (Esquema 3). Resumidamente, 150 μ L do homogeneizado hepático foi adicionado no microtubo contendo 340,9 μ L de tampão de análise (tampão fosfato, NaCl (140 mM) e dextrose (5,5 mM) (pH 7,0). Em seguida, foram adicionados 5 μ L de vermelho de fenol (0,028 M) e 4,25 μ L de peroxidase de rabanete (PR) (1 KU/mL). Os microtubos com a mistura foram incubados a 37°C, por 30 min. Transferiram-se, então, 200 μ L para uma microplaca de leitura contendo 25 μ L de hidróxido de sódio (1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 610 nm (PICK; KEISARI, 1980). A concentração de H_2O_2 foi expressa em nmol.mg de proteína⁻¹, de acordo com a curva de calibração previamente estabelecida.

Esquema 3: Reação entre o peróxido de hidrogênio e o vermelho de fenol



OX= OXIDADO

4.7.4 Determinação dos marcadores de defesa antioxidante

- Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida segundo Paton et al. (2009), como descrito previamente por Aebi (1984). A taxa de redução na absorvância, a 240 nm, foi utilizada como índice de decomposição do H_2O_2 pela CAT. Uma unidade de CAT foi considerada como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 μ mol/min de H_2O_2 , a 37 °C. Foram adicionados 7,5 μ L de homogeneizado hepático (diluído inicialmente, 1:30, com tampão PBS 20 mM, pH 7,0), e 187,5 μ L de tampão PBS (pH 7,0) em cada poço. Posteriormente, foi

realizada a leitura no espectrofotômetro a cada 15 s, durante 5 min, a um comprimento de onda de 240 nm, sendo o resultado considerado o branco. Em seguida, 5 µL de H₂O₂ (1 mol L⁻¹) foram adicionados aos poços da placa, com a leitura realizada a cada 15 s, durante 5 min. Todas as amostras foram plaqueadas em duplicata e os resultados foram expressos em U/mg.

Cálculo para a concentração de catalase:

$$\text{Catalase U/mg de PTn} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (ABS_i - ABS_f)}{(ABS_i) \times \text{mg de PTn}}$$

ABS i = Absorvância inicial;

ABS f = Absorvância final;

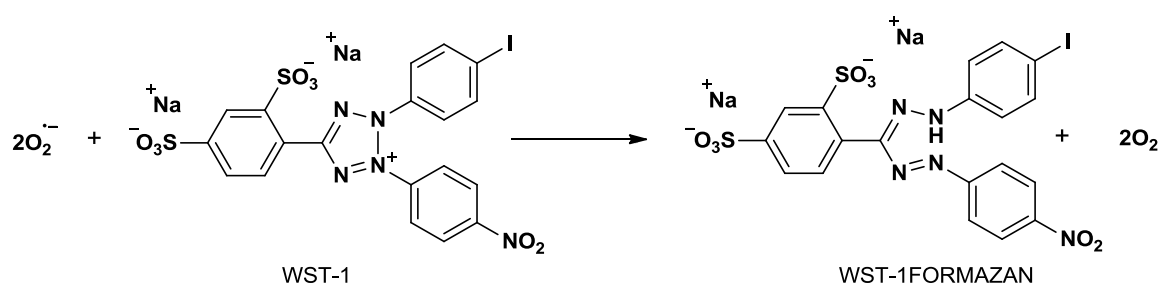
0,67 = fator de correção do método da cubeta em relação à placa, caminho óptico;

mg proteína = quantidade de proteína (em mg) pipetada no poço.

- Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

O homogeneizado hepático foi diluído inicialmente (1:80) com tampão PBS 50 mM, pH 7,4. A atividade da SOD foi avaliada usando um kit disponível comercialmente ([#]19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), baseando-se na inibição em 50% da redução do WST-1 formazan (Esquema 4), sendo esta monitorada em 440 nm, conforme recomendações do fabricante. A atividade da SOD foi expressa como taxa de inibição (%).mg proteína⁻¹.

Esquema 4: Reação entre o ânion radical superóxido e o WST-1



- Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

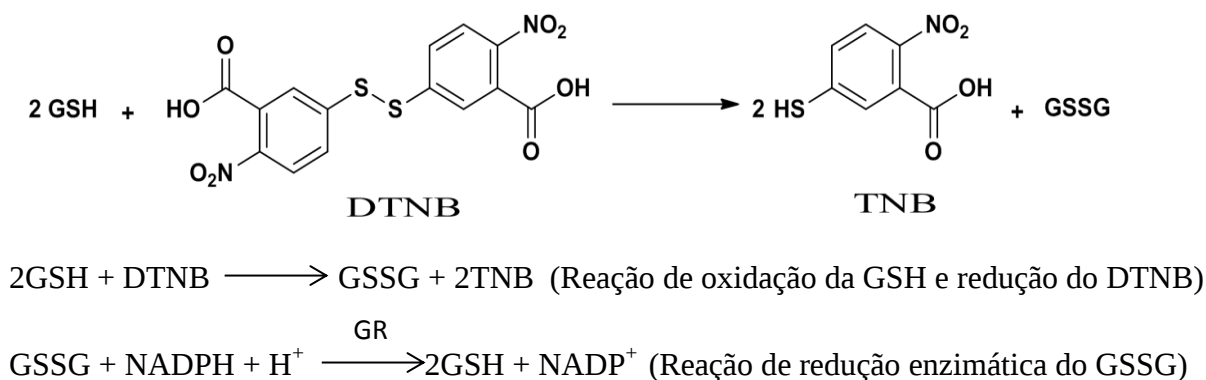
O conteúdo de GSH total e GSSG foi avaliado a partir da técnica descrita por Tipple & Rogers (2012), com algumas modificações. Inicialmente, a proteína total foi precipitada, após centrifugação de 40 µL do homogeneizado hepático com 80 µL de ácido metafosfórico 5% (m/v) e 80 µL tampão de ensaio (PBS 0,1 M + EDTA 5 mM, pH 7,4) na proporção de 1:2,5

(80:80:40) (1.400 rpm por 10 min a 4 °C). Na sequência, a GSH total e a GSSG foram medidas. Para obter GSH total, o sobrenadante do homogeneizado sem proteínas foi diluído (1:5) em tampão de ensaio. Em seguida, 30 µL foram transferidos para a microplaca de leitura. A reação foi então iniciada, adicionando-se 50 µL da mistura de reação 1 (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) – DTNB – 10 mM e GR – 4,2 U.mL⁻¹) e 50 µL da mistura de reação 2 (NADPH 1% m/v).

Para medida da GSSG, 50 µL do homogeneizado hepático desproteinizado foi diluído em 445 µL tampão de ensaio (1:10), contendo 5 µL de N-etilmaleimida (NEM) e centrifugado a 12.000 rpm por 20 min (4 °C). Essa solução foi então incubada em gelo por 50 min, para completa complexação da NEM com a GSH. Para excluir esse complexo (NEM-GSH), evitando assim a inativação da GR a ser adicionada na reação, utilizou-se uma coluna de filtração LiChrolut[®], RP-18 E. Em seguida, 200 µL desse eluente foram transferidos para microplaca de leitura, sendo então adicionados 50 µL da mistura de reação 1 e 50 µL da mistura de reação 2.

Em ambas as análises, a absorvância foi medida em espectrofotômetro, comprimento de onda de 412 nm, em uma cinética de 3 min, com leituras a cada 30 seg. As concentrações foram então obtidas após comparação dos resultados obtidos com curva de calibração padrão com concentrações conhecidas de GSSG (1nM a 10 nM). Para determinação da GSH, utilizou-se o seguinte cálculo (TIPPLE;ROGERS, 2012): $GSH = GSH\ total - (2 \times GSSG)$. Os resultados foram expressos em pmol.mg proteína⁻¹.

Esquema 5: Reação de oxidação da GSH e da redução da GSSG



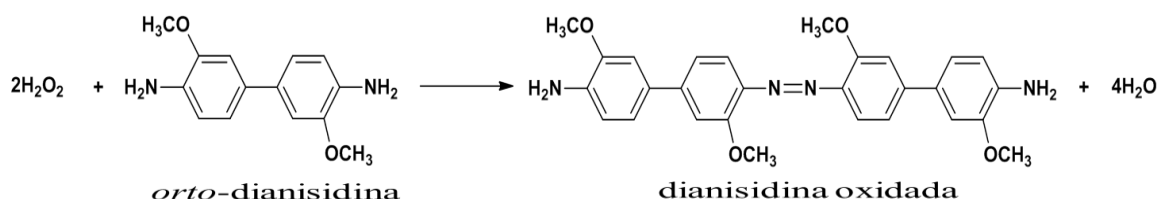
4.7.5 Determinação dos marcadores de inflamação

- Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO, um marcador de invasão de leucócitos para o tecido, foi medida

de acordo com Bradley et al. (1982), com modificações. Resumidamente, 25 mg do tecido hepático foi homogeneizado utilizando tampão de ensaio, pH 6,0 (tampão de fosfato de potássio - 50 mM, 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e EDTA - 5 mM) e centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado novamente a 12.000 rpm, por 15 min (4 °C). Posteriormente, 50 µL do sobrenadante foram transferidos em duplicata para uma microplaca e 50 µL de solução de *orto*-dianisidina foram adicionados (0,68 mg/mL). A microplaca foi incubada a 37 °C durante 15 min e logo em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de H₂O₂ (0,3%). Uma nova incubação foi realizada (37 °C/10 min) e a leitura foi feita a 460 nm. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de H₂O₂ (em µmol) decomposta por minuto. O esquema 6 descreve a decomposição do peróxido de hidrogênio através da reação com a *orto*-dianisidina. Os resultados foram expressos em U.mg de proteína⁻¹ (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

Esquema 6: Reação entre o peróxido de hidrogênio e a *orto*-dianisidina



- Determinação dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10)

O homogeneizado hepático foi diluído inicialmente (1:10) com tampão PBS 50 mM, pH 7,4. Os níveis das citocinas foram dosados por ELISA, com kit da PeproTech[®] (PeproTech Brasil FUNPEC, Ribeirão Preto, SP, BR.), conforme as instruções do fabricante. As citocinas foram quantificadas através da leitura da absorvância a 450 nm, em leitor de placa de ELISA e os resultados foram expressos em pg.mg⁻¹ de proteína.

4.8 Análise estatística

Para todas as variáveis consideradas, a normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis paramétricas foram avaliadas usando a análise unidirecional emparelhado de variância (ANOVA), seguida pelo teste t ou o teste de Tukey/teste de Bonferroni para as comparações entre dois grupos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado

para avaliar as variáveis não-paramétricas e análise post hoc correspondente. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (SEM) para aqueles com distribuição normal e os valores como mediana e intervalo interquartil para os não-paramétricos. Valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado GraphPad® Prism versão 5.0 para Windows (San Diego, CA, EUA) foi utilizado.

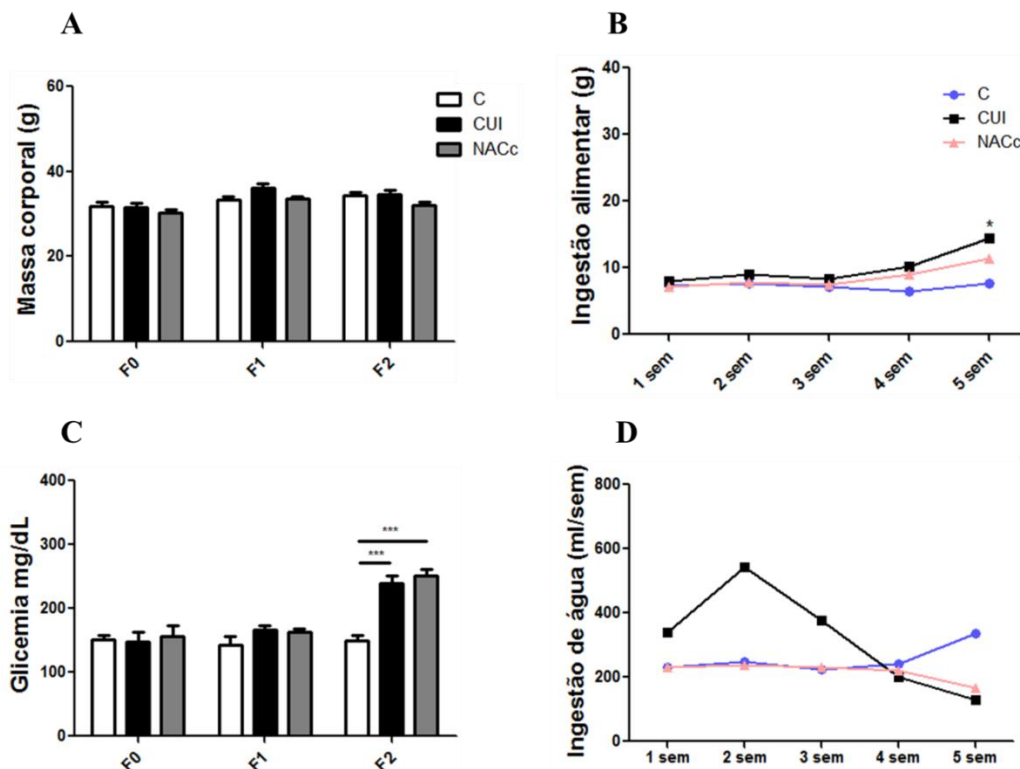
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fígado desempenha um papel importante no metabolismo corporal, atuando na detoxificação e excreção de vários compostos de origem endógena e exógena. Muitos agentes patogênicos podem causar lesões agudas e crônicas, visto que o fígado é o principal órgão atingido por tais agentes e seus metabólitos, levando à inflamação, fibrose, apoptose, necrose, carcinogênese e outras mudanças morfológicas e funcionais. Mesmo diante de diferentes etiologias, a lesão hepática está associada frequentemente ao EO. Nas últimas décadas, a aplicação farmacêutica de compostos com atividade antioxidante e anti-inflamatória tem atraído o interesse de muitos pesquisadores no tratamento do dano hepático, incluindo a utilização da NAC (CAI et al., 2015; LU et al., 2016). Neste trabalho, utilizamos o modelo de colite ulcerativa grave aguda induzida por SSD para averiguar o efeito hepático da administração de NAC, no contexto da inflamação e estresse oxidativo. Foi observada, no presente estudo, semelhança estatística na ingestão de água entre os animais do grupo CUI e NACc (Figura 6 D), não interferindo, assim, na compreensão dos resultados das análises de marcadores de EO e inflamação.

5.1 Estimativa da ingestão de água e efeito da NAC sobre a massa corporal, ingestão alimentar e glicemia

No presente estudo, a indução à colite ulcerativa não alterou a massa corporal dos animais ($p>0,05$), bem como o tratamento com a NAC ($p>0,05$) (Figura 6 A), mesmo com o aumento significativo da ingestão alimentar dos camundongos do grupo CUI em relação ao grupo C, após os 7 dias de indução à colite ($p<0,05$) (Figura 6 B).

Figura 6: Avaliação da ingestão de água, ganho ponderal, ingestão alimentar e glicemia, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)



Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados. F0 = Antes do tratamento com NAC; F1 = Após 30 dias de tratamento com NAC (30 dias); F2 = Após o período de indução a colite ulcerativa grave (7 dias) e fase de tratamento com NAC para o grupo NACc.

Esses resultados sugerem que os animais apresentaram esse comportamento alimentar como uma forma de compensar a diarreia sanguinolenta (dados não mostrados) e a lesão na mucosa intestinal (dados histológicos, Figura 9 D), bem como na região anal (dados não mostrados), permitindo, assim, a manutenção da massa corporal (sem diferença estatística entre os grupos), mesmo diante de sinais não favoráveis à manutenção do estado nutricional.

A DII afeta o trato gastrointestinal e desencadeia sintomas, tais como febre, dor, náusea e diarreia, que resulta na perda do apetite, redução da absorção e ingestão de nutrientes e alteração do metabolismo nutricional, causando, conseqüentemente, comprometimento do estado nutricional (MIJAČ et al., 2010). Durante a fase aguda da colite (5 – 7 dias de indução), no modelo experimental de Okayasu et al. (1990), os camundongos desenvolveram inflamação da mucosa do cólon, perda de massa corporal e diarreia sanguinolenta.

Parmar et al. (2014) ao usarem a mesma concentração (5% m/v) e tempo de uso do SSD (7 dias) em camundongos, não observaram perda da massa corporal dos animais e nem a alteração da ingestão alimentar, mas foi visto perda da consistência das fezes e sangramento retal. Por outro lado, nos estudos de Kwon et al. (2005) (SSD 5% m/v, 7 dias, em camundongos) e Araki et al. (2012) (SSD 5% m/v, 8 dias, em camundongos), foi observada uma redução da massa corporal, condizente com os sinais característicos da colite ulcerativa.

Em camundongos com colite moderada aguda induzida com SSD (3% m/v, via oral), no mesmo período de indução (7 dias), avaliados por Trivedi e Jena et al. (2013), foi observada uma diminuição significativa da massa corporal, quando comparados com o grupo controle saudável. Resultado semelhante foi visto nos trabalhos de Dong et al. (2013) e Masubuchi e Horie (2004), usando a mesma concentração de SSD e tempo de uso, em camundongos e ratos, respectivamente, embora, no estudo de Dong et al. (2013), a ingestão alimentar dos animais não tenha sido alterada.

Já, em Moura et al. (2016), ao induzir a colite aguda leve em ratos, com SSD (2% m/v), durante 5 dias, não foi observada alteração da massa corporal e nem da ingestão alimentar ou glicemia, inclusive nos animais do grupo que recebeu a NAC (100 mg/kg/dia). Ao contrário, no trabalho de Melgar et al. (2005), ao induzir a colite moderada aguda em camundongos no mesmo período, mas com 3% de SSD (m/v), verificou-se a atenuação da massa corporal.

Diante disso, observam-se divergências nos resultados destes estudos no que diz respeito à influência da colite sobre a massa corporal e a ingestão alimentar, independente do tempo de uso do SSD, bem como da concentração fornecida aos animais, demonstrando assim, que a interferência da colite sobre o estado nutricional é individual, e depende, dentre outros fatores, da genética e do sistema imunológico dos animais.

Já em relação à influência da NAC sobre aqueles mesmos parâmetros, foi conferido no trabalho de Lasram et al. (2015), porém não em modelo de colite e sim em ratos tratados com o pesticida malation, que com uma dose de 2 g de NAC/L administrada por via oral na água de beber durante 28 dias, os animais tiveram baixa ingestão alimentar, quando

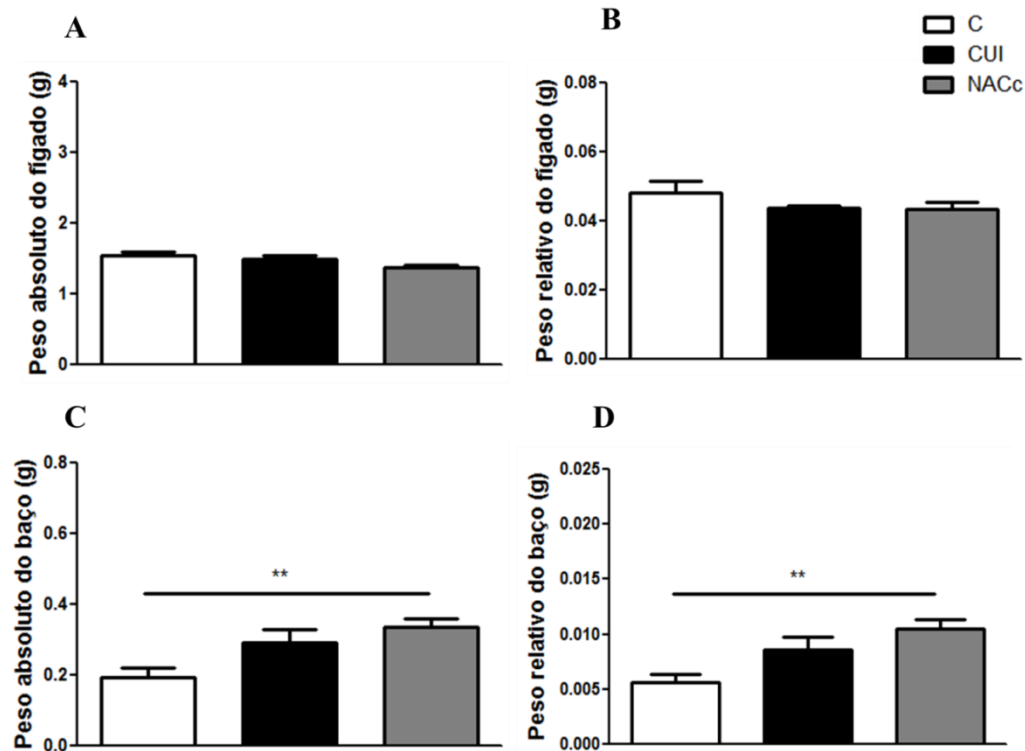
comparados com o controle saudável, e perda da massa corporal em relação aos grupos controle saudável e tratado com malation. Semelhantemente ao estudo anterior, realizado em ratos diabéticos, a NAC (300 mg/kg/dia, via oral, gavagem) administrada por 20 semanas, diminuiu a massa corporal dos animais comparados com o controle saudável, mas se assemelhou ao controle diabético (LEE et al., 2016).

No que diz respeito à influência da colite grave e da NAC sobre a glicemia, foi observado, no presente estudo, que a colite grave elevou a glicemia dos animais do grupo CUI ($p < 0,001$) e o tratamento com a NAC não teve efeito hipoglicemiante (Figura 6 C). Nossos resultados assemelham-se aos reportados por Gonçalves et al. (2012), que avaliou a NAC (50 ou 200 mg/kg), durante 45 dias, em ratos com diabetes induzida com aloxano, não tendo sido observada atividade hipoglicemiante. O mesmo foi encontrado por Wang et al. (2016) em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, em que a administração da NAC (326 mg/L na água de beber) por 3 semanas, não diminuiu a glicemia aumentada pela estreptozotocina. Esses dados demonstram que independente do período e duração da administração da NAC, os resultados dos estudos não atestam sua eficácia hipoglicemiante, divergindo com outros dados da literatura sobre o efeito protetor da NAC na resistência à insulina e hiperglicemia.

5.2 Efeito da NAC sobre os pesos absoluto e relativo do fígado e baço

A colite e o tratamento com a NAC não alteraram os pesos absoluto (Figura 7 A) e relativo (Figura 7 B) do fígado ($p > 0,05$), no entanto foi observado aumento do peso do baço (Figura 7 C e D) nos camundongos do grupo NACc ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo C, sugerindo um aumento da inflamação do órgão. Em estudos de Masubuchi e Horie (2004), ao induzirem a colite moderada com SSD (3% m/v) em camundongos, durante 7 dias, não foi observada alteração do peso absoluto do fígado, se assemelhando com os dados de Moura et al. (2016), que estudaram ratos com colite aguda leve induzida com SSD (2% m/v), durante 5 dias, onde também não foi observada alteração do peso relativo do fígado; a ingestão da NAC (100 mg/kg/dia, via oral, dieta), também verificada pela autora, não interferiu nesses parâmetros.

Figura 7: Pesos absoluto e relativo do baço e fígado, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)



Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para o dado do peso absoluto do fígado; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.

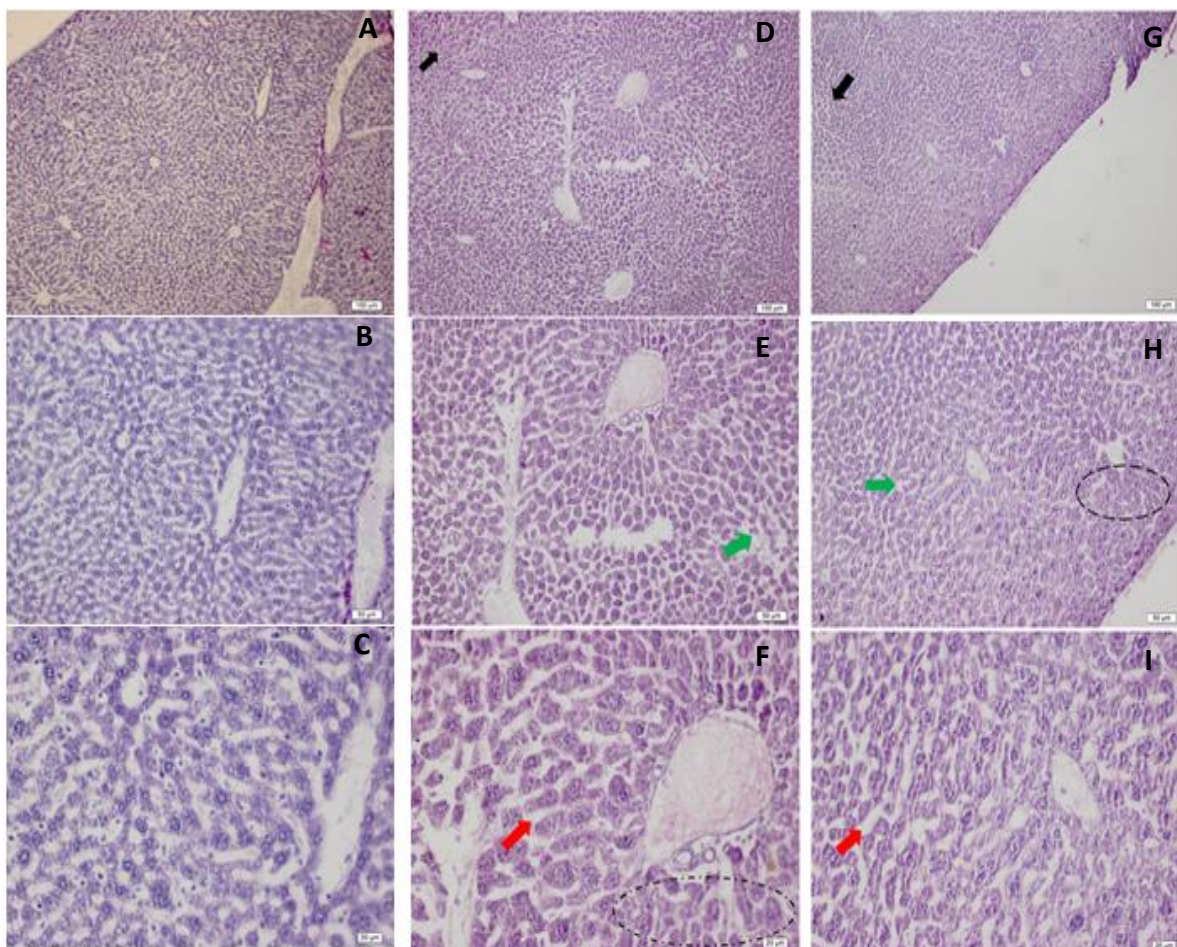
5.3 Observações histológicas no fígado e cólon

Foi observado no fígado dos animais do grupo C, uma microarquitetura epitelial normal com aparência comum da veia central, hepatócitos e sinusoides hepáticos. Verificou-se que os cordões de hepatócitos cuboides, com núcleos arredondados, estavam separados um dos outros por sinusoides, ou seja, no seu aspecto habitual. Por outro lado, nos animais do grupo CUI foi observada desestruturação dos cordões hepáticos (Figura 8 D, seta preta), com perda da arquitetura anastomosada das placas de hepatócitos, demonstrando uma discreta massa celular (Figura 8 E, seta verde) com coloração nuclear pálida e fraca (Figura 8 F, círculo), além de espaçamentos proeminentes entre os cordões hepáticos que delimitam os espaços sinusoides (Figura 8 F, seta vermelha). No entanto, o tratamento com a NAC melhorou tal lesão, demonstrando aspectos morfológicos semelhantes ao grupo CUI (Figura 8 G, H e I).

No trabalho de Trivedi et al. (2013), os camundongos com colite moderada aguda

induzida com SSD (3% m/v), apresentaram, após 7 dias de indução, aumento significativo de infiltração de gordura nos hepatócitos em relação aos animais saudáveis, no entanto não foi observado outra alteração histológica. Este outro fato só foi visto no grupo induzido a colite moderada crônica (3% SSD m/v), durante 7 dias por três ciclos, com período de remissão (sem SSD) de 14 dias entre cada ciclo, apresentando aumento de infiltração de células inflamatórias, além da gordura nos hepatócitos. Em estudo de Farombi et al. (2016), ao induzir a colite aguda grave (SSD 5% m/v), durante 5 dias, em ratos, observou-se extensa infiltração de células inflamatórias e presença de vacúolos citoplasmáticos de pequeno tamanho nos hepatócitos.

Figura 8: Aspectos morfológicos do fígado de camundongos



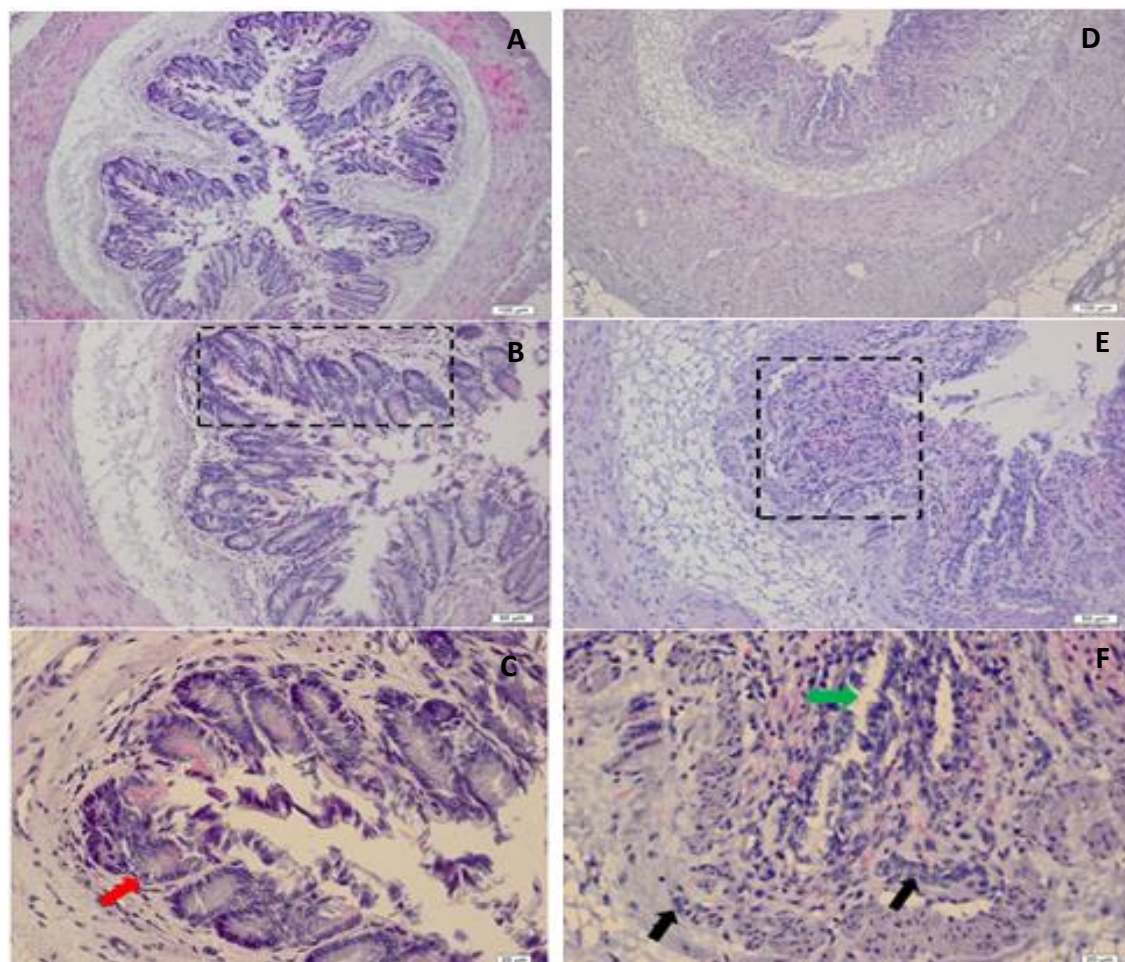
Legenda: Fotomicrografias representativas de secções do fígado de camundongos advindos dos animais do grupo controle (A, B, C); do grupo colite (D, E, F) e do grupo com colite tratados com NAC (G, H, I). As fotomicrografias A, D e G apresentam aumento de 10x, as fotomicrografias B, E e H apresentam aumento de 20x e as fotomicrografias C, F e I apresentam aumento de 40x. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

Fonte: ANDRADE, K. Q.

No intestino grosso, com o objetivo de averiguar lesão no segmento do cólon causado pelo SSD, foi verificado que os camundongos do grupo C apresentaram estrutura intestinal normal, isto é, apresentaram as camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 9 A). Foi observado um epitélio glandular criptal adequado, de formato simples cilíndrico (Figura 9 B, retângulo) e presença de células caliciformes (Figura 9 C, seta vermelha). Ainda, observou-se as criptas de Lieberkuhn orientadas perpendicularmente em relação ao longo do eixo do cólon. Já, nos animais do grupo CUI, observou-se extensa destruição tecidual da camada mucosa, comprometendo a morfologia da cripta, a organização epitelial, onde foi observado perda das células caliciformes (Figura 9 E, retângulo), presença de úlceras (Figura 9 F, seta

verde), bem como presença grave de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa (Figura 9 F, seta preta).

Figura 9: Aspectos morfológicos do cólon de camundongos



Legenda: Fotomicrografias representativas de seções do cólon de camundongos dos animais do grupo controle (A, B, C) e do grupo colite (D, E, F). As fotomicrografias A e D apresentam aumento de 10x, as fotomicrografias B e E apresentam aumento de 20x e as fotomicrografias C e F apresentam aumento de 40x. Coloração hematoxilina e eosina (HE).

Fonte: ANDRADE, K. Q.

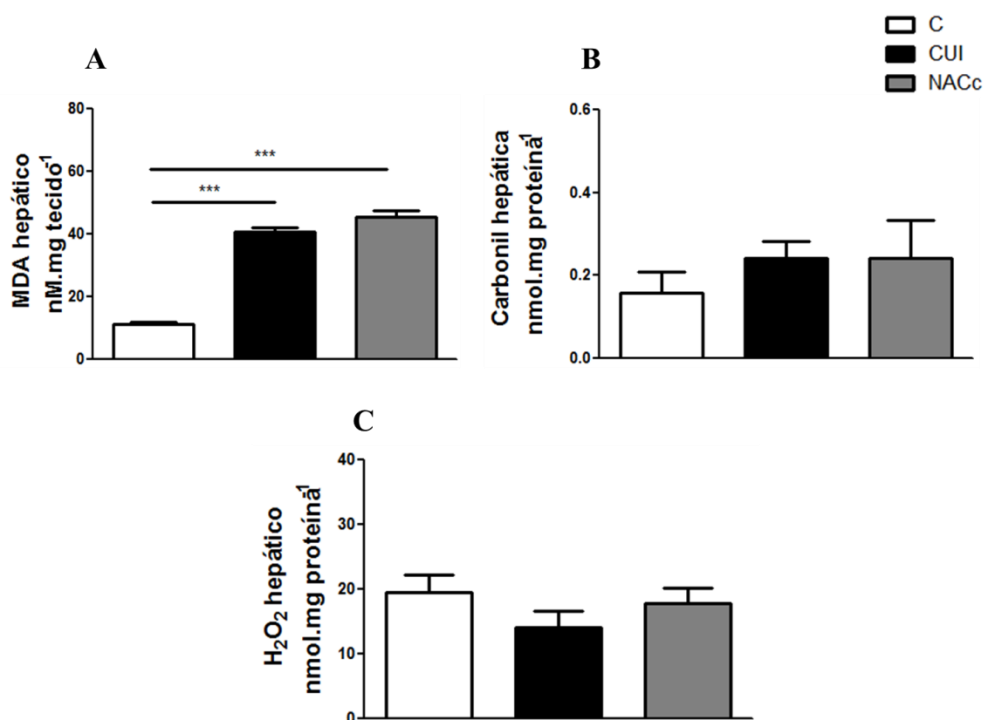
5.4 Efeito da NAC sobre os marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático

A lesão na membrana por peroxidação lipídica também é uma das consequências do EO (KOEK et al., 2011). Nessa avaliação, foi demonstrado que os níveis de MDA nos grupos CUI diferiram significativamente do grupo C ($p < 0,001$) (Figura 10 A), apresentando aumento, sendo, então, o indicador mais sensível do EO hepático nesse modelo. A NAC não foi eficiente em reduzir a peroxidação lipídica ($p > 0,05$ em relação ao CUI) (Figura 10 A).

Além dos agravos do dano oxidativo lipídico, sabe-se que a detecção de grupos carbonila é amplamente utilizada como um indicador de oxidação proteica severa, tanto *in vitro* como *in vivo* (DALLE-DONNE et al., 2006; URSO; CLARKSON, 2003). No presente estudo, foi observado que a colite não elevou significativamente a lesão sobre as proteínas no fígado ($p>0,05$, CUI vs C), bem como a NAC não teve efeito sobre esse marcador ($p>0,05$, NACc vs CUI e C) (Figura 10 B). A modificação oxidativa dos aminoácidos geralmente afeta a atividade funcional da própria proteína, devido à modificação estrutural de aminoácidos. Com isso, pode ativar o sistema imune, induzindo a formação de anticorpos e doenças autoimunes, e ainda causar dano nos receptores, enzimas e na transdução de sinais (COLAK, 2008; POSSAMAI et al., 2005).

Sobre o H_2O_2 , um produto secundário do $O_2^{\cdot -}$ oriundo das NADPH oxidases e subproduto da respiração mitocondrial e de outros processos metabólicos (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008), a colite aguda grave não alterou seus níveis ($p>0,05$, CUI vs C), e o tratamento com a NAC não apresentou efeito ($p>0,05$, NACc vs C e CUI) (Figura 10 C).

Figura 10: Efeito da CUI e da NAC sobre os marcadores de dano oxidativo hepático (A, B, C), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)



Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de peróxido de hidrogênio e, para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.

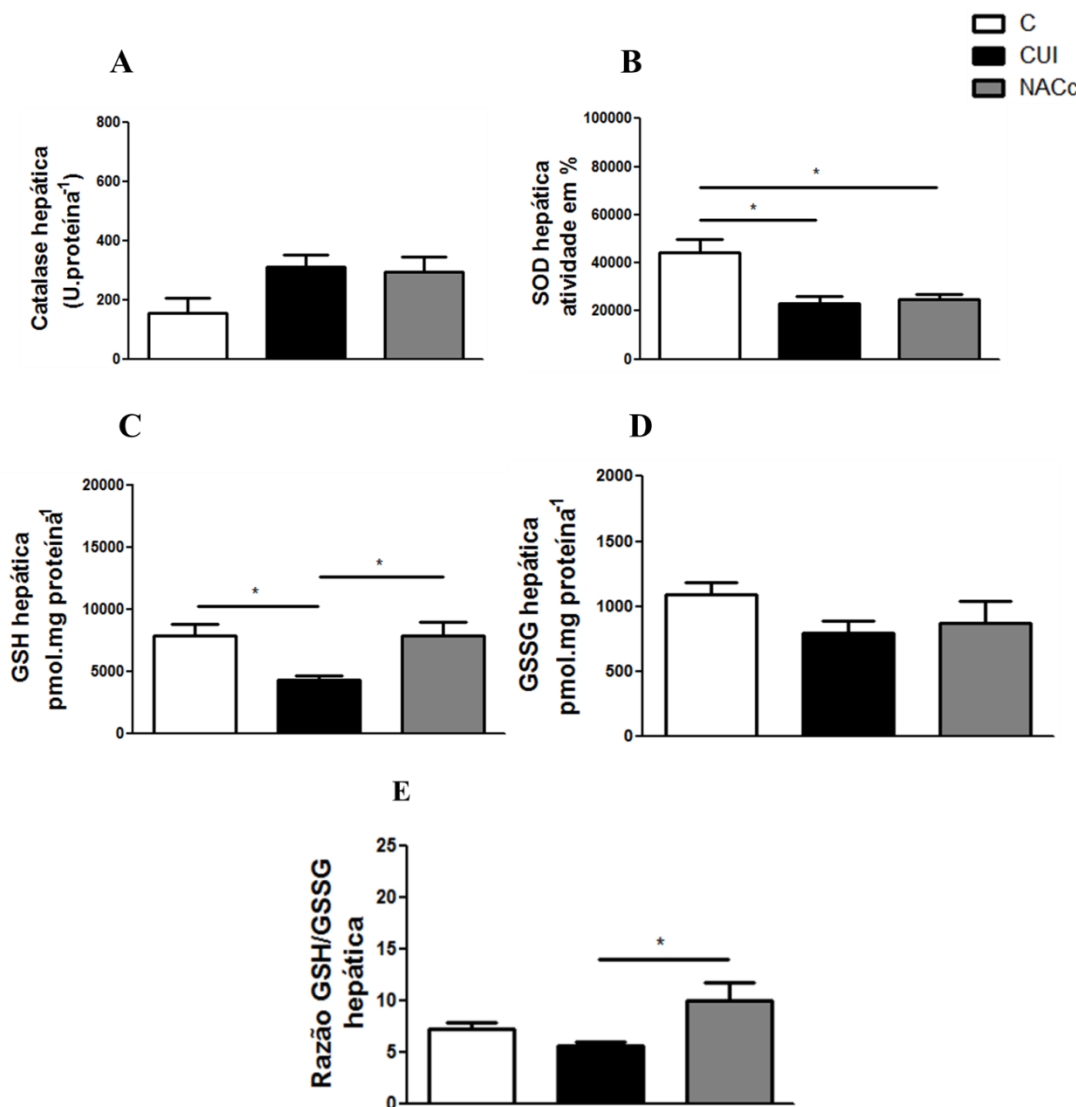
A ordem de preferência do ataque das EROs sobre as macromoléculas, incluindo proteínas e lipídios, é dependente de vários fatores, tais como o sítio de geração da espécie reativa, suas concentrações, a susceptibilidade da biomolécula a ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos (BARREIROS et al., 2006; BERRA et al., 2006). Apesar de a NAC ter a capacidade de eliminar diretamente os radicais livres, as constantes de velocidade na reação com as EROs são menores do que as das enzimas antioxidantes, como a SOD, a CAT e a GPx (JONES et al., 2003). Assim, a eliminação direta dos radicais não se torna tão importante como atividade antioxidante da NAC.

Níveis elevados de MDA refletem o aumento da peroxidação lipídica, tornando-se danoso ao tecido hepático por apresentar atividades genotóxicas e comprometer os mecanismos da defesa antioxidante, sendo considerado o parâmetro mais estudado como um indicador de peroxidação lipídica em várias doenças (ALTINOZ et al., 2015).

Em um modelo animal de fibrose hepática avaliado por Vendemiale et al., (2001), a NAC (8,2 mg/kg/d, via i.m., durante 2 semanas) foi eficaz na atenuação dos níveis de MDA e proteínas carboniladas, semelhantemente ao encontrado por Acharya et al. (2010), porém a NAC (0,78 mg/kg/2 mL dose, via i.p.) foi administrada 30 min antes da indução da lesão hepática por acetaminofeno, e foi avaliado apenas a atenuação dos níveis de MDA por aquele antioxidante. No entanto, em ratos com EHNA que receberam NAC (20 mg/kg/d, via oral) por 6 semanas e 500 mg/kg/d por 4 semanas, via oral, respectivamente, estudados por Thong-Ngam et al. (2007) e Samuhasaneeto et al. (2007), os níveis de MDA estavam aumentados nos animais com EHNA que não foram tratados com NAC e não foram diminuídos, em presença de NAC, apresentando similaridades entre esses dois últimos estudos com os achados do presente trabalho.

Quanto à capacidade antioxidante do fígado, em nosso modelo, não foi observada diferença estatística da atividade da CAT entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 11 A). Por outro lado, observou-se uma redução significativa da atividade da SOD nos grupos CUI e NACc em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 11 B). Pode-se inferir que, nesses animais, a atividade da SOD não tenha sido requerida, visto que a infiltração de neutrófilos foi menor estatisticamente, avaliada pela atividade de MPO hepática, entre os grupos CUI e NACc em relação ao grupo C, ($p < 0,05$, CUI e NACc vs C) (Figura 12 A). Sabe-se que a NADPH oxidase de fagócitos é uma importante fonte de $O_2^{\cdot -}$ para combate às infecções microbianas, e a SOD tem o papel de dismutar esse radical em H_2O_2 e O_2 (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Figura 11: Efeito da CUI e da NAC sobre os marcadores de defesa antioxidante hepático (A, B, C, D), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)



Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados da razão GSH/GSSG e, para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.

Ratos submetidos à lesão hepática por rifampicina, no estudo de Rana et al. (2006), e tratados com NAC (100 mg/kg/d, via i.p.) por três semanas, não apresentaram alterações nas atividades enzimáticas da CAT e SOD quando comparados com os animais doentes. Esses dados entram em acordo com o trabalho de Modi et al. (2006), que não verificou alteração da atividade da CAT em ratos com lesão hepática causada por arsênio recebendo 10 mg de NAC/kg/d, via i.p., durante 3 semanas. Em estudo de Seif el-Din et al. (2011) também não foi observada mudança na atividade da SOD hepática em camundongos com esquistossomose

recebendo 300 mg de NAC/kg em 5 dias da semana/4 semanas. Além disso, nesse trabalho, foi observado aumento significativo da atividade da SOD nos animais com esquistossomose, em comparação com o controle saudável. Esses dados demonstram, assim como o nosso, que independente da dose, via e tempo de administração, a NAC pode não apresentar eficácia ao se analisar a defesa antioxidante enzimática.

Em se tratando da defesa antioxidante não enzimática, foi verificada, em nosso trabalho, uma depleção estatisticamente significativa dos níveis de GSH hepático dos animais do grupo CUI quando comparado com o saudável ($p < 0,05$) (Figura 11 C), demonstrando que a colite causou um desequilíbrio oxidante/antioxidante em favor do oxidante, gerando um dano oxidativo celular. Quando a NAC foi fornecida aos camundongos do grupo NACc, houve aumento dos níveis de GSH, semelhante ao apresentado pelo grupo C ($p < 0,05$, CUI vs NACc; C vs CUI) (Figura 11 C). Adicionalmente, a NAC elevou a razão GSH/GSSG dos grupos tratados em comparação com o grupo CUI ($p < 0,05$) (Figura 11 E).

A maioria dos efeitos benéficos da NAC se deve ao fato de ser uma fonte de tiol, sendo transportada para os hepatócitos e convertida em cisteína necessária para a síntese de GSH (CAI et al., 2015). No presente estudo, o aumento de GSH pela NAC (Figura 11 C) não foi suficiente para evitar a peroxidação lipídica, avaliada pelos níveis de MDA ($p > 0,05$, CUI vs NACc) (Figura 10 A). Este resultado pode ser devido ao fato que o dano oxidativo lipídico é desencadeado também por ERNs, sendo estas moléculas não minimizadas pela ação da GSH.

Diniz et al. (2006), ao avaliar o dano hepático induzido por dieta rica em sacarose, em ratos, observaram que a administração oral de 2 mg de NAC/L/dia na água de beber, por 30 dias, aumentou os níveis hepáticos de GSH, bem como da razão GSH/GSSG, aumentando assim a capacidade redutora do tecido hepático. Esses resultados se assemelham ao encontrado pelo presente estudo.

Os órgãos mais importantes que asseguram a permanência da GSH circulante são o fígado e o rim, e sua depleção nos hepatócitos pode colocar em risco o sistema de defesa antioxidante hepático. A GSH, ao reagir com um composto oxidante, é convertida em GSSG, sua forma oxidada, sendo, posteriormente, regenerada à sua forma reduzida pela ação da enzima GR. No presente trabalho, não foi observada alteração em níveis de GSSG entre os grupos (Figura 11 D).

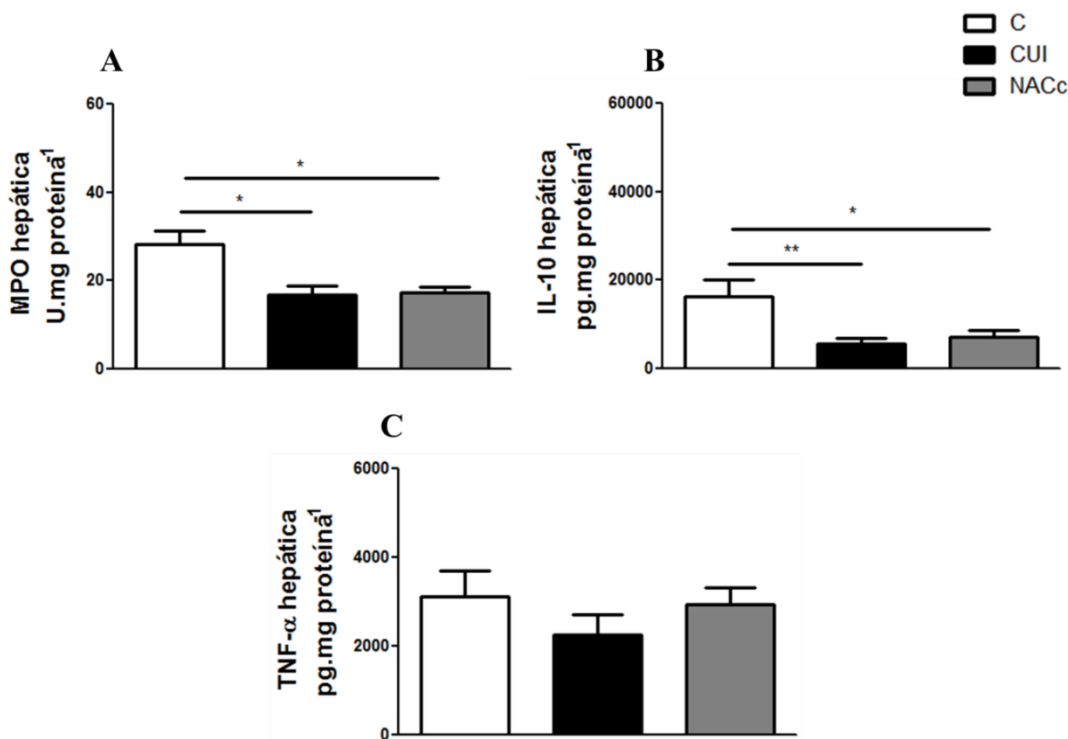
Em estudo de Terneus et al. (2008), ao induzir a lesão hepática em camundongos por acetaminofeno, os resultados mostraram diminuição dos níveis de GSH, bem como de GSSG nos animais doentes, quando comparados com os saudáveis. Com a administração da NAC

(204 mg/kg i.p.) uma hora após a indução com acetaminofeno, esses níveis aumentaram significativamente em relação ao grupo doente. Esses resultados se assemelham ao encontrado por Acharya et al. (2010), porém a NAC (0,78 mg/kg/2 mL dose) foi administrada 30 min antes da indução por acetaminofeno em ratos, provocando aumento de glutathione, tanto na forma reduzida, quanto na forma oxidada. Estes fatos demonstram que a NAC independente do tempo de administração, nessa situação, apresenta o mesmo efeito, enquanto que no nosso estudo, não foi observada diferença estatística nos níveis de GSSG entre os grupos.

5.5 Efeito da NAC sobre os marcadores de inflamação no tecido hepático

A MPO é uma enzima fundamental para o funcionamento normal dos neutrófilos, e quando estas células são estimuladas, ela é liberada, atuando na produção de oxidantes, sendo por isso, considerada uma fonte de EROs (TAKHTFOOLADI et al., 2014). Por esse motivo, essa enzima é reportada como um marcador tecidual de infiltração de granulócitos. No presente estudo, foi observada diminuição da atividade da MPO hepática nos grupos CUI e NACc, quando comparados com os animais saudáveis ($p < 0,05$) (Figura 12 A). Em relação às citocinas avaliadas, a IL-10 apresenta ação imunossupressora chave da imunidade inata, atuando como anti-inflamatória através, dentre outras ações, na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (CIANCIARULLO et al., 2008). Foi observada, no presente estudo, que assim como a MPO, os níveis de IL-10 estavam baixos nos grupos CUI e NACc ($p < 0,05$) (Figura 12 C). Quanto aos níveis de TNF- α , principal citocina pró-inflamatória que medeia a inflamação aguda, a colite induzida e o tratamento com a NAC não tiveram efeito sobre esse marcador ($p > 0,05$) (Figura 12 C).

Figura 12: Efeito da CUI e NACc sobre os marcadores de inflamação, segundo o grupo experimental, Controle (C), Colite (CUI) (colite grave induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD), Animais com colite tratados com NAC (NACc)



Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de MPO; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.

Diante desses resultados, não foi observada inflamação nos grupos CUI e NAC, bem como a NAC não teve efeito sobre qualquer dos parâmetros inflamatórios avaliados. Embora esses resultados não tenham sido bem compreendidos, há uma hipótese para explicar essa ocorrência: o tempo de exposição dos animais ao SSD não foi suficiente para provocar a inflamação no fígado, nesses animais. No trabalho de Trivedi et al. (2013), camundongos com colite moderada aguda induzida por SSD (3% m/v), durante 7 dias, não foi observada elevação significativa de MPO e TNF- α , em comparação com os animais saudáveis. Esta elevação só foi observada, nos camundongos induzidos à colite moderada crônica (SSD 3% m/v, durante 7 dias, por três ciclos, com período de remissão de 14 dias entre cada ciclo).

No entanto, apesar da discussão acima, a análise de mais marcadores inflamatórios, sejam bioquímicos e/ou histológicos com métodos de coloração mais específicos para avaliação da infiltração e diferenciação de leucócitos, são necessários para obter uma conclusão mais exata a respeito da presença ou ausência da inflamação hepática na colite aguda grave induzida.

Já é bem evidenciado que o EO além de ocasionar alterações na estrutura e

funcionalidade das células, pode ainda induzir respostas imunes (RIBEIRO et al., 2008). O MDA pode contribuir para a inflamação através da ativação do NF- κ B, a qual regula a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, incluindo TNF- α , a ICAM-1 e a IL-8, uma quimiocina pró-inflamatória que ativa e recruta neutrófilos para o local da infecção (DAY; JAMES, 1998; ROLO et al., 2012). Diante disso, infere-se que o aumento dos níveis de MDA, no presente estudo, observados no grupo CUI em relação ao grupo C (Figura 10 A), não foi suficiente para estimular a cascata inflamatória hepática (Figuras 13 A e C).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi observado que a colite ulcerativa induzida com SSD (5% m/v), por 7 dias, gerou dano hepático demonstrado pela morfologia microscópica e pelos altos níveis de MDA no tecido hepático. Diferentemente ao encontrado em alguns pacientes com colite, bem como em alguns estudos experimentais descritos em nosso trabalho, a indução à colite não alterou a massa corporal dos animais, no entanto houve aumento da ingestão alimentar e foi observado elevação dos níveis glicêmicos desses animais. O tratamento com a NAC não afetou nenhum desses parâmetros, embora, tenha ocorrido o aumento do peso absoluto e relativo do baço, indicando inflamação nesse órgão. Em se tratando da defesa antioxidante hepática, a NAC aumentou os níveis de GSH e a razão GSH/GSSG, em concordância com os dados na literatura, embora o tratamento não tenha sido suficiente para diminuir o dano oxidativo lipídico e a alteração morfológica do fígado.

Estes achados sugerem que a administração subcrônica da NAC, em camundongos, não foi suficiente para reverter o impacto negativo da colite sobre o fígado, na abrangência do estresse oxidativo.

Os resultados do presente estudo estimulam a realização de pesquisas futuras que utilizem diferentes dosagens e período de administração da NAC numa situação de colite aguda grave, bem como de colite grave crônica, na perspectiva de uma resposta terapêutica positiva, no contexto da inflamação e estresse oxidativo hepático. Com isso, espera-se que estes dados reunidos possibilite encontrar, finalmente, a melhor dose, via, período e tempo de administração da NAC, para pacientes com dano hepático decorrente da colite ulcerativa.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M.; LAU-CAM, C. A. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. **J Biomed Sci**, v, 35, p. 1-11, 2010.
- AEBI, H.P. Catalase in vitro. *Method Enzymol. Academic. Pres.*, n. 105, p. 121-126, 1984.
- AITIO, M-L. N-acetylcysteine – passe-partout or much ado about nothing? **Br J Clin Pharmacol**, v. 61, n. 1, p. 5-15, 2005.
- ALTINOZ, E.; TURKOZ, Y.; VARDI, N. The protective effect of N-acetylcysteine against acrylamide toxicity in liver and small and large intestine tissues. **Bratisl Lek Listy**, v. 116, n. 4, p. 252 – 258, 2015.
- AMROUCHE-MEKKIOUI, I.; DJERDJOURI, B. N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 691, n. 1-3, p. 209-17, Sep 15 2012.
- ANDRADE, K. Q. et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. **Int J Mol Sci.**, v. 16, p. 30269–30308, 2015.
- ARRANZ, L. et al. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 9, p. 1252-62, Nov 1 2008.
- ARAKI, Y. et al. Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis. **Oncol Rep**, v. 28, p. 1597-1605, 2012.
- ATKURI, K. R. et al. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 4, p. 355-9, Aug 2007.
- BASKOL, G.; BASKOL, M.; KOCER, D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Chem**, v. 40, n. 11, p.776-780, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, v. 29, p. 113-123. 2006.
- BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **J Hepatol**, v. 51, n. 1, p. 212-23, Jul 2009.
- BAKER, W. L. et al. Use of N-acetylcysteine to reduce post-cardiothoracic surgery complications: a meta-analysis. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 35, n. 3, p. 521-7, Mar 2009.
- BERK, M.; MALHI, G. S.; GRAY, L. J.; DEAN, O. M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, 2013.
- BERRA, C. M. ; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e

processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova**, v. 29, p. 1340-1344. 2006.

BHATTACHARYYA, A. B. et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiol Rev**, v. 94, p. 329–354, 2014.

BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **Eur J Respir Dis Suppl**, v. 111, p. 45–51. 1980

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**; v. 72, p. 248-54, 1976.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BUANNE, P. et al. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. **J Leukocyte Biol**, v. 82, p. 1239–1246, 2007.

BRAUNERSREUTHER, V.; VIVIANI, G. L.; MACH, F.; MONTECUCCO, F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**; v. 18, n. 8, p. 727-735, 2012.

BREITKREUTZ, R.; PITTACK, N.; NEBE, C.T.; SCHUSTER, D.; BRUST, J.; BEICHERT, M.; HACK, V.; DANIEL, V.; EDLER, L.; DROGE, W. Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials, **J Mol Med**, v. 78, p. 55–62, 2000.

BROWN, S. R.; COVIELLO, L. C. Extraintestinal Manifestations Associated with Inflammatory Bowel Disease. **Surg Clin N Am**, v. 95, p. 1245–1259, 2015.

CAI, Z.; LOU, Q.; WANG, F.; LI, E., SUN, J.; FANG, H.; XI, J.; JU, L. N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. **Int J Clin Exp Pathol**; v. 8, n. 7, p. 8655-8662, 2015

CAMBUI, Y. R. S.; NATALI, M. R. M. Doenças inflamatórias intestinais: revisão narrativa da literatura. **Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba**, v. 17, n. 3, p. 116 - 119, 2015

CAMILLERI, M. Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 11, p. 2318-24, Nov 2009.

CARTER-KENT, C.; ZEIN, N. N.; FELDSTEIN, A. E. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 4, p. 1036-42, Apr 2008.

CARTER, M. J. et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. **Gut**, v. 53 5, p. 1-16, Sep 2004.

CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KURUTAS, E. B.; CIRALIK, H.; KANTARCEKEN, B.; BUYUKBESE, M. A. Beneficial Effects of N-acetylcysteine on Acetic Acid Induced Colitis in Rats. **Tohoku J Exp Med**, v. 206, p. 131-139, 2005.

CESARO, C. et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. **Dig Liver Dis**, v. 43, n. 6, p. 431-8, Jun 2011.

CHEN, L. et al., S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. **J Hepatol**, v. 62, n. 1, p. 156-64, 2015.

CHEN, W., ERCAL, N., HUYNH, T., VOLKOV, A., CHUSUEI, C.C. Characterizing N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteineamide (NACA) binding for lead poisoning treatment. **J. ColloidInterface Sci.** v. 371, p. 144–149, 2012.

CHIU, C. J. et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. **Arch Surg** ;v. 101, p. 478 - 483, 1970.

CIANCIARULLO, M. A. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Rev bras crescimento desenvolv hum**, v.18 n. 2, 2008

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, p. 749–762, 2010.

CLAPPER, M. L.; COOPER, H. S.; CHANG, W. C. L. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 9, p. 1450–1459, 2007.

COLAK, E. New markers of oxidative damage to macromolecules. **JMB**, v. 27, n. 1, p. 1-16, 2008.

COMPARE, D. et al. Gut–liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 22, n. 6, p. 471-6, Jun 2012.

COSTA SILVA, D.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações Patofisiológicas entre Estresse Oxidativo e Arteriosclerose. **Quim Nova**, v. 34, n. 2, 300-305, 2011.

DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clin Chem**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two “hits”?. **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842–845, 1998.

DENEKE, S. M. Thiol-based antioxidants. **Curr Top Cell Regul**, v. 36, p. 151 – 180, 2000.

DHOUB, I. E. et al. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sci**, Mar 2 2016.

DINIZ, Y.S. et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 543, p. 151–157, 2006.

DONG, F. et al. Systemic Responses of Mice to Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Ulcerative Colitis Using 1H NMR Spectroscopy. **J Proteome Res**; v. 12, n. 6, p. 2958-66, Jun

2013.

DROGE, W.; ECK, HP; MIHM, S. HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction—a rationale for treatment with N-acetylcysteine. **Immunol Today**, v. 13, p. 211-214, 1992.

FAROMBI, E. O.; ADEDARA, I. A.; AWOYEMI, O. V.; NJOKU, C. R.; MICAH, G. O.; ESOGWA, C. U.; OWUMI, S. E.; OLOPADE, J. O. Dietary protocatechuic acid ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis and hepatotoxicity in rats. **Food Funct.** v. 7, n. 2, p. 913-21, 2016

FELDSTEIN, A. E. Free Fatty Acids Promote Hepatic Lipotoxicity by Stimulating TNF- α Expression via a Lysosomal Pathway. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 185-94, 2004.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984.

FREITAS, A.C.T.; DIANE, T.; PAROLIN, M.B.; CAMPOS, A.C.L.; COELHO, J.C.U. Doença Hepática não-alcoólica: evolução após derivação gastrojejunal em Y-de-Roux pela técnica de Fobi-Capella. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n. 1, p. 49-53, 2007.

FRASINARIU, O. E. et al. Gut-liver axis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: an input for novel therapies. **Dig Liver Dis**, v. 45, n. 7, p. 543-51, Jul 2013.

GARIANI, K.; PHILIPPE, J.; JORNAYVAZ, F. R. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside. **Diabetes Metab**, v. 39, n. 1, p. 16-26, Feb 2013.

GARAIOVÁ, I. et al. The relationship between antioxidant systems and some markers of oxidative stress in persons with Down syndrome. **Biologia, Bratislava**, v. 59, n. 6, p. 787-794, 2004.

GARN, H. et al. Effect of barrier microbes on organ-based inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 6, p. 1465-78, Jun 2013.

GIUSTARINI, D. et al. N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. **Biochem Pharmacol**, v. 84, p. 1522–1533, 2012

GONÇALVES, J. F. Oral administration of N-acetylcysteine improves biochemical parameters in diabetic rats. **Ciência e Natura**, v. 34, n. 1, 2012.

GUIJARRO, L. G.; et al. N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: Randomized, placebo-controlled pilot study. **World J Gastroenterol**; v. 14, n. 18, p. 2851-2857, 2008.

HASSAN, M.Q. et al. Endrin-induced histopathological changes and lipid peroxidation in livers and kidneys of rats, mice, guinea pigs and hamsters. **Toxicol Pathol**, v. 19, n. 2, p. 108-14, 1991.

HALLIWELL, B. G., J. M. C.,. Free Radical in Biology and Medicine. **Oxford University Press: Oxford, 2002**, n. 4, 2007.

HAN, B. et al. Protective effect of a polysaccharide from *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* on acute liver injury in mice. **Int J Biol Macromol**, v. 87, p. 85-91, Jan 26 2016.

HABER, C.A. et al. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, p. 744–753, 2003.

HALLIWELL, B . Antioxidants in human health and disease . **Annu Rev Nutr**, v. 16, p. 33 – 50, 1996.

HAYAKAWA, M.; MIYASHITA, H.; SAKAMOTO, I.; KITAGAWA, M.; TANAKA, H.; YASUDA, H.; KARIN, M.; KIKUGAWA, K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. **EMBO J**, v. 22, n. 13, p. 3356–3366, 2003

HENAO-MEJIA, J. et al. Role of the intestinal microbiome in liver disease. **J Autoimmun**, v. 46, p. 66-73, Oct 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008

JIANG, L. et al. As(2)O(3) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway and activation of caspases. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 2, p. 2190-2196, 2015.

JONES, CM; LAWRENCE, A; WARDMAN, P; BURKITT, MJ. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 1337-1339, 2003.

JOHNSTON, R. E.,HAWKINS, H. C.,WEIKEL, J. H.The toxicity of N-acetylcysteine in laboratory animals. **Semin Oncol**, v. 10, p. 17–24, 1983.

KASPERCZYK, S. et al. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 638-47, Mar 2014.

KAYA, H. et al. The protective effect of N-acetylcysteine against cyclosporine A-induced hepatotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 1, p. 15-20, 2008.

KADIISKA, M.B. et al. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 81, p. 100-6, 2015.

KHAYYAT, A. et al. N-acetylcysteine amide, a promising antidote for acetaminophen toxicity. **Toxicol Lett**, v. 241, p. 133–142, 2016.

KAWAGUCHI, T. et al. Insulin resistance and chronic liver disease. **World J Hepatol**, v. 27, p. 3, n. 5, p. 99-107, 2011.

KIM, Y.S.; SEO, H.W.; JUNG, G. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 457, n. 3, p. 328-33, 2015.

KOPPE, S.W. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 312-22, 2014.

KOPPE, S. W. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 312-22, Oct 2014.

KOWALEWSKA, P. M.; PATRICK, A. L.; FOX-ROBICHAUD, A. E. Innate immunity of the liver microcirculation. **Cell Tissue Res.**, v. 343, p. 85–96, 2011.

KOEK, G.H.; LIEDORP, P.R.; BAST, A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1297–1305, 2011.

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D. B. Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **Am J Gastroenterol**, v. 105, n. 3, p. 501-23, 2010.

KWON, K. H. et al. Interleukin-1b targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 337, p. 647–654, 2005.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LI, J. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on the liver of brain-dead Ba-Ma mini pig. **Transplant Proc**, v. 42, n. 1, p. 195-9, 2010.

LASRAM, M. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. **Life Sci**, v. 107, n. 1-2, p. 50-8, Jun 27 2014.

LU, Y. et al. Protective effect of wedelolactone against CCl4-induced acute liver injury in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 34, p. 44-52, May 2016.

LIN, KT.; XUE, JY.; SUN, FF.; WONG, PYK. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, **Biochem Biophys Res Commun** v. 230, p. 115–119, 1997.

LASRAM, M. M. et al. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. **CLB**, v. 48, p. 1200–1208, 2015.

LU, Y. et al. Protective effect of wedelolactone against CCl4-induced acute liver injury in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 34, p. 44-52, May 2016.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LEPETSOS, P.; PAPAVALASSILIOU, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 4, p. 576-91, Apr 2016.

LEE, E. S. et al. Oleanolic acid and N-acetylcysteine ameliorate diabetic nephropathy through reduction of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in a type 2 diabetic rat model. **Nephrol Dial Transplant**, v. 31, p. 391–400, 2016.

MACHADO, M. V. et al. Vitamin B5 and N-Acetylcysteine in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Preclinical Study in a Dietary Mouse Model. **Dig Dis Sci**, v. 61, n. 1, p. 137-48, Jan 2016.

MANNA, F. A.; ABDEL-WAHAB, K. G. Physiological potential of cytokines and liver damages. **Hepatoma Res**; v. 2, p. 131-43, 2016

MARKLUND, S. L. Pyrogallol autooxidation. Greenwald RA; Handbook of Methods for Oxygen Radical Research CRC Press Boca Raton (FL), p. 243-247, 1985.

MACONI, G. et al. Glucose intolerance and diabetes mellitus in ulcerative colitis: Pathogenetic and therapeutic implications. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 13, p. 3507-3515, April, 2014.

MALIK, T. A. Inflammatory Bowel Disease: Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. **Surg Clin North Am**, v. 95, n. 6, p. 1105-22, v, Dec 2015.

MASUBUCHI, T.; HORIE, Y. Endotoxin-mediated disturbance of hepatic cytochrome P450 function and development of endotoxin tolerance in the rat model of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 4, p. 437–441, 2004.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, p. 1328–1338, 2005.

MEHAL, W.Z. The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, v. 11, p. 637-44, 2013.

MELGAR, S.; SHANAHAN, F. Inflammatory bowel disease-from mechanisms to treatment strategies. **Autoimmunity**, v. 43, n. 7, p. 463-77, Nov 2010.

MIJAČ, D. D. et al. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: Prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. **Eur J Intern Med.**, v. 21, p. 315–319, 2010.

MOURA, F. A. et al. Colonic and Hepatic Modulation by Lipoic Acid and/or N-Acetylcysteine Supplementation in Mild Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate in Rats. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

MOSCHEN, A. R.; KASER, S.; TILG, H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. **Trends Endocrinol Metab**, v. 24, n. 11, p. 537-45, Nov 2013.

MODI, M. et al. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. **J Trace Elem Med Biol**, v. 20, n. 3, p. 197-204, 2006.

MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatol Int**, v. 3, n. 4, p. 526-36, 2009.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in Lipid Research** v. 48, p. 1–26, 2009.

NASIM, CHAWLA, T.; MURTAZA, G. Surgical management of inflammatory bowel disease: A low prevalence, developing country perspective. *J. Pak. Med. Assoc.* ; v. 66, n. 3, p. 247-520, 2016.

NAKAMOTO, N.; KANAI, T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. **Front Immunol**, v. 5, p. 221, 2014.

NEUMAN, M. G.; NANAU, R. M. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. **Transl Res**, v. 160, n. 1, p. 29-44, Jul 2012.

NISHIKAWA, T, et al. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. **Liver International**, v. 29, n. 6, p. 846-856, 2009.

NOLAN, J. P. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1829-1835, 2010.

NOSZAL, B.; VISKY, D.; KRASZNI, M. Population, acid–base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers, **J. Med. Chem.** v. 43, p. 2176–2182, 2000.

OH, S. H.; LIM, S. C. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 3, p. 212–223, 2006.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.

PARASASSI, T. et al. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 10, p. 1285-96, Oct 2005.

PARMAR, A. R.; TRIVEDI, P.P.; JENA, G.B. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to testicular toxicity in mice: Role of inflammation, oxidative stress and DNA damage. **Reprod Toxicol**, v. 49, p. 171–184, 2014.

PENUGONDA, S.; ERCAL, N. Comparative evaluation of N-acetylcysteine (NAC) and N-

acetylcysteine amide (NACA) on glutamate and lead-induced toxicity in CD-1 mice. **Toxicol. Lett.**, v. 201, p. 1-7, 2011.

PEARL, D. S. et al. Cytokine mucosal expression in ulcerative colitis, the relationship between cytokine release and disease activity. **J Crohn Colitis**, v. 7, n. 6, p. 481-9, Jul 2013.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**; v. 38, n. 1505, p. 161-170, 1980.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 16, p. 2371-84, Apr 28 2005.

PAJONK, F. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. **Free Radic Biol Med.**, v. 32, n. 6, p. 536-43, 2002.

PEYRIN-BIROULET, L. et al. Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 348–354, 2016.

QUIGLEY, E. M.; STANTON, C.; MURPHY, E. F. The gut microbiota and the liver. Pathophysiological and clinical implications. **J Hepatol**, v. 58, n. 5, p. 1020-7, May 2013.

RANA, S.V. et al., Role of N-acetylcysteine in rifampicin-induced hepatic injury of young rats. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 2, p. 287-91, 2006

RABKIN, S.W.; KLASSEN, S.S. Nitric oxide differentially regulates the gene expression of caspase genes but not some autophagic genes. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 3, p. 339-47, 2007.

RESELLINI, S.; CHAZOUILLÈRES, O.; FROSSARD, J. L. Hepatic manifestations of inflammatory bowel diseases. **Liver Int.**, p. 1- 15, Sep 2016.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, Dec 1 2010.

RIBEIRO, S. M.R. et al. Antioxidantes da dieta. In: COSTA N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. (Eds.). *Nutrição Básica e Metabolismo*. Viçosa: Editora UFV, 2008. cap.11, p. 382-400.

RHODES, K.; BRAAKHUIS, A. Performance and Side Effects of Supplementation with N-Acetylcysteine: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Med.**, 2017.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 59-69, Jan 1 2012.

ROSA, S.C.; ZARETSKY, M.D.; DUBS, J.G.; ROEDERER, M.; ANDERSON, M.; GREEN, A.; MITRA, D.; WATANABE, N.; NAKAMURA, H.; TJIOE, I.; et al. N-Acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **Eur J Clin Invest**, v. 30, p. 915-929, 2000.

ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology

and therapy. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 1, p. 45-54, 2013.

ROESSNER, A. et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology, research and practice**, v. 204, n. 7, p. 511-24, 2008.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 8, p. 4117-29, Aug 2013.

SADOWSKA, A.M. N-acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease, **Ther Adv Respir Dis** v. 6, p. 127–135, 2012.

SANTOS, J. C. et al. Choline and Cystine Deficient Diets in Animal Models with Hepatocellular Injury: Evaluation of Oxidative Stress and Expression of RAGE, TNF-alpha, and IL-1beta. **Oxid Med Cell Longev**, 2015.

SETSHEDI, M. et al. Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 12, p. 2139-51, 2011.

SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **J Hepatol.**, v. 64, n. 6, p. 1403-15, 2016.

SERRACINO-INGLOTT, F.; HABIB, N.A.; MATHIE, R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. **Am J Surg**, v. 181, n. 2, p. 160-6, 2001.

SENER, G., et al., Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. **Life Sciences**, v. 72, n. 24, p. 2707-2718, 2003.

SHEDLOFSKY, S.I. Role of iron in the natural history and clinical course of hepatitis C disease. **Hepato-gastroenterol**, v. 45, n. 20, p. 349-55, 1998.

SEIF EL-DIN, S. H.; AL-HROOB, A.M.; EBEID; F.A. Schistosoma mansoni: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. **Exp Parasitol**, v. 128, n. 3, p. 230-5, 2011.

SERIL, D. N.; LIAO, J.; YANG, G.Y.; YANG, C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 353–362, 2003.

SHEN, J. et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. **Journal of Hepatology**, 2012.

SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease: a review. **Vasc Pharmacol**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions, **Free Radic Biol Me**, v. 27, p. 916–921, 1999.

- SKRZYDLEWSKA, E.; FARBISZEWSKI, R. Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. **Drug Alcohol Depend**, v. 57, n. 1, p. 61-7, 1999.
- SOURIANARAYANANE, A. et al. Risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease. **J Crohns Colitis**, v. 7, n. 8, p. e279-85, 2013.
- SOUZA, G.A. et al. N-acetylcysteine an Allium plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. **Evid Based Complementary Altern Med**, v. 11, p. 1-7, 2008.
- SOURIANARAYANANE, A. et al. Risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease. **J Crohns Colitis**, v. 7, n. 8, p. e279-85, Sep 2013.
- SUH, J. H. et al. (R)- α -Lipoic acid reverses the age-related loss in GSH redox status in post-mitotic tissues: evidence for increased cysteine requirement for zGSH synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, p. 126-135, 2004.
- SUNITHA, K. et al. N-Acetylcysteine amide: a derivative to fulfill the promises of N-Acetylcysteine. **Free Radic Res**, v. 47, n. 5, p. 357-367, 2013.
- SUNG, M. K.; PARK, M. Y. Nutritional modulators of ulcerative colitis: clinical efficacies and mechanistic view. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 7, p. 994-1004, Feb 21 2013.
- SZABO, G.; ROMICS, JR.L; FRENDL, G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. **Clin Liver Dis**, v. 6, p. 1045- 66, 2002.
- TAKHTFOOLADI, M.A., et al., Effects of N-acetylcysteine on liver remote injury after skeletal muscle ischemia reperfusion in rats. **Turk J Gastroenterol**, v. 25, n. 1, p. 43-7, 2014.
- TERNEUS, M.V., et al., Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAME) and N acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 25-34, 2008.
- TIROUVANZIAM, R. et al. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 12, p. 4628-33, Mar 21 2006
- TIPPLE, T. E.; ROGERS, L. K. Methods for the determination of plasma or tissue glutathione levels." **Methods Mol Biol**, v. 889, p. 315-324, 2012.
- TRIVEDI, P. P.; JENA, G. B. Ulcerative colitis-induced hepatic damage in mice: studies on inflammation, fibrosis, oxidative DNA damage and GST-P expression. **Chem Biol Interact**, v. 201, n. 1-3, p. 19-30, Jan 25 2013.
- TSUKADA, Y. et al. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. **Am J Gastroenterol**, v. 97, p. 2820-2828, 2002.
- TUZUNA, A. et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory

bowel disease. **Clinical Biochemistry**, 35, 569–572, 2002.

URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VICKIE L. TATUM CC, CHING K. CHOW. Measurement of Malondialdehyde by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Lipids** ; v. 25, n. 4; p. 226-229, 1990.

VIDELA, L. A.; RODRIGO, R.; ARAYA, J.; PONIACHIK, J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. **TRENDS in Molecular Medicine**, v.12, n.12, 2006.

VONGHIA, L.; MICHELSEN, P.; FRANQUE, S. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. **Int J of Molec Sci**, v. 14, n. 10, p. 19867-90, 2013.

WALSH, D. et al. Pattern recognition receptors--molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 2, p. 91-104, Apr 2013.

WANG, A. L. et al. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. **Hepatol Res**, v. 34, n. 3, p. 199-206, Mar 2006.

WANG, B.; AW, T. Y.; STOKES, K. Y. The protection conferred against ischemia-reperfusion injury in the diabetic brain by N-acetylcysteine is associated with decreased dicarbonyl stress. **Free Radic Biol Med**, v. 96, p. 89-98, 2016.

WIESER, V. et al. Liver complications in inflammatory bowel diseases. **Dig Dis**, v. 31, n. 2, p. 233-8, 2013.

WIEST, R.; LAWSON, M.; GEUKING, M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. **J Hepatol**, v. 60, n. 1, p. 197-209, Jan 2014.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 45, p. 549–561, 2008.

YAMANO, T.; MORITA, S. Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 76, n. 1, p. 69-77, 1992.

ZALTMAN, C. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 992-993, 2007

ZARAGOZA, A.; DIEZ-FERNANDEZ,C.; ALVAREZ, A. M.; ANDRES, D.; CASCALES, M. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defense system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity, *Biochim. Biophys Acta Mol Cell Res*, v. 1496, p. 183–195, 2000.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 1, p. 6-20, 2003.

APÊNDICE

ARTIGO DE REVISÃO

Artigo de revisão publicada no periódico *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 30269-30308, 2015 (Qualis B1, pela Medicina II)

Foi feita uma nova busca na literatura inserindo no mecanismo de filtragem a data em que o artigo foi enviado para a revista *International Journal of Molecular Sciences* e o mês de dezembro do ano de 2016, com o objetivo de atualizar os resultados da Revisão. No artigo de revisão publicado, sessenta e nove trabalhos foram encontrados, entre eles, apenas 1 (1,4%) artigo foi conduzido em humanos, 54 (78,2%) artigos com testes *in vivo* e 14 (20,1%) artigos envolvendo estudos *in vitro*. Após a atualização, a Revisão conta, como resultado setenta e três trabalhos, entre eles, apenas 1 (1,37%) artigo relacionado ao teste realizado em humanos e 58 (79,45%) artigos relacionados a testes *in vivo* e 14 (19,18%) artigos a testes *in vitro*.

Estresse Oxidativo e Inflamação nas Doenças Hepáticas: Possibilidades Terapêuticas da N-acetilcisteína

Kívia Queiroz de Andrade¹, Fabiana Andréa Moura², John Marques dos Santos³, Orlando Roberto Pimentel de Araújo³, Juliana Célia de Farias Santos² e Marília Oliveira Fonseca Goulart^{3,*}

Recebido: 10 de Outubro 2015; Aceito: 4 de Dezembro 2015; Publicado: 2015
Editor Acadêmico: Guido Haenen

¹ Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Avenida Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil; kiviaqueiroz@hotmail.com (K.Q.A.)

² Faculdade de Nutrição (FANUT/UFAL), Campus A. C. Simões, Avenida Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil; jcfs_nut@yahoo.com.br; fabianamoura_al@hotmail.com (F.A.M.)

³ Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Avenida Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, 57072-970 Maceió, AL, Brazil; john-sk8@hotmail.com (J.M.S.); orlando_rpa@hotmail.com (O.R.P.A.)

* Correspondência: mariliaofg@gmail.com; Tel.: +55-82-98818-0463

Resumo: A doença hepática é altamente prevalente no mundo. O estresse oxidativo (EO) e a inflamação são os eventos patogênicos mais importantes nas doenças hepáticas, independentemente da etiologia e curso natural. A N-acetil-L-cisteína (a forma ativa) (NAC) está sendo estudada em doenças caracterizadas por aumento do EO ou diminuição do nível de glutathiona (GSH). A NAC atua principalmente no fornecimento de cisteína para a síntese de GSH. O objetivo desta revisão foi examinar estudos experimentais e clínicos que avaliem o papel antioxidante e anti-inflamatório da NAC na atenuação de marcadores de inflamação

e EO em danos hepáticos. Os resultados relacionados à suplementação de NAC em qualquer forma de administração e tipo de estudo são satisfatórios em 86,30% (n=63) dos casos avaliados (n=73, 100%). Dentro desta percentagem, a dosagem de NAC utilizada em estudos *in vivo* variou de 0,204 a 2 g/kg/dia. É necessário um desenho experimental padrão de proteção e tratamento, bem como a escolha da via de administração, com uma avaliação mais ampla de EO e marcadores de inflamação no soro ou em outras matrizes biológicas, em modelos animais. Estudos clínicos são urgentemente necessários, para ter uma visão clara, para que os profissionais possam ter certeza sobre a eficácia e segurança da prescrição da NAC, no que se refere ao seu papel no mecanismo de inflamação e estresse oxidativo na fisiopatologia do dano hepático.

Palavras-chave: N-acetilcisteína; fígado; lesão hepática; antioxidante; anti-inflamatório; biomarcadores

1. Introdução

O fígado tem múltiplas funções e é o principal órgão desintoxicante, atuando na remoção de agentes patogênicos, produtos químicos tóxicos e resíduos metabólicos do organismo, contribuindo também para a função adequada de outros órgãos. Ele afeta fortemente quase todos os sistemas fisiológicos para manter a homeostase (CHATTERJEE; MITRA, 2015; INVERNIZZI, 2013; RASCHZOK et al., 2015). A exposição contínua do fígado a alguns fatores, como vírus, álcool, gordura, metabólitos biotransformados, entre outros, pode causar lesão hepática, com risco para inflamação e degeneração hepática. Quando a lesão é mantida por muito tempo, pode causar doenças hepáticas crônicas (CLDs), que ocorrem em processos de multietapas de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (CHATTERJEE; MITRA, 2015). A doença hepática tem uma alta prevalência no mundo. Em alguns pacientes, podem ocorrer complicações, incluindo hipertensão hepatopulmonar, síndromes hepatorrenais e hepatopulmonares (LEUNG; YOUNG, 2015).

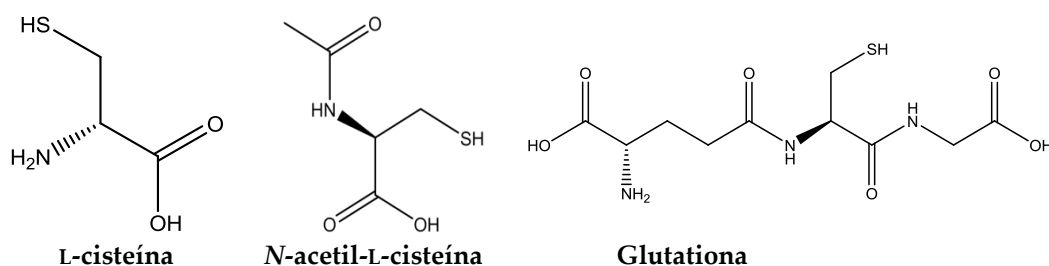
A fibrose hepática é um processo de cicatrização de feridas que é reversível e resulta de lesões hepáticas crônicas, incluindo aquelas causadas pelo consumo de álcool, hepatite viral crônica, doenças autoimunes, parasitas, doenças metabólicas, lipopolissacarídeo (LPS) (MEHAL, 2013) e outras toxinas ou drogas (CHEN et al., 2015; DUVAL et al., 2014). Nestes casos, geralmente, a inflamação é a primeira fase, e desenvolve a fibrose após o estresse oxidativo (EO) crônico (DIESEN; KUO, 2011). Quando a fibrose não é controlada, pode evoluir para cirrose e depois para CHC (DUVAL et al., 2014; SANTOS et al., 2013). A doença hepática alcoólica (DHA), a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e a hepatite viral crônica (B e C) são as três causas mais comuns da cirrose hepática (DUVAL et al., 2014).

Com a progressão para o estágio crônico, há ativação do sistema imunológico adaptativo e contínua ativação da imunidade inata, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN), *upregulation* da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e recrutamento de linfócitos através do trato portal, veia hepática e sinusoides. Os leucócitos e as células de Kupffer (KCs) produzem grandes quantidades de óxido nítrico (NO^{*}) e citocinas, particularmente o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), potentes citocinas profibrogênicas e moduladores da inflamação, respectivamente (MORMONE et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) liberadas pelas KCs ativam as células estreladas hepáticas (HSCs), levando a um aumento da proliferação e síntese da matriz extracelular (ECM), contribuindo para a fibrose e cirrose (DIESEN; KUO, 2011). O EO associado à inflamação causa necrose focal ou zonal, destruição de hepatócitos e desarranjo da arquitetura hepática (CHATTERJEE; MITRA, 2015).

Os antioxidantes (AO) são compostos naturais ou sintéticos, produzidos *in vivo* ou derivados de dietas, cuja função principal é combater o EO (MUSACCO-SEBIO et al., 2014), podendo assim retardar ou impedir a oxidação de substratos, tais como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), lípidos, diminuindo o EO, mutações do DNA, transformações malignas, bem como outros parâmetros de danos celulares (PISOSCHI; POP, 2015). Devido ao papel dos hepatócitos no metabolismo de fármacos, xenobióticos e compostos endógenos, essas células tornam-se alvo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), gerando também metabólitos reativos oxigenados (MRO), exigindo, portanto, um importante sistema de defesa antioxidante (CHEN et al., 2010). Entre estes sistemas antioxidantes, destaca-se a glutathiona reduzida (GSH) (Figura 1), considerada o tiol de baixa massa molecular mais abundante a nível celular, que exibe numerosas e versáteis funções e, portanto, protege as células contra a toxicidade (CHEN et al., 2013).

Figura 2: Estruturas químicas da L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutathiona.



Fonte: ANDRADE, K. Q.

Vários estudos sobre doenças hepáticas indicam que uma superprodução de ERONs e/ou redução de GSH hepática são perfis comuns nestas doenças, independentemente da sua etiologia (OKANOUE; MITSUYOSHI, 2006).

A N-acetil-L-cisteína (NAC) (Figura 1) é conhecida como um antioxidante que atua diretamente e/ou por aumento da GSH intracelular, especialmente no tecido hepático (RIBEIRO et al., 2011). A NAC tem um estado tiol redox ótimo, que é de grande importância para otimizar a capacidade de proteção da célula para conter o EO e a inflamação (KERKSICK; WILLOUGHBY, 2005). A administração da NAC foi descrita como sendo benéfica em outras condições clínicas crônicas, tais como a doença inflamatória intestinal (MOURA et al., 2015), doença pulmonar obstrutiva crônica e outras doenças pulmonares, esclerose sistêmica, fibrose cística, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), choque séptico, diabetes, entre outras (LI et al., 2010).

Diante disso, como o fígado é um órgão suscetível ao dano oxidativo e inflamação e considerando a importância da NAC como um antioxidante em várias condições onde EO e inflamação estão envolvidas, o objetivo desta revisão foi examinar estudos experimentais e clínicos que avaliaram o papel antioxidante e anti-inflamatório da NAC, na atenuação dos respectivos marcadores de inflamação e EO no dano hepático. Vários resultados positivos foram relatados para o uso da NAC, principalmente em relação a modelos animais. No entanto, um desenho experimental padrão de proteção e de tratamento e o aumento de estudos em humanos são necessários para que os profissionais possam ter certeza sobre a eficácia e a segurança da prescrição da NAC.

2. Métodos

Realizamos uma revisão sistemática de artigos publicados no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Periódicos CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>) e Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), usando as seguintes palavras-chave: *N*-acetilcisteína/*N*-acetil cisteína; fígado; dano hepático ou lesão hepática, agrupados de várias maneiras para otimizar a busca.

Foram também utilizadas referências citadas em publicações encontradas. Artigos em que a suplementação/administração da NAC foi utilizada sozinha por via oral (gavagem, dietas ou líquidos); via intramuscular (i.m.); intraperitoneal (i.p.); subcutânea (s.c.) e intravascular (i.v.), em estudos *in vivo* (ratos ou camundongos, para minimizar as diferenças entre as espécies), *in vitro* (hepatócitos de ratos, camundongos e humanos) e em seres humanos que avaliaram o papel protetor e/ou o tratamento na lesão hepática por atenuação dos marcadores de EO e de inflamação (Tabela 1) em amostras de tecido e plasma, foram os escolhidos. Para minimizar os erros, a pesquisa foi conduzida por dois pesquisadores, independentemente. Os desacordos sobre os fatores de inclusão/exclusão do estudo foram resolvidos através do consenso.

Inicialmente, os títulos dos artigos foram lidos para seleção inicial e exclusão de artigos duplicados. Posteriormente, foram lidos os resumos e, em seguida, os artigos que não se enquadravam nos critérios de inclusão ou não esclareceram o modelo de pré-tratamento ou tratamento utilizando a NAC e sua forma e via de administração, foram excluídos. Não contatamos os investigadores e não tentamos identificar dados não publicados. Os artigos foram agrupados nas seguintes categorias: doenças, drogas, álcool, pesticidas, radiação ionizante e outros.

3. Resultados

Setenta e três artigos foram encontrados, entre eles, apenas 1 (1,37%) artigo relacionado ao teste realizado em humanos, 58 (79,45%) artigos relacionados a testes *in vivo* e 14 (19,18%) artigos a testes *in vitro* (Tabela 2). Em comum, esses trabalhos mostraram estresse oxidativo e inflamação envolvidos na patogênese do dano hepático. Os resultados relacionados à suplementação de NAC apresentando papel antioxidante e anti-inflamatório em qualquer forma de administração e tipo de estudo são satisfatórios em 86,30% (n=63),

considerando-se alguns marcadores de estresse oxidativo e inflamação dos casos avaliados como dano ao fígado.

Tabela 1. Marcadores de defesa antioxidante, dano oxidativo e inflamação

Síntese de ERONs ou dano por eles, formando metabólitos reativos do oxigênio (MROs)	Aumento da defesa AO	Síntese e níveis de citocinas e interleucinas
Níveis de: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO^{\cdot}$, $HOCl$, $NO^{\cdot}$, $ONOO^-$, $ONOOH$, $NO_2^{\cdot-}$, ROS; $NO(x)$	Enzimas antioxidantes: GPx, GR, GST, SOD, CAT	
Níveis de enzimas (atividade/expressão) relacionados a ERONs: iNOS, XO, COX, LPO, MPO; cytochrome P450 2E1, PGE_2	Níveis de defesa não enzimática: GSH, GSH/GSSG	TNF- α , IL-1 β , INF- γ , IL-6, IL-10, IL-1,
Níveis de produção de enzimas (atividade/expressão) relacionados a pró-oxidantes: NF- κ B, I κ B- α .	P-SH, Vit E, Vit C, Zn, Se; Níveis da capacidade antioxidante (TAS, TAC)	IL-5, IL-12, IL-16, IL-2, IL-4, IL-17, TGF- β
Níveis de danos oxidativos causados por ERONs: formação de AGE, 8-OXOdG, LP, MDA, 4-HNE, TBARS, GSSG, protein carbonyls	Níveis de produção de enzimas antioxidantes (atividade/expressão): Nrf2.	

Legenda: AO: antioxidantes; AGE: produtos de glicação avançada; CAT: catalase; COX: ciclooxygenase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; GSH/GSSG: razão glutathione reduzida/glutathione oxidada; GR: glutathione reductase; GST: glutathione S-transferase; IL: interleucina; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; INF- γ : Interferon gamma; I κ B- α : inibidor do fator nuclear kappa-B; LPO: lipoxigenase; LP: peróxido lipídico; MPO: Mieloperoxidase; MDA: malondialdeído; NO(x): nitrato/nitrito total; NF- κ B: fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa das células ativadas B; Nrf2: *fator nuclear eritroide 2* relacionado ao fator 2; PGE_2 : prostaglandina E2; P-SH: proteína tiol; MROs: metabólitos reativos de oxigênio; EROs: espécies reativas de oxigênio; ERONs: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; SOD: superóxido dismutase; TAC: capacidade antioxidante; TAS: status antioxidante total; TGF- β : fator de crescimento transformador beta; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; XO: xantina oxidase; 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; 8-OHdG: 8-oxo-7,8-di-hidro-2 desoxiguanosina

4. Discussão

4.1. Estresse Oxidativo e Inflamação na Lesão Hepática

O fígado é o principal órgão do metabolismo e desintoxicante de substâncias derivadas da ingestão e também produzidas a partir do sangue. Está equipado com uma população de células imunes inatas incluindo KCs, células dendríticas, natural killer (NK) e natural killer T (NKT), todas contribuindo para numerosas patologias hepáticas (MOORE et al., 2013). Em circunstâncias normais, o metabolismo aeróbico do fígado leva a produção, em estado estacionário dinâmico, de pró-oxidantes, de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que são equilibradas pelo seu sequestro por antioxidantes (VIDELA et al., 2004). Em níveis fisiológicos, EROs têm um importante papel biológico, e são considerados mediadores celulares vitais em várias vias metabólicas e de sinalização (D'AUTREAUX; TOLEDANO, 2007; MITTLER et al., 2011).

O EO, desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, está envolvido na patogênese de doenças hepáticas (TELL et al., 2013), independentemente da sua etiologia e curso da doença. Uma base comum em todos os tipos de lesão hepática é o aumento da geração de EROs (CENTER, 2004) e, para isso, os biomarcadores do EO podem ser úteis como indicadores de processos patogênicos ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica, podendo ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e terapia individualizada (HO et al., 2013).

O termo EROs é genérico e descreve uma grande variedade de moléculas, radicais livres (espécies químicas com elétrons desemparelhados) ou íons derivados de oxigênio molecular, por exemplo, oxigênio singleto (O_2), ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999), entre outros. As principais fontes de EROs são as mitocôndrias e o citocromo P450 nos hepatócitos, KCs e neutrófilos (CENTER, 2004). Essas espécies têm reatividade química, meia-vida e solubilidade lipídica diferentes. A toxicidade e alta reatividade de EROs resultam de sua meia-vida curta, que por sua vez limita a sua difusão. Contrariamente as EROs, os produtos aldeídicos, tais como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) têm meias-vidas mais longas e, assim, são capazes de se difundir a partir de seu local de origem para outros lugares (intra e extracelular), amplificando os efeitos do EO (ROLO et al., 2012). Estes produtos são gerados por peroxidação lipídica em membranas celulares e organelas devido a danos causados por EROs em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (GIAVAROTTI, 2001; POSSAMAI, 2005; SILVA et al., 2011).

As EROs e ERNs podem ser removidos pelo fígado por antioxidantes, tais como GSH, vitaminas C, A e E e enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina (MARI et al., 2010; SERVIDDIO et al., 2013).

SOD está envolvido na dismutação do $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 , e CAT ou GPx transforma H_2O_2 em água e oxigênio livre. O radical $HO^{\bullet}$ é formado por reações de Fenton e/ou Haber-Weiss, com metais de transição como catalisadores (VASCONCELOS et al., 2007).

O EO pode ser observado em várias etiologias de doenças hepáticas, tais como DHGNA, DHA, intoxicação por drogas e pesticidas, radiação ionizante, toxinas e outros produtos químicos (CHEN et al., 2013). Além disso, o fígado pode ser lesionado durante o curso de muitas doenças que são sistêmicas ou que envolvem predominantemente outros órgãos, como sepse, doenças cardiovasculares (DCV), obesidade, doença renal crônica (DRC) e diabetes (EDWARDS; WANLESS, 2013). Apesar do grande número e variedade de fatores iniciadores, derivados de ambientes extra- ou intra-hepáticos (CENTER, 2004; EDWARDS; WANLESS, 2013; SANTOS et al., 2015), os resultados finais são restritos, incluindo a morte de hepatócitos ou colangiócitos levando, em casos graves, aos padrões estereotipados anatômicos e clínicos de hipertensão portal, com ou sem cirrose (EDWARDS; WANLESS, 2013).

Uma fonte comum de EO em doenças hepáticas emana de fagócitos hepáticos ativados, os KCs (CENTER, 2004), também conhecido como células Browicz-Kupffer e macrófagos estelares (ZHOU et al., 2014), uma das populações de células imunes inatas (MOORE et al., 2013). Eles participam de todas as formas de doenças inflamatórias crônicas do fígado e o seu envolvimento nestas doenças pode representar o seu recrutamento como uma resposta tecidual ao EO (CENTER, 2004; BAFFY, 2009; ZHOU et al., 2014).

Os KCs ativados produzem um repertório complexo e altamente interativo de mediadores e citocinas inflamatórias, mediado por NF- κ B (CENTER, 2004), tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e iNOS (NAKAMOTO; KANAI, 2014), onde alguns deles estimulam a liberação de oxidantes, incluindo $O_2^{\bullet-}$ derivado da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) e de bactérias endocíticas transportadas através da circulação portal (MOORE et al., 2013). O NF- κ B representa uma família de proteínas que compartilha o domínio de ligação ao DNA conhecido como o domínio de homologia Rel (RHD) na forma de homo- ou hetero-dímeros (p50/p65) e ativa muitos genes envolvidos na resposta celular ao EO, incluindo genes para citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, e proteínas de fase aguda positivas (SAMUNI et al., 2013). Os dímeros de NF- κ B são covalentemente ligados a uma proteína inibitória I κ B que evita a translocação do NF- κ B para o núcleo. Após a fosforilação do I κ B por proteína kinase específica, I κ B kinase (IKK), e poliubiquitinação, e degradação proteolítica por proteossoma 26S, ocorre o transporte do NF- κ B para o núcleo (HADDAD, 2002).

NADPH oxidase pode estimular, em hepatócitos, a produção de EROs (BHO GAL et al., 2010) que causa dano ao DNA, induz apoptose, e expressão de genes envolvidos na síntese de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando, no pior desfecho, sua transformação em células malignas. A iNOS pode estimular a toxicidade hepática por aumento da produção de NO[•] (CZAJA, 2014). Algumas daquelas citocinas podem ativar vias intracelulares específicas, como por exemplo, sinais pró-apoptóticos via caspase (CENTER, 2004; COMPARE et al., 2012). Em alguns distúrbios hepáticos, a apoptose elimina um número crítico de hepatócitos, levando ao comprometimento da função hepática (CENTER, 2004). Os hepatócitos lesados podem libertar corpos apoptóticos e ativar KCs, e estas células ativadas podem promover respostas inflamatórias e fibrogênicas, levando a um ciclo vicioso de lesão hepática (CZAJA, 2014).

Durante a inflamação, as células do sistema imunológico, entre as quais mastócitos e outros leucócitos, são recrutados para o local da lesão, o que leva a uma exacerbação da respiração celular devido ao aumento do consumo de oxigênio causando um aumento na liberação e acúmulo de EROs no local do dano (REUTER et al., 2010).

A ativação de KCs amplifica as respostas inflamatórias dos tecidos também através da atração e adesão de neutrófilos e mastócitos e pela liberação de compostos que provocam a aglomeração de plaquetas, obstruindo a microcirculação local, levando a isquemia reperusão (CENTER, 2004). A geração destes mediadores inflamatórios, EROs, superexpressão de proteínas pró-apoptóticas, esgotamento de antioxidantes e danos mitocondriais estão associadas a alterações morfológicas e funcionais que induzem uma resposta inflamatória aguda que leva a diversas complicações clínicas (COMPARE et al., 2012; CZAJA, 2014). Exemplos disso são: fibrose, definida como a acumulação de ECM excessiva; e posterior cirrose, caracterizada pela perda da arquitetura hepática normal e formação de septos e nódulos, hipertensão portal e progressão para carcinoma hepatocelular e insuficiência hepática (CHEN et al., 2015; MORMONE et al., 2011).

As citocinas e quimiocinas derivadas de KCs, tais como TGF- β 1, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TNF- α e IL-1, bem como o dano aos hepatócitos, podem induzir a ativação das HSCs, anteriormente conhecidas como células de armazenamento de gordura, células de Ito, lipócitos, células perisinusoidais ou células ricas em vitamina A (ZHOU et al., 2014), para se transformarem em miofibroblastos, promovendo fibrogênese hepática (CZAJA, 2014; DUVAL et al., 2014; MORMONE et al., 2011). A ativação progressiva de HSCs leva a alterações nas funções celulares, gerando subpopulações de células estreladas com diferentes perfis fenotípicos. Além disso, a ativação de HSCs está

associada com aumento da expressão de α -actina no músculo liso (α SMA) (DUVAL et al., 2014; GIRAUDI et al., 2015) e produção de componentes da ECM, tais como colágenos tipo 1, 3 e 4 (NAKAMOTO; KANAI, 2014; PELZ et al., 2012; ZHOU et al., 2014).

Os mediadores liberados após dano dos hepatócitos, tais como MDA/4-HNE, citocinas, EROs e hepatotoxinas são ativadores importantes de HSCs (MORMONE et al., 2011). Com a persistência desses estímulos e a manutenção das lesões, cria-se uma fase de perpetuação regulada pela estimulação autócrina e paracrina. Esta fase promove alterações no comportamento das HSCs, incluindo proliferação, contratilidade e fibrogênese (COHEN-NAFTALY, M.; FRIEDMAN, 2011).

As EROs também causam a reticulação das citoqueratinas para formar corpúsculos de Mallory e estimular a quimiotaxia dos neutrófilos (ROLO et al., 2012). Além disso, essas espécies reativas promovem a regulação positiva da expressão de genes envolvidos na fibrogênese, como pró-colágeno tipo I, proteína quimioatraente monocitária 1 (MCP-1) e inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (TIMP1), possivelmente via ativação de fatores de transcrição, incluindo c-jun N-terminais quinases (JNKs), proteína ativadora 1 (AP-1) e NF- κ B (MORMONE et al., 2011). O MDA também contribui para a inflamação através da ativação de NF- κ B, e o 4-HNE por si só é um estímulo pró-fibrótico que *up-regulates* o pró-colágeno e a expressão gênica do (TIMP1 (DIESEN; KUO, 2011).

A ativação de HSCs estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, causando inflamação que inicia a fibrogênese, apoptose e necrose do hepatócito (NAKAMOTO; KANAI, 2014). Além disso, esta inflamação hepática favorece o recrutamento de células imunes e inflamatórias. Quando as HSCs são desativadas, isto facilita a conclusão da fibrogênese e regressão da matriz extracelular (CENTER, 2004; CZAJA, 2014).

Neste contexto, todas essas interações moleculares e celulares e sua perpetuação, podem levar à fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (CZAJA, 2014).

4.2. N-acetilcisteína e suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias

Muitos estudos atuais sobre o tratamento de doenças hepáticas são contraditórios e não suficientemente claros. No entanto, uma área indiscutível de benefício terapêutico envolve a atenuação do dano oxidativo hepático. Conforme relatado, os mecanismos de lesão hepática são multifatoriais, mas quase todos envolvem lesões oxidativas na membrana celular e organelas, proteínas, enzimas e lipídios, e o tratamento, em parte, envolve a proteção contra lesões oxidativas e abordagens capazes de manter um adequado balanço redox (CENTER, 2004). Antioxidantes, naturais ou sintéticos, têm sido de uso especial para este controle e

alguns deles devem prolongar a sobrevivência e reduzir a ocorrência de HCC (CZAJA, 2014). Assim, a atividade antioxidante desempenha um papel chave na terapêutica alternativa, envolvendo o fígado (CENTER, 2004).

Os tiois, os antioxidantes endógenos sistêmicos e intracelulares mais importantes, têm sido o foco de interesse particular da comunidade científica (ATKURI et al., 2007; CENTER, 2004; TIROUVANZIAM et al., 2006). Os tiois podem ser encontrados em proteínas (P-SH) ou em metabólitos de baixa massa molecular, incluindo GSH (Figura 1) (MARI et al., 2010). O estado de tiol alterado tem efeitos sobre os hepatócitos e outras células residentes e transitórias dentro do fígado (CENTER, 2004). O aumento dos níveis de tiol da célula, pela administração direta de GSH, não é recomendado, uma vez que a GSH não atravessa facilmente a célula, e sim é sintetizado dentro da célula (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). Portanto, são necessárias alternativas para induzir a síntese de glutathione, através do fornecimento de aminoácidos precursores e/ou outros agentes indutores (ARRANZ et al., 2008).

Como uma fonte de grupos -SH, a *N*-acetil-L-cisteína (NAC) (forma ativa), está sendo estudada em doenças caracterizadas por aumento do EO e/ou diminuição da GSH (BAUMGARDNER et al., 2008). A baixa capacidade antioxidante em um ambiente celular com EO é principalmente devido à diminuição da GSH e/ou aumento da glutathione oxidada (GSSG), uma vez que a GSH é o tiol de baixo peso molecular mais abundante, presente em concentrações milimolares em muitos tipos de células, incluindo o fígado (ATKURI et al., 2007; MARI et al., 2010; TIROUVANZIAM et al., 2006). A GSH está diretamente envolvido na remoção de aldeídos e peróxidos tóxicos e mantém indiretamente o estado reduzido (forma ativa) das vitaminas C e E (GARAIOVÁ et al., 2004). Além disso, a GSH atua na desintoxicação de compostos xenobióticos eletrofílicos, na modulação da regulação redox na transdução de sinal, na resposta imune, no metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, na sinalização de neurotransmissores, na modulação da proliferação celular, entre outros (SAMUNI et al., 2013). Portanto, a NAC poderia conferir benefícios em distúrbios causados pelo EO (ATKINSON, 2002). Foi relatado pela primeira vez que a NAC tem benefícios clínicos no início dos anos 60, quando se observou que a NAC tinha um efeito de agente mucolítico em pacientes com fibrose cística (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). No entanto, evidências conclusivas de sua eficácia ainda está faltando (AITIO, 2005).

Sendo um tiol (R-SH), a NAC pode ser oxidado por vários radicais e serve como um nucleófilo (SAMUNI et al., 2013). Em comparação com a cisteína (Cys), a NAC tem menor toxicidade e susceptibilidade à oxidação (e dimerização), além de possuir maior solubilidade

em água (ATKURI et al., 2007). O aminoácido Cys é facilmente oxidado, gerando o dissulfeto inativo, a cistina, relativamente instável (Cys-Cys). A NAC pode ter a capacidade de entrar na célula via membranas sem transportadores de aminoácidos, no entanto, não é bem absorvida, e a atividade de transporte em células e tecidos é baixa (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

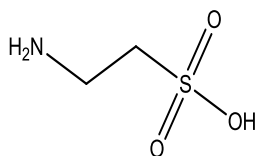
A NAC é um agente redutor mais forte do que a cisteína e o GSH, mostrando um potencial redox do par NAC tiol/dissulfeto maior em 63 e 106 mV (vs. eletrodo de combinação semi-micro de Orion 9103BN) do que a dupla redox GSH/GSSG e Cys/Cys-Cys, respectivamente (NOSZÁL et al., 2000). Quanto à capacidade de eliminação direta de EROs (SADOWSKA et al., 2007), a NAC reage rapidamente com radicais altamente oxidantes, em pH 7 e em temperatura ambiente, por exemplo com $\text{HO}^\bullet$ ($1.36 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$) ($\approx 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) ($\approx 1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (SAMUNI et al., 2013). Assim, a NAC atua na desintoxicação de EROs produzidos por leucócitos (AKCA et al., 2005) e é capaz de quelar metais de transição, tais como Cu^{2+} , Fe^{3+} , e metais pesados, tais como Cd^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} (KASPERCZYK et al., 2014), principalmente através da sua cadeia lateral tiol para formar complexos, que são facilmente excretados do corpo, sendo removidos dos meios intra e extracelular (SAMUNI et al., 2013). No pH fisiológico, a NAC pode quelar Hg^{2+} e assim atuar como um antídoto contra envenenamento por HgCl_2 (OLIVEIRA et al., 2015). Embora a NAC tenha a capacidade de eliminar diretamente os radicais livres, as constantes de velocidade na reação com as EROs é menor do que em relação às enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPx (JONES et al., 2003). Assim, a eliminação direta de radicais não é tão importante como atividade antioxidante.

Há várias vias para fornecer este antioxidante: oralmente, i.v., topicamente ou por inalação. A administração de NAC oralmente é preferido, apesar de algumas situações clínicas que requerem administração i.v. (SARNSTRAND et al., 1999). A NAC oralmente é geralmente bem aceita e sua indicação como "nutracêutica" tem um impacto positivo nos pacientes (DODD et al., 2008). Na Europa, a NAC é produzida e empacotada em cápsulas e tablets, bem como em formulações efervescentes, que podem ser dissolvidos em água e sucos para criar um sabor agradável, sendo facilmente tolerado (ATKURI et al., 2007), e na forma de colírios (ZHANG et al., 2008). Não existem recomendações para a dosagem oral com NAC e consequentemente uma vasta gama de doses tem sido utilizada em ensaios clínicos e experimentais. Leves náuseas, vômitos e diarreia têm sido relatados como efeitos colaterais dose-dependentes da NAC via oral ((ATKURI et al., 2007; DODD et al., 2008).

NAC consumida por via oral é absorvido no intestino e é entregue ao fígado através da veia porta. No fígado, a NAC, rapidamente, integra peptídios para a geração de proteínas e uma diversidade de metabólitos (GRIFFITH; MEISTER, 1979; LASRAM et al., 2015; NOSZÁL et al., 2000). No plasma, a NAC pode estar presente na sua forma reduzida e em várias formas oxidadas. Pode ser oxidado a um dissulfeto, a N, N'-diacetilcistina, e pode reagir com outros tiois de baixo peso molecular, tais como Cys e GSH, formando dissulfetos mistos. Além disso, a NAC pode sofrer reações redox com grupos tiol das proteínas plasmáticas e tornar-se oxidado (DODD et al., 2008).

Segundo Bonanomi e Gazzaniga (1980), a NAC é quase completamente absorvida, quando administrada oralmente em ratos, somente 3% da radioatividade da ^{35}S -NAC foi encontrada em fezes (BONANOMI; GAZZANIGA, 1980), sugerindo que a absorção da NAC e seus metabólitos é quase completamente absorvida (LASRAM et al., 2015). Um estudo metabólico com ^{35}S -NAC em ratos demonstrou que Cys e Cys-Cys foram os principais metabólitos no fígado e o sulfato inorgânico foi o principal produto de excreção urinária (SHEFFNER et al., 1966). Entre 13 e 38% de uma dose oral de NAC radioativo foram detectados na urina após 24 h (BORGSTRÖM et al., 1986). Além disso, pequenas quantidades de taurina (Figura 2) e sulfatos também são detectadas na urina (LASRAM et al., 2015).

Figura 2: Estrutura química da taurina.



Fonte: ANDRADE, K. Q.

Por desacetilação extracelular de NAC, Cys é liberada e introduzida em células através de transportadores de aminoácidos (ARRANZ et al., 2008). O processo de desacetilação da NAC permanece incerto. A hipótese é que a Cys livre é necessária para a síntese de GSH. A NAC atravessa a membrana celular intacta antes de sofrer hidrólise para cisteína dentro da célula com a ação de N-desacetilases. Para os efeitos mucolíticos da NAC, a desacetilação pode não ser uma condição prévia, uma vez que o grupo sulfidril está livre para interagir com as ligações dissulfeto da proteína (Figura 3) (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). Segundo Borgström et al. (1986), a biodisponibilidade oral de NAC em humanos, calculada como a área sob curva de concentração plasmática vs. tempo (AUC) (oral)/AUC (i.v.), variou entre 6% e 10%, provavelmente devido à absorção intestinal e alto metabolismo

de primeira passagem; e no plasma, o nível de NAC é baixo, uma vez que é rapidamente introduzido nas células e convertido em GSH, mantendo um gradiente de concentração constante através da membrana (BORGSTRÖM et al., 1986).

Os níveis plasmáticos de NAC, após administração oral de 600 mg, atingem o seu máximo após 60 min (4,6 μ M), diminuindo rapidamente para 2,5 μ M, após 90 min. Outros estudos descreveram valores de 16 e 35 μ M, após administração oral de 600 a 1200 mg/dia, respectivamente. Sugere-se que a meia vida plasmática seja de cerca de 2,5 h e a NAC não seja detectável 10-12 h após a administração. Após administração intravenosa, observam-se elevadas concentrações de NAC no plasma. Para inibir a inflamação em estudos *in vitro*, a concentração de NAC deve ser maior do que a necessária para inibir EO. Já em estudos *in vivo*, doses mais elevadas são necessárias para provocar efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios agudos. Mas para realizar estudos crônicos *in vivo*, doses menores são necessárias para o mesmo efeito (SADOWSKA et al., 2007).

Como qualquer droga, a NAC tem efeitos colaterais e reações adversas. Devido à sua elevada osmolalidade, uma dose terapêutica elevada de NAC pode conduzir a confusão e perturbações eletrolíticas (ATKINSON, 2002). As reações adversas não são clinicamente reconhecidas com a administração oral de NAC em doses de até 8000 mg/dia (ROSA et al., 2000). É evidente que níveis elevados de antioxidantes podem ter um efeito pró-oxidante, possivelmente mediado por redução de metais de transição e pelo aprimoramento da Química de Fenton (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

Os resultados de estudos toxicológicos com NAC foram revisados por Bonanomi e Gazzaniga (1980). De acordo com esta revisão, estudos de toxicidade aguda, sub-aguda e sub-crônica foram realizados em ratos e cães, estudos teratológicos e de reprodução em ratos e coelhos e um teste de mutagenicidade *in vitro*. Numa toxicidade aguda, a DL₅₀ oral em camundongos e ratos foi determinada como sendo superior a 6000 mg/kg de peso corporal (p.c.). Nos estudos que observaram a toxicidade sub-aguda e crônica, a administração oral de 2000 mg/kg p.c./dia durante 4 semanas em ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley e 1000 mg/kg p.c./dia durante 28 semanas em ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley não afetaram o comportamento, ganho de peso corporal, hematologia, função hepática e renal, tempo de protrombina e de hemorragia. As descobertas da necropsia e dos exames histológicos não forneceram evidências de lesões patológicas. Um teste de Ames utilizando *Salmonella typhimurium* com e sem microsomas hepáticos não mostrou efeito mutagênico (BONANOMI; GAZZANIGA, 1980).

Resultados positivos foram observados com o uso de NAC em modelos animais (CETINKAYA et al., 2005) e em ensaios clínicos (GUIJARRO et al., 2008) e tem sido utilizado no tratamento de várias doenças, tais como intoxicação (SAMUNI et al., 2013), lesão cardíaca por isquemia-reperfusão (I/R) (BAKER et al., 2009), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (SADOWSKA et al., 2007), bronquite (ATKURI et al., 2007), HIV (DRÖGE et al., 1992), desordens psiquiátricas (BERK et al., 2013), e outros.

Em muitos estudos, a NAC demonstrou aumentar os níveis de GSH nas células hepáticas, tendo, por sua vez, efeitos antioxidantes nas células. Aumenta a capacidade de proteção da célula hepática, uma vez que a exaustão de GSH é frequentemente vista como uma consequência do aumento do EO e da inflamação (ÇAĞLIKÜLEKCI et al., 2004). Além disso, a NAC estimula também a atividade das enzimas citosólicas envolvidas na requisição de GSH, como glutatona redutase (GR) (ARRANZ et al., 2008).

Outros efeitos benéficos da NAC são: (1) redução de ligações dissulfeto da proteína, interrompendo as suas ligações e alterando as suas estruturas, o que pode explicar a sua

atividade no bloqueio do TNF- α reduzindo a afinidade pelo receptor (HAYAKAWA et al., 2003; HOU et al., 2013); (2) regulação do ciclo celular e apoptose (PARK et al., 2014); (3) atividade anti-neoplásica e anti-mutagênica (PARASASSI et al., 2005); (4) modulação da expressão gênica e transdução de sinal; (5) modulação do sistema imune e funções mitocondriais (SAMUNI et al., 2013).

Quanto à apoptose, Lin et al. (1997) demonstrou o efeito protetor da NAC contra a apoptose induzida por peroxinitrito (ONOO^-) por modulação dos níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Zaragoza et al. (2000) reportou que a NAC tem sido usada para proteger contra a apoptose induzida por cocaína através da *upregulation* de enzimas antioxidantes, tais como SOD (Mn-SOD e Cu/Zn-SOD), GPx e CAT. Em adição, NAC é valiosa para células imunes, e influencia várias vias do processo fagocítico (MAHAPATRA et al., 2011). NAC demonstrou atividade imunomoduladora, melhorando as funções imunitárias, tais como a quimiotaxia dos leucócitos e reduzindo os níveis de TNF- α e IL-8 (SAMUNI et al., 2013), e citocinas que atraem as células inflamatórias e aumentam a produção de oxidantes por estas células (HAFIZ et al., 2013).

Alterando a solubilidade intracelular de tiol, a NAC pode influenciar o equilíbrio das células Th1 e Th2, ajudando na estimulação de perfis específicos de citocinas. As células Th1 secretam principalmente TNF- α e IL-12, ambas citocinas pró-inflamatórias, enquanto que as células Th2 liberam principalmente IL-10, citocina anti-inflamatória (MAHAPATRA et al., 2011). Como certas propriedades imunitárias são muito sensíveis ao EO, mesmo uma diminuição moderada nos níveis intracelulares de GSH, há consequências importantes para uma variedade de funções de leucócitos, especialmente a mais sensível, tal como a proliferação de linfócitos T e a atividade de NK, dependentes de IL-2 (ARRANZ et al., 2008).

A NAC inibe a expressão da molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1), um membro da superfamília de imunoglobulinas, inibindo a ligação de NF- κ B ao VCAM-1 κ B motif (ZAFARULLAH et al., 2003). VCAM-1 regula o recrutamento de células T e permite que a inflamação persista, dando um sinal de sobrevivência para linfócitos (AFFORD et al., 2014). A atividade anti-inflamatória da NAC tem sido estudada através do seu efeito sobre NF- κ B, que é central na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta ao EO e inflamação (CSONTOS et al., 2012; HADDAD, 2012; MAHAPATRA et al., 2011; SADOWSKA et al., 2007) e em vias de transcrição, tais como p38 e quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), quinase de proteína ativada por estresse/quinase c-Jun (SAPK/JNK), c-Jun e c-Fos, entre outras (SADOWSKA et al., 2007). Juntamente com estes

fatos, a NAC afeta outras vias de transdução, expressão genética e modula a atividade dos fatores de transcrição tanto *in vivo* como *in vitro* (SAMUNI et al., 2013).

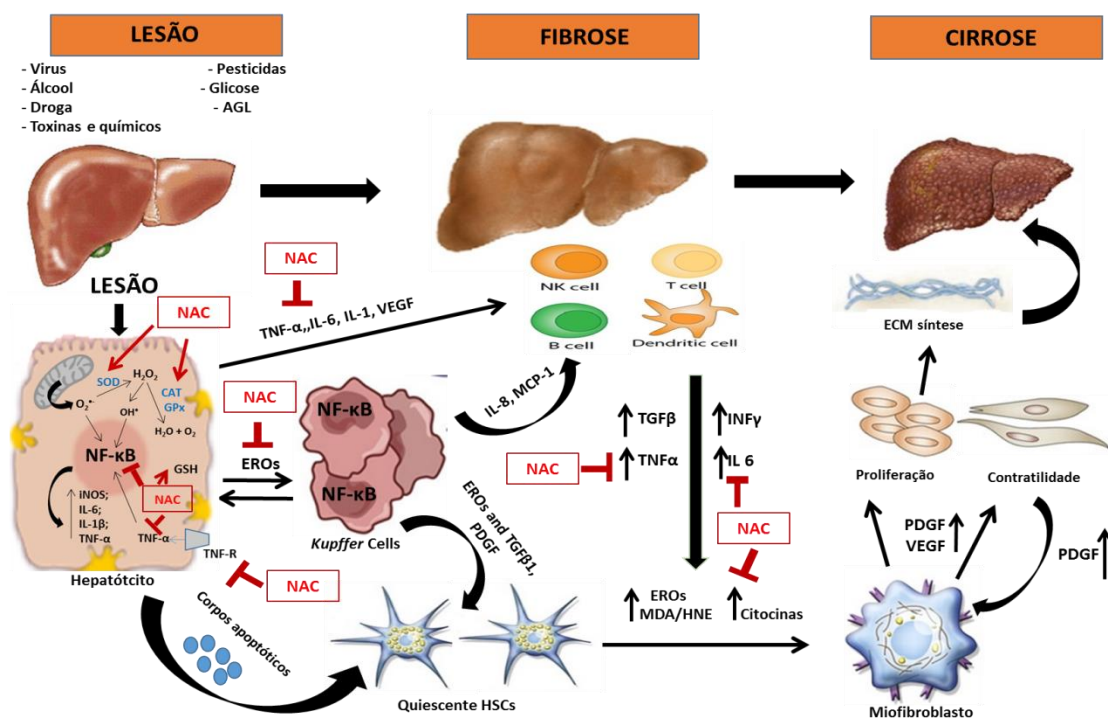
O tratamento de células em cultura *in vitro* ou em doentes com sepse utilizando NAC houve a supressão da ativação de NF- κ B e subsequente produção de citocinas (KIM et al., 2006; PATERSON et al., 2003). Com a liberação de NF- κ B, a transcrição de genes que codificam TNF- α , IL-1 e IL-6 pode aumentar, o que resulta em um ciclo de feedback positivo. O TNF- α provoca ubiquitinação de I κ B e subsequente degradação por proteases. NAC bloqueia o TNF- α impedindo a ativação de NF- κ B, independentemente da sua atividade antioxidante, provocando alterações estruturais no receptor de TNF- α que reduz a sua afinidade com seu receptor (HOU et al., 2013).

Segundo o estudo de Pajonk et al. (2002), a administração de NAC suprime a subunidade catalítica 19S, inibindo assim a ativação de NF- κ B, e segundo Oka et al. (2000), NAC inibe IKK. NAC também inibe a produção de NO $^{\bullet}$ (HOU et al., 2013). Efeitos patofisiológicos são observados quando os níveis de NO $^{\bullet}$ estão elevados, devido a sua interação com O $_2^{\bullet-}$ (INGARAMO et al., 2011). Além disso, estudos em fígados de ratos e células humanas têm sugerido que o NO $^{\bullet}$ tem a capacidade de induzir a apoptose (RONCO et al., 2004) e que a expressão gênica da caspase-8 induzida por NO $^{\bullet}$ poderia contribuir para a morte celular (RABKIN; KLASSEN, 2007).

Diante disso, fica claro o potencial da NAC como um fármaco terapêutico em várias doenças em que o EO e inflamação estão envolvidos no processo patogênico.

Nesta seção, descrevemos brevemente o impacto do EO e da inflamação nas doenças hepáticas e as possibilidades do uso da NAC como agente terapêutico (Figura 4).

Figura 4: Possíveis mecanismos moleculares de ação da N-acetilcisteína (NAC) na atenuação da lesão hepática envolvendo estresse oxidativo e inflamação.



Legenda: CAT: catalase; ECM: matriz extracelular; FFA: ácidos graxos livres; GPx: glutathione peroxidase; HSCs: células estreladas hepáticas; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; IL: interleucina; INF γ : interferon gamma; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MDA/HNE: malondialdeído/4-hidroxinonenal; NF- κ B: fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa das células ativadas B; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; ROS: espécies reativas de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; TGF β 1: fator de crescimento transformador beta 1; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; TNF-R: receptor do TNF- α ; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular.

—| inibição; —> estimulação.

Fonte: ANDRADE, K. Q. Adaptado de Cohen-Naftaly; Scott L. Friedman, 2011

4.3. Doenças Hepáticas e Possibilidades do Efeito Terapêutica da N-acetilcisteína

Os principais marcadores de defesa antioxidante, de dano oxidativo e inflamação estão representados na Tabela 1.

4.3.1. Hepatite viral crônica

Hepatite C viral

A principal causa de doença hepática crônica é o vírus da hepatite C (HCV). Os resultados epidemiológicos, relatados recentemente, mostram um aumento da incidência nos últimos 15 anos em 2,8%, atingindo > 185 milhões de infecções em todo o mundo (MOHD et al., 2013). Em tal situação, existe um risco crescente de evolução para cirrose e HCC. 23% dos pacientes com HCV desenvolvem HCC (PISANI et al., 1997). Apesar da compreensão completa dos mecanismos pelos quais o HCV causa danos celulares, várias evidências confirmam que a produção de EROs aumenta enquanto a defesa antioxidante diminui significativamente em todos os tipos de danos no fígado (FARIAS et al., 2012; POLI, 2000). Portanto, o EO está envolvido na patogênese da hepatite C crônica, bem como na indução e progressão da doença hepática (KO et al., 2005) e hepatocarcinogênese na HCC (MIYANISHI et al., 2015).

Uma das consequências da expressão gênica do HCV é o estresse do retículo endoplasmático (RE). Este estresse provoca a diminuição dos estoques de cálcio no RE e o aumento da captação de cálcio nas mitocôndrias (GONG et al., 2001) e consequentemente estimula a geração de EROs que está envolvida na alteração das propriedades das proteínas, bem como levam a peroxidação lipídica, influenciando, negativamente vias importantes na célula hospedeira, incluindo a oxidação de ácidos graxos e sua exportação (TARDIF et al., 2005). A EROs ativa a tirosina celular e a serina/treonina quinases, que ativam, então, o NF- κ B e o transdutor de sinais e ativador de transcrição 3 (STAT-3). Como foi falado anteriormente, o NF- κ B provoca a ativação de genes pró-inflamatórios e pró-oxidantes (MOURA et al., 2015).

Outro mecanismo devido à infecção pelo HCV que parece estar intimamente envolvido com EO é a sobrecarga de ferro (SHEDLOFSKY, 1998). Alguns dados na literatura mostram um aumento dos teores de Fe^{+3} tanto no fígado como no soro desses pacientes (METWALLY et al., 2004; ROJAS et al., 2001), mas o mecanismo pelo qual o VHC regula o metabolismo do ferro é mal compreendido. Como consequência do acúmulo de ferro no fígado, a reação de Fenton e a geração de $\text{HO}^{\bullet}$ aumentam (VASCONCELOS et al., 2007). $\text{HO}^{\bullet}$ Reage com as membranas lipídicas, proteínas e DNA, e causa dano hepático observado pelo aumento da alanina aminotransferase (ALT) sérica (SHAN et al., 2005).

Além desses aspectos, o desequilíbrio redox em pacientes com HCV também pode ser causado pelo polimorfismo do gene CAT, que reduz a defesa antioxidante endógena (BULATOVA et al., 2015). Adicionalmente, os doentes com HCV apresentam deficiência de vitamina A e isto está correlacionado com a falta de resposta ao inteferon (terapia antiviral) (BITETTO, 2013). Deve-se notar que a vitamina A é considerada um importante antioxidante exógeno e mais de 90% da vitamina A total do corpo é armazenado no fígado. Além disso, EROs ativa a HSCs, que levam a fibrose hepática e a progressão da doença em pacientes com HCV (MASRI et al., 2015). Outra alteração redox observada em pacientes com HCV é o aumento dos níveis de MDA (KHADEM et al., 2015) e diminuição da SOD e status antioxidante total (TAS) (GABR; ALGHADIR, 2014). A inflamação, intimamente associada ao EO, pode também ser identificada na progressão HCV, especialmente necrose e apoptose e a persistência desta inflamação está associada com a progressão da fibrose hepática e o desenvolvimento de cirrose (GABR; ALGHADIR, 2014).

Alguns nutrientes com propriedades antioxidantes e/ou anti-inflamatórios foram testados com sucesso no tratamento do HCV, por exemplo, vitamina E (BUNCHORNTAVAKUL et al., 2014; VONGHIA et al., 2013).

Até agora, a NAC não tem sido utilizado no tratamento do HCV, no contexto do estresse oxidativo e da inflamação, e a sua ação anti-fibrótica em diferentes modelos animais de doença hepática pode sugerir efeitos positivos, sendo necessários estudos *in vivo* que avaliam o efeito antioxidante e anti-inflamatório da NAC, mas os ensaios clínicos são necessários para apoiar a sua utilização.

Hepatite B Viral

Um dos problemas de saúde pública mais prevalentes em todo o mundo é a infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Esse vírus afeta 30% da população mundial (TRÉPO et al., 2014). Estima-se que aproximadamente 350-400 milhões de pessoas são cronicamente infectadas com HBV no mundo e esta infecção pode levar a fibrose hepática e progredir para carcinoma hepatocellular (MCMAHON, 2010). Embora a maioria dos pacientes com infecção crônica pelo HBV não desenvolve complicações hepáticas, pode causar doenças mais tarde na vida (FERREIRA et al., 2009).

A infecção pelo HBV pode alterar o metabolismo das células hospedeiras para sustentar a sua replicação e expressão, incluindo a regulação positiva da glutamato desidrogenase 1 e isocitrato desidrogenase (TONG et al., 2008), a *up-regulation*

transcricional dos genes envolvidos na biossíntese lipídica (HAJJOU et al., 2005) e a promoção da biossíntese de hexosamina e fosfatidilcolina (LI et al., 2015). Juntamente com estas alterações metabólicas, o EO também apresenta uma ação importante na replicação viral. Quatro fases de leitura aberta: designados por Cp (proteína de núcleo), Sp (proteína de superfície), Pol (polimerase) e HBx (proteína X) fazem parte do genoma de DNA de cadeia dupla do HBV e estão associados ao EO, particularmente com o aumento do H_2O_2 e diminuição dos níveis de GSH (KIM et al., 2015).

As alterações metabólicas causadas pelo HBV estão associadas a gordura no fígado, inflamação e especialmente ao EO. Em termos de EO, é observado pelo consumo de GSH (LI et al., 2015), diminuição da atividade de GPx e aumento de MDA (ACAR et al., 2009) e níveis de proteínas carboniladas (TASDELEN et al., 2012). Além disso, β -caroteno (DIKICI et al., 2005), níveis de ceruloplasmina, status oxidante total (TOS), TAS, e EO index (EOI), representado por $TOS (\mu mol H_2O_2 \text{ equivalente/L}) / TAS (mmol Trolox \text{ equivalente/L})$, sugerem que o EO pode estar associada à atividade da hepatite B (DUYGU et al., 2012). Por conseguinte, demonstrou-se que teve um efeito sobre o dano ao DNA e na hepatocarcinogênese (TAKAKI; YAMAMOTO, 2015).

Semelhante ao HCV, a NAC ainda não foi testada no tratamento do HBV no contexto do estresse oxidativo e inflamação. No entanto, os fatos já discutidos podem apoiar a sua utilização em testes com animais e ainda em ensaios clínicos.

4.3.2. Álcool

A doença hepática alcoólica (DHA) pode se manifestar em diferentes graus de gravidade, passando de esteatose hepática (forma simples de lesão hepática) até cirrose grave. DHA é a doença hepática mais comum no mundo e é responsável por 3,8% de todos os óbitos (REHM et al., 2009).

Classicamente, existem três estágios de DHA, que são classificados histologicamente como: gordura no fígado ou esteatose hepática, hepatite alcoólica e hepatite crônica com fibrose hepática ou cirrose (MACSWEEN; BURT, 1986), e em todos eles, inflamação e EO ocorrem. A metabolização do álcool em acetaldeído, diretamente responsável pelos danos no fígado, é promovida por enzimas chave, incluindo álcool desidrogenase (ADH), CYP2E1 e CAT (SETSHEDI et al., 2010). De forma semelhante à desidrogenação de álcool a acetaldeído por ADH, a desidrogenação de acetaldeído em acetato por sua respectiva desidrogenase (aldeído desidrogenase -ALDH), pode levar à síntese de NADH, que inibe a oxidação de ácidos graxos e promove o acúmulo de gordura. NADH, em excesso, é

responsável pela lesão hepática indireta. O metabolismo alternativo do álcool pelo CYP2E1 leva à produção de EROs, causando peroxidação lipídica e inflamação. Além disso, o álcool também aumenta a permeabilidade intestinal, levando a endotoxemia. Isto leva à ativação de KCs no fígado para liberar TNF- α , o que por sua vez leva a mais EO (FORREST; REED, 2011). Quando o acetaldeído se acumula, liga-se, formando adutos, isto é, produtos covalentes de adição química, com proteínas, lípidos e DNA, causando disfunção, dano e mutação do DNA (SETSHEDI et al., 2010).

O EO e inflamação foram confirmados em pacientes com ALD, em vários estudos. Qu et al., observaram que a proteína 70 de choque térmico (HSP70), um polipeptídeo intracelular envolvido em respostas imunes, contribuindo para danos vasculares e liberação de TNF- α , foi aumentada na doença hepática gordurosa alcoólica. Grasselli et al. (2014) também identificou desequilíbrio redox em indivíduos com ALD: aumento da peroxidação lipídica e estimulação das atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD (GRASSELLI et al., 2014). Parthasarathy et al. (2015) estudando pacientes cirróticos observaram que, mesmo durante a retirada do álcool, essas alterações são mantidas (PARTHASARATHY et al., 2015).

Com base na relação estreita entre EO e ALD e sua progressão, pesquisas estão sendo conduzidas para investigar as vantagens da terapia antioxidante em modelos animais, bem como em seres humanos. Segundo Pivetta et al. (2006) (Tabela 2), NAC sozinho na dose de 300 mg/kg/dia, durante 30 dias, via i.p., não restaurou níveis não proteicos e GPx em níveis normais, que estavam reduzidos com a administração de álcool (PIVETTA et al., 2006). Outra observação importante por Caro et al. (2014) (Tabela 2), foram os efeitos benéficos da NAC sobre o EO no citosol, mas não na mitocôndria do hepatócitos (CARO et al., 2014). A suplementação com NAC pode ser eficaz durante a abstinência do etanol, melhorando os níveis séricos de lipídios e as defesas antioxidantes hepáticas (níveis teciduais de GSH/GSSG e atividade de GR tecidual) (SEIVA et al., 2009) (Tabela 2). Curiosamente, o pré-tratamento com a NAC foi capaz de atenuar a peroxidação lipídica e a depleção de GSH causada pela administração de álcool, em período agudo, mas no pós-tratamento, a NAC agravou a peroxidação lipídica hepática e agravou a lesão hepática aguda induzida pelo etanol de forma dose-dependente (WANG et al., 2006) (Tabela 2).

É evidente a partir das informações acima que a suplementação de NAC precisa de mais investigação no tecido hepático e em várias condições clínicas para validar ou não a sua utilização em ALD, na prática clínica.

Tabela 2. Efeito antioxidante e anti-inflamatório da *N*-acetilcisteína no dano hepático.

Tipo de Dano	Tipo de Estudo	Via de administração	Dose; Tempo de Administração	ERONs (Síntese ou Dano)	Defesa Antioxidante	Síntese e Níveis de Citocinas e Interleucinas	Ref.
DOENÇAS							
EHNA	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	2 g/kg/d, 65 d	↓ LOOH e MDA níveis teciduais; ↓ Citocromo P450 2E1 expressão tecidual	GSH [#] níveis tecidual	↓ TNF- α expressão tecidual mRNA, IL-1 β [#] expressão tecidual mRNA	BAUMGARDNER et al., 2008
	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (dieta)	20 mg/kg/d, 6 sem	MDA [#] níveis tecidual	↓ GSH níveis plasmáticos	-	THONG-NGAM et al., 2007
	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (dieta)	500 mg/kg/d, 4 sem	MDA [#] níveis tecidual	GSH [#] níveis tecidual	-	SAMUHASANEE TO et al., 2007
Fibrose	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	50 mg/kg/d, 6 sem	-	GSH [#] níveis tecidual	↓ TNF- α e IL-6 níveis tecidual	DEMIROREN et al., 2014
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.m.	50 μ mol/kg/d, 2 sem	↓ TBARS níveis teciduais; ↓ proteína carbonilada níveis tecidual	↑ GSH e P-SH níveis teciduais	-	VENDEMIALE et al., 2001
Cirrose	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	1 g/kg, 7 sem	-	↑ GSH níveis teciduais	-	TSUYUKI et al., 1998
Diabetes mellitus	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (gavagem)	1.5 g/kg/d, 4 sem, após indução	-	↑ Atividade antioxidante total tecidual ↑ Atividade da SOD em tecido	-	LEI et al., 2012
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	25 ^a mg/kg/d; 75 ^b mg/kg/d, 30 d	↓ MDA ^{a,b} níveis teciduais	↑ GSH ^b níveis teciduais; Atividades teciduais da GPx [#] e SOD [#]	-	RIBEIRO et al., 2011
Obesidade	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (água)	2 mg/L/d, 30 d	↓ lipídio hidroperóxido níveis teciduais	↑ GSH níveis teciduais; ↑ GSH/GSSG níveis	-	DINIZ et al., 2006

					teciduals; ↑ SOD atividade tecidual; CAT [#] atividade tecidual; ↑ GPx atividade tecidual		
Isquemia-reperfusão	<i>In vivo</i> (camundongo)	i.p.	300 mg/kg/d, 2 h antes da isquemia	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual	-	SUN et al., 2014
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	1 g/kg/d, cada segundo dia durante um período de 10 dias, antes da isquemia	↓ Proteínas carboniladas níveis tecidual; ↓ Proteínas carboniladas/GSH níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual	-	FERNANDEZ et al., 2013
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	500 mg/kg, 20 min antes da indução	↓ MDA níveis tecidual	↓ GPx atividade tecidual	-	DEMIR; INAL- ERDEN, 1998
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	150 mg/kg, 15 min antes da isquemia e imediatamente antes do período de reperfusão	↓ MDA níveis tecidual; ↓ oxidação proteica em tecido; ↓ MPO atividade tecidual	↑ GSH níveis tecidual	-	SENER et al., 2003
	<i>In vivo</i> (camundongo)	i.v.	150 mg/kg, 6 ^a h, 12 ^b h e 24 ^c h após IR	↓ EROs ^{a,b,c}	-	↓ IL-6 ^{a,b,c} mRNA, TNF-α ^{a,b} ↓ NF-κB ^b	WANG et al., 2014
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.v.	150 mg/kg, antes da reperfusão	↓ MDA níveis teciduais; ↓ MPO atividade tecidual	↑ GSH níveis teciduais		TAKHTFOOLADI et al., 2014
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	150 mg/kg ^a 5 min antes da isquemia, 300 mg/kg ^b 5 min antes da isquemia, 150 mg/kg ^c 5 min antes da isquemia plus 150 mg/kg ^c 5 min antes da reperfusão	TBARS [#] níveis plasmáticos e tecidual	GSH [#] atividade tecidual	-	KALIMERIS et al., 2016

Carcinogênese Hepatocelular	<i>In vivo</i> (camundongo)	i.p.	100 mg/kg/d, 3 meses antes da indução	↓ EROs	-	-	LIN et al., 2013
	<i>In vivo</i> (camundongo)	Oral (água)	4 mg/mL, iniciando de 2 meses de idade antes da indução	↓ 4-HNE, MDA e 8-OXO-dG níveis tecidual	-	-	TIAN et al., 2015
Colestase	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (0.5% carboximetilcelulose)	300 mg/kg/d, 28 d após ligação do ducto biliar	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual; CAT [#] atividade tecidual	↓ TGF-β e IL-6 expressão tecidual; IL-10 [#] expressão tecidual	GALICIA-MORENO et al., 2012
Icterícia obstrutiva	<i>In vivo</i> (ratos)	s.c.	100 mg/kg/d, 5 d após indução	↓ MDA níveis teciduais; ↓ iNOS expressão tecidual	-	-	Çağlıkülekci et al., 2004
Insuficiência hepática aguda	<i>In vivo</i> (ratos)	s.c.	20 mg/kg, 3 e 6 h após CCl ₄	TBARS [#] níveis teciduais; ↓ proteínas carboniladas	-	-	RITTER et al., 2004
	<i>In vivo</i> (camundongos)	i.p.	1.2 g/kg ^a , imediatamente antes da indução e 1.2 g/kg ^b injetado 1 h após a indução	-	↑ GSH ^a níveis tecidual	↓ IL-5 ^a , IL-10 ^a , IL-12 ^a , IL-17 ^a e IFN-γ ^a níveis tecidual	BEMEUR et al., 2010
Esquistossomose	<i>In vivo</i> (camundongos)	Oral (água)	300 mg/kg, 5 d na sem/4 sem	-	↓ GSH níveis teciduais; GST [#] , GR [#] , GPx [#] e SOD [#] atividade tecidual	-	SEIF EL-DIN et al., 2011
Lipopolissacarídeo (LPS)	<i>In vivo</i> (ratos)	i.v	150 mg/kg/h (0.3 mL/h) em 60 min e 12.5 mg/kg/h durante todo o experimento (0.3 mL/h)	-	-	↓ TNF-α, IL-6, IL-10 níveis plasmáticos	HSU et al., 2006
ÁLCOOL							
Etanol	<i>In vivo</i> (camundongo)	i.p.	75 ^a , 150 ^b ou 300 ^c mg/kg/d, em 30 min antes do etanol; 75 ^d , 150 ^e ou 300 ^f mg/kg/d,	↓ TBARS ^{a,b,c} níveis teciduais; ↑ TBARS ^{c,f} níveis teciduais;	↑ GSH ^{a,b,c} níveis teciduais	↓ TNF-α mRNA ^{a,b,c} níveis teciduais	WANG et al., 2006

	at 4 h after ethanol						
	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	1.2 g/kg/d, 45 d	↓ MDA e HNE adutos tecidual CYP2E1 [#] expressão	ORAC [#] ; GSH [#] níveis tecidual	↓ TNF-α mRNA expressão tecidual	RONIS et al., 2005
	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	1.2 g/kg/d, por 130 d	-	-	IL-1β [#] , IL-2 [#] , IL-4 [#] , IL-6 [#] , TNF-α [#] níveis	SETSHEDI et al., 2011
	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (solução etanol)	2 g/L com etanol, 15 d após 30 d de etanol ^a , e 2 g/L sem etanol por 15 d após30 d de etanol ^b	-	↑ GSH/GSSG ^{a,b} níveis tecidual; ↑ GR ^b atividade tecidual	-	SEIVA et al., 2009
	<i>In vivo</i> (camundongos)	i.p.	300 mg/kg/d, 30 d	-	[#] -SH níveis teciduais; [#] GPx atividade tecidual	-	PIVETTA et al. 2006
	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	1.7 g/kg/d, 150 d	Proteínas carboniladas [#] níveis mitocondriais; TBARS [#] níveis mitocondriais; ↓ Proteínas carboniladas níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual	-	CARO et al., 2014
DROGAS							
Acetaminofeno (APAP)	<i>In vitro</i> (hepatócito)	-	20 mM (dissolvido em 10X PBS, pH 7.4) 1 ^a h antes ou 2 ^b h após administração de APAP	-	↑ GSH ^{a,b} níveis	-	BAJT et al., 2004
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	100 mg/kg/d, 5 d 24 h após indução	-	-	↓ TNF-α e IL-6 níveis teciduais	TASLIPINAR et al., 2013
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	2.4 mM/kg/(2 mL dose), 30 min antes da indução	↓ MDA níveis tecidual e sorológico	↑ GSH, GSSG, GSH/GSSG níveis tecidual e sorológicos;	-	ACHARYA; LAU-CAM, 2010

					↑ GR, GST atividade tecidual e sorológico		
	<i>In vivo</i> (camundongos)	i.p.	1.25 mmol/kg, 1 h após indução	MDA [#] , ↓ 4-HNE e proteínas carboniladas níveis tecidual	↑ GSH e GSSG níveis teciduais	-	TERNEUS et al., 2008
	<i>In vivo</i> (camundongos)	Gavagem	300 ^a , 400 ^b and 600 ^c mg/kg, for 24 h (co-administração APAP e NAC)	↓ MDA ^{a,b,c} níveis tecidual;	↑ GSH ^{a,b,c} níveis tecidual		OWUMI et al., 2015
	<i>In vitro</i> (hepatócito)	-	2.0 mM, 30 min após incubação com APAP	-	↑ GSH níveis, P-SH níveis	-	RAFEIRO et al., 1994
	<i>In vitro</i> (hepatócito)	-	5.0 mM, após 24 ^a and 48 ^b h de exposição de APAP	-	↑ GSH ^a níveis	-	MANOV et al., 2002
	<i>In vivo</i> (camundongos)	i.p.	400 mg/kg, 2 h após indução	-	↑ GSH níveis teciduais	-	AL-MUSTAFA et al., 1997
	<i>In vitro</i> (hepatócito humano)	-	250 μM, antes 12 ^a ou 24 ^b h	↓ TBARS ^{a,b} níveis; ↓ EROs ^{a,b} níveis	GSH ^a e GSH/GSSG ^{#,a} ; ↑ GSH/GSSG ^b ↑ GR ^{a,b} atividade	-	TOBWALA et al., 2015
Rifampicina	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	100 mg/kg/d, 3 sem	MDA [#] níveis; citocromo P450 2E1 [#] níveis teciduais	SOD [#] e CAT [#] atividades teciduais; GPx [#] atividade GST [#] atividade GR [#] atividade	-	RANA et al., 2006
Azatioprina	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	100 mg/kg/d, 7 d antes da indução	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual	-	RAZA et al., 2003
Cocaína	<i>In vitro</i> (hepatócitos)	-	0.5 mM, 24 h antes incubação com cocaína e 24 h após incubação	↓ Peróxido níveis	↑ GSH níveis ↑ CAT e GPx RNAm níveis	-	Zaragoza et al., 2000
N-metil-metildopamina	<i>In vitro</i> (hepatócito)	-	0.1 ^a e 1 ^b mM, 15 min antes da indução	-	GSH [#] níveis	-	CARVALHO et al., 2004

Ciclosporina A	<i>In vivo</i> (ratos)	i.m.	150 mg/kg/d, 11 d iniciando 1 d antes da indução	↓ MDA níveis teciduais; ↓ NO [•] níveis teciduais	↑ SOD atividade tecidual GPx [#]	-	KAYA et al., 2008
Isoniazida	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	100 mg/kg/d, 3 sem	CYP2E1 [#] níveis	SOD [#] e CAT [#] atividades tecidual; P-SH [#] níveis; GPx [#] e GR [#] atividades tecidual	-	ATTRI et al., 2001
Estatinas	<i>In vitro</i> (ratos)	-	200 μM	↓ TBARS níveis	-	-	ABDOLI et al., 2014
Metotrexato	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	50 mg/kg/d, 7 d	MDA [#] níveis tecidual	↑ SOD atividade tecidual; GSH [#] níveis tecidual; CAT [#] atividade tecidual; TAC [#]	-	AKBULUT et al., 2014
Carbamazepina	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	50 ^a , 100 ^b e 200 ^c mg/kg/d por 45 d	↓ TBARS ^c níveis tecidual	↑ SOD ^c e CAT ^c atividades tecidual; ↑ GSH ^c níveis tecidual	-	MAHESWARI et al., 2014
PESTICIDAS							
Malation	<i>In vivo</i> (rats)	Oral (água)	2 g/L, 28 d	↓ MDA níveis tecidual; ↓ MPO atividade tecidual	↑ GSH níveis tecidual; ↑ SOD, GPx e GST atividades tecidual ↓ CAT atividade tecidual	↓ IL-1β, IL-6, INF-γ, níveis mRNA	LASRAM et al., 2014
	<i>In vitro</i> (hepatócito)		200 μM, 30 min before exposure	↓ EROs	-	-	MOSTAFALOU et al., 2012
Paraquat	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	200 mg/kg 2 h antes do tratamento com paraquat (duas vezes por semana, durante as seis semanas)	↓ MDA níveis tecidual; ↓ iNOS expressão tecidual; ↓ NO ²⁻ níveis teciduais; ↓ CYP2E1 atividade tecidual;	↑ GSH níveis tecidual ↓ SOD níveis tecidual ↑ GR níveis tecidual ↓ GPx nível tecidual	↓ TNF-α expressão tecidual ↓ IL-1β expressão tecidual	AHMAD et al., 2013

Diclorodifeniltricloroeta no (DDT)	<i>In vitro</i> (hepatócito)	-	100 mg/mL, 1 h antes da exposição	EROs [#]	-	-	TONDER et al., 2014
Carbosulfan	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (água)	2 g/L por 30 d	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH nível tecidual	↓ IFN- γ mRNA expressão	DHOUIB et al., 2015
RADIAÇÃO IONIZANTE							
X-Rays	<i>In vivo</i> (camundongo)	i.p.	50 ^a mg/kg/d, 100 ^b mg/kg/d or 200 ^c mg/kg/d, 1 h antes ou após exposição ao X-ray irradiação	↓ MDA ^{a,b,c} níveis tecidual; ↓ DNA ^{a,b,c,*} dano tecidual	↑ GSH ^{a,b,c} nível tecidual 1h antes; ↑ GSH ^{b,c} nível tecidual após exposição; ↑ SOD ^{a,b,c,*} atividade tecidual	-	YAMAGUCHI et al., 2007
γ-Rays	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p	1 g/kg/d, 7 d antes da exposição a irradiação γ -ray	↓ MDA níveis tecidual; ↓ DNA dano tecidual; (NO(x)) [#]	↑ GSH níveis tecidual; ↑ GSH-Px atividade tecidual; ↑ SOD atividade tecidual	-	MANSOUR et al., 2008
OUTROS							
Toxicidade por mercúrio	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	0.6 mg/kg/d, 3 d após indução	↓ MDA níveis tecidual	↑ SOD e CAT atividade tecidual; ↑ GSH níveis tecidual	-	JOSHI et al., 2014
Tetracloreto de carbono	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	150 mg/kg/d, por 3 meses	↓ TBARS níveis tecidual e plasmático; ↓ HP níveis tecidual e plasmático	↑ SOD e CAT atividade tecidual; ↑ GPx atividade tecidual; ↑ GSH níveis plasmáticos; ↑ Vitamin C e vitamin E níveis plasmáticos	-	KAMALAKKANNAN et al., 2005.
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	25 ^a mg/kg/d e 50 ^b mg/kg/d, 12 sem	↓ LP ^{a,b} níveis teciduais	↑ GPx ^{a,b} atividade tecidual	↓ CYP2E1 ^{a,b} atividade tecidual	NISSAR et al., 2013

					↑ GSH ^{a,b} atividade tecidual		
					↑ CAT ^{a,b} atividade tecidual		
	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	50 ^a ; 100 ^b ; 200 ^c mg/kg/d, 4 sem	↓ MDA ^{b,c} níveis tecidual	↑ SOD ^{a,b,c} atividade tecidual;		CAI et al., 2015
					↑ GSH ^{a,b,c} níveis tecidual		
Cádmio (Cd)	<i>In vitro</i> (ratos)	-	5 mM, 2 h pre-, simultaneous or 2 h post-treatment	-	↑ GR níveis	-	ODEWUMI et al., 2011
					↑ CAT níveis		
					GPx [#] níveis		
	<i>In vitro</i> (ratos)	-	2 mM, 1.5 h, adicionados simultaneamente com o Cd	↓ EROS	-	-	WANG et al., 2014
Ácido glicochenodeoxicólico (GCDCA)	<i>In vitro</i> (ratos) Células HepG2	-	0.5 mM, co-administered with GCDCA	↓ O ₂ · ⁻ production; ↓ NO levels	-	-	GONZALEZ-RUBIO et al., 2010
Metanol	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	150 mg/kg, duas doses, após 12 h e 24 h	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual		SKRZYDLEWSK A;
					↑ GSSG níveis tecidual	-	FARBISZEWSKI, 1999
					↑ GPx atividade tecidual		
Fluoreto	<i>In vitro</i> (rats) cultura	-	1 mmol/L, 60 ^a min antes e 60 ^b min simultaneamente com fluoreto	↓ MDA ^a níveis tecidual	↑ GPx ^a níveis tecidual	-	PAWLOWSKA-GORAL et al., 2013
					↑ GR ^a níveis tecidual		
iNOS	<i>In vivo</i> (ratos)	s.c.	100 mg/kg, 5 d	↓ MDA níveis tecidual; ↓ iNOS expressão tecidual	-	-	Çağlıküleki et al., 2004
Dimetilnitrosamina	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	50 mg/kg/d, 7 d	↓ MDA níveis tecidual	↑ SOD atividade tecidual;		SATHISH et al., 2011
					↑ Vitamin C níveis tecidual;	-	
					↑ Vitamin E nível		

					tecidual; ↑ GPx atividade tecidual; ↑ GSH níveis tecidual; ↑ CAT atividade tecidual; ↑ GST atividade tecidual		
Arsênico	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	10 mg/kg/d, por 3 sem	TBARS [#] níveis tecidual	CAT [#] atividade tecidual GSH [#] níveis tecidual	-	MODI et al., 2006
Mercurio cloreto	<i>In vitro</i> (camundongos)	-	10 ^a – 500 ^b µM	↓ MDA ^b níveis	-	-	BRANDAO; NOGUEIRA, 2011
Bifenilos policlorados	<i>In vivo</i> (ratos)	Oral (dieta)	1% (10g/kg dieta) uma sem. antes da indução	CYP1A1 [#] atividade	↓ GSSG/GSH; GST [#] atividade tecidual	-	LAI et al., 2012
Isoflurano anestesia	Humano	i.v.	12.5 mg/kg/h, durante toda a operação (surirgia laparoscópica)	↑MDA níveis plasmáticas	↑ GST níveis plasmáticos; ↑ GSH níveis plasmáticos	-	BEYAZ et al., 2011
Circulação cardiopulmonar	<i>In vivo</i> (ratos)	-	250 mg/kg, em 0.5, 1, 2, 3, e 24 h	↓ MDA níveis tecidual ↓ MPO níveis tecidual ↓ iNOS níveis tecidual	↑ GSSG níveis tecidual ↑ GSH níveis tecidual ↑ GPx atividade tecidual	-	HUANG et al., 2011
	<i>In vivo</i> (ratos)	Gavagem	250 mg/kg/d, 21 d	↓ MDA níveis tecidual	↑ GSH níveis tecidual; ↑ GST atividade tecidual	-	ALTINOZ et al., 2015
Acetilamida (ACR)	<i>In vivo</i> (ratos)	i.p.	200mg/kg/d, por 2 sem	↓ COX-2 mRNA expressão	-	↓ NF-κB mRNA expressão; ↑ IκB-α mRNA expressão	WANG et al., 2016

Legenda: ^{a, b, c, d, e} = diferentes tratamentos; * = Grupo que apresentou ação mais benéfica; - = não avaliado; [#] = não houve diferença significativa quando comparado com o controle positivo; ↑ = aumentou; ↓ = diminuiu; p.c.: peso corporal; CP4502E1: citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídio 1; CAT: catalase; d: dias; GR: glutathione redutase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSH/GSSG: razão glutathione reduzida/glutathione oxidada; GST: glutathione S-transferase; h: horas; HNE: hidroxinonanal; HP: hidróperóxido; i.v.: intravascular; i.p.: intraperitoneal; i.m.: intramuscular; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; IL: interleucina; INF-γ: interferon gamma; kg = kilograma; LP: peróxido lipídico; MPO: mieloperoxidase; mRNA: RNA mensageiro; mtDNA: DNA mitocondrial; MDA: malondialdeído; MnSOD: superóxido dismutase/manganês; min: minuto; NASH: esteatohepatite

não alcoólica; (NO(x)): nitrato total/nitrito; NF- κ B: fator nuclear κ B; ng = nanograma; NO: óxido nítrico; ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio; P-SH: proteína com grupo sulfidril; protCo: proteína carbonilada; PBS: tampão fosfato salino; Ref: referência; EROs: espécies reativas de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; sem: semana; s.c.: subcutaneamente; TAC: capacidade antioxidante total; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TGF β 1: fator de crescimento transformador β 1; vs.: *versus* ; 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

4.3.3. Esteatohepatite não-alcoólica

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma das doenças hepáticas crônicas mais comuns em todo o mundo (WILLIAMS et al., 2011). A DHGNA refere-se a um espectro patológico clínico de condições que vão desde a esteatose simples (fígado gorduroso) até a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), envolvendo inflamação, danos nas células do fígado e, em alguns casos, cirrose e HCC (ADAMS; LINDOR, 2007). Estima-se que a DHGNA afeta 20% -30% da população geral e 70% -90% de pacientes obesos ou diabéticos (VERNON et al., 2011).

A patogênese da DHGNA, especialmente a EHNA, é multifatorial e inclui alterações do metabolismo lipídico, resistência à insulina (IR), aumento da inflamação, EO e produção de produtos de glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGEs) (MEDEIROS; LIMA, 2015; SANTOS et al., 2013; SERVIDDIO et al., 2013).

O papel da inflamação e EO na patogênese da DHGNA pode ser confirmado pela teoria de "dois hit" por Day et al. (1998). De acordo com essa teoria, citado por Santos et al. (2013), o primeiro hit diz respeito à acumulação de triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres (AGL) nos hepatócitos, causada pelo aumento da IR, aumento do influxo alimentar e aumento da lipogênese hepática; enquanto que o segundo está relacionado à peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e inflamação, que resultam em danos aos hepatócitos e desenvolvimento de fibrose hepática (DAY; JAMES, 1998).

ERONs têm a função de ativar e inibir as vias de sinalização que podem modular o metabolismo de lipídios, especialmente a progressão da esteatohepatite, causada pelo aumento de adipocinas e ativação do sistema imunológico (SERVIDDIO et al., 2013). Outro ponto importante é que as EROs podem induzir vias de sinalização que podem desencadear IR (HOUSTIS et al., 2006).

Os pacientes com DHGNA/EHNA apresentam diversas alterações nos marcadores redox e inflamatórios, como o aumento da proteína C reativa de alta sensibilidade (hsPCR) (RIFAI et al., 2015); AGE (OZENIRLER et al., 2014), que pode resultar de uma variedade de reações (via direta) ou por mecanismo que envolve a oxidação de lipídios mediada por radicais hidroxil (forma indireta) (SAYRE et al., 2006); e aumento de MDA (FARHANGI et al., 2014). Além disso, a diminuição da TAS (HOROSZ et al., 2005) e SOD também foram observados (KORUK et al., 2004).

É possível que a EHNA possa ocorrer na ausência de esteatose simples, pois a inflamação relacionada à patogênese da EHNA pode se originar na microbiota intestinal, em

resposta à infiltração de neutrófilos atraídos por quimiocinas, bem como presença de macrófagos, tecido adiposo inflamado e células inflamatórias circulantes (ATHYROS et al., 2015). A inflamação hepática pode resultar de EROs via CYP2E1 (LINHART et al., 2015). Esta enzima tem sua expressão aumentada em EHNA, podendo elevar significativamente os níveis de EROs (SANTOS et al., 2013).

Conforme mencionado acima, os hepatócitos estão equipados com múltiplos sistemas de defesa, permitindo uma proteção contra processos oxidativos (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2005). Nesta revisão, foram encontrados 3 artigos sobre NAC e DHGNA/EHNA e todos em modelos animais.

Samuhasaneeto et al. (2001) (Tabela 2) observaram que ratos, em um modelo de EHNA induzido por dieta com alto teor de gordura (*high fat diet* - HFD), e que receberam NAC (500 mg/kg/dia), por via oral, não apresentaram melhora nos níveis de GSH total e MDA hepático de em relação ao grupo que recebeu apenas dieta indutora da EHNA.

Em outro modelo animal, induzindo EHNA por HFD via nutrição enteral, Baumgardner et al. (2008) (Tabela 2), utilizando NAC (2 g/kg/dia), demonstraram que este antioxidante diminuiu os níveis de MDA, mas não conseguiu bloquear o desenvolvimento da esteatose. Thong-Ngam et al. (2007) (Tabela 2), ao estudar a EHNA induzida pela dieta (dieta 100% de gordura), concluiu que a GSH no grupo EHNA + NAC (20 mg/kg/dia, por 6 semanas) foi significativamente menor do que no grupo EHNA.

O fígado está mais exposto à hiperinsulinemia do que qualquer outro tecido, porque a insulina é transportada através da veia porta (LEI et al., 2012). Esteatose e EHNA estão presentes em 95% e 20% dos pacientes obesos, respectivamente (BHOGAL et al., 2010).

Diniz et al. (2006) (Tabela 2) examinou se a dieta rica em sacarose (SRD) induziu hiperglicemia, dislipidemia e EO em ratos. Observou-se que a administração oral de 2 mg de NAC/L/dia em água, por 30 dias, diminuiu os níveis hepáticos de hidroperóxido lipídico (LOOH) e aumentou a capacidade antioxidante do fígado, através do aumento dos níveis hepáticos de GSH e SOD e GPx, aumentando assim a capacidade redutora e inibindo a alteração do LOOH no tecido hepático em ratos. NAC, devido à sua atividade antioxidante, inibe o deslocamento metabólico e induz efeitos benéficos sobre a obesidade. De acordo com este estudo, a administração de NAC em alimentos pode ser viável e benéfica. Estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos de ação da NAC na obesidade, visando sua prescrição como um medicamento para atenuar os efeitos nocivos da obesidade.

O diabetes tipo 1 (T1DM) e o diabetes tipo 2 (DM2) estão associados a um risco aumentado de lesão hepática crônica, incluindo o DHGNA (KIM et al., 2009). A NAC foi

testada em um modelo animal de T1DM induzido por estreptozotocina, uma vez que a diminuição de GSH pode ter um papel importante no desenvolvimento de complicações diabéticas, ocorrendo na diabetes precoce. A administração de 1,5 g de NAC/kg/dia, via gavagem, durante 4 semanas após a indução de diabetes, aumentou a atividade antioxidante total, no tecido, e a atividade da SOD. Deste modo, a NAC pode conferir proteção contra o EO restaurando ou aumentando a atividade da enzima SOD (Tabela 2).

Já, Ribeiro et al. (2011) (Tabela 2) avaliando os efeitos de 25 mg de NAC/kg/dia e 75 mg de NAC/kg/dia, durante 30 dias, administrados i.p., na diminuição da lesão do tecido oxidativo no fígado de ratos diabéticos induzidos por aloxano, observou que NAC, ambas as dosagens, diminuiu os níveis de MDA e não teve efeito sobre as atividades de GPx e SOD, embora tenha aumentado os níveis de GSH no tecido, mas apenas com a dose de 75 mg de NAC/kg, sugerindo que a NAC poderia ser utilizada para diminuir os níveis de MDA mediado pela GSH.

Todos estes resultados em conjunto estimulam novas pesquisas sobre NAC e DHGNA, em modelos animais e em seres humanos.

1. 4.3.4. Lipopolissacarídeos

O LPS é um protótipo de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que está presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (COMPARE et al.; 2012; EDWARDS; WANLESS, 2013), e tem sido relatados por exercer respostas inflamatórias, fibrose e dano hepatocelular (TRIVEDI; JENA, 2013). Em condições, tais como um aumento da permeabilidade intestinal associada à disbiose (JIANG et al., 2015), e colite ulcerativa (TRIVEDI; JENA, 2013), há o transporte de LPS do intestino para os tecidos alvo, também conhecido como translocação bacteriana (COMPARE et al., 2012).

Como o fígado é um órgão estreitamente ligado ao intestino através da veia porta, torna-se o alvo direto de uma inflamação intestinal, resultando na indução e progressão da lesão hepática (CESARO et al., 2011; TRIVEDI; JENA, 2013). Sugere-se que a endotoxemia seja responsável pela iniciação do dano hepático através da interação da endotoxina com receptores Toll-like (TLR) (CESARO et al., 2011; HENAO-MEJIA et al., 2013). Os TLR compreendem uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRPs), que reconhecem componentes bacterianos, virais e fúngicos. Destes, TLR4 tem um papel central na ativação de células de Kupffer, respondendo a LPS (BAFFY, 2009).

Um efeito importante do reconhecimento de LPS por TLR4 é a ativação de NF- κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (KOPPE et al., 2014), tais como TNF-

α , que por sua vez, leva ao desenvolvimento de esteatose hepática (HENAO-MEJIA et al., 2013; SOURIANARAYANANE et al., 2013), por modulação da proteína de ligação do elemento regulador de esterol (SREBP), sendo a SREBP-1c a forma principal expressa no fígado. Estas proteínas são uma família de fatores de transcrição ligados à membrana, que ativam genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lipídios (CARTER-KENT et al., 2008).

No estudo de Hsu et al. (2006), ao induzir um choque de endotoxemia em ratos *Wistar-Kyoto*, através da administração de 10 mg de LPS/kg por uma infusão intravenosa lenta, o pós-tratamento com NAC, por via intravenosa, a uma taxa de 150 mg/kg/h (0,3 mL/h), em 60 min e 12,5 mg/kg/h durante todo o experimento (0,3 mL/h), diminuiu significativamente os níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e de IL-10 após a administração de LPS, mostrando que a NAC modula os eventos de sinalização de LPS. Como consequência, o pós-tratamento com NAC pode exercer ações benéficas contra a lesão de órgãos induzida pelo LPS, tal como o fígado, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, estudos ainda são necessários para avaliar o papel antioxidante e anti-inflamatório da NAC nos danos hepáticos causados pela translocação bacteriana, como o desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose intestinal) e colite ulcerativa, para entender o mecanismo de ação da NAC sobre o fígado na endotoxemia e assim estabelecer uma terapia segura.

2.

3. 4.3.5. Intoxicação

4. Lesão Hepática Induzida por Drogas

O efeito hepatotóxico de algumas drogas terapêuticas é amplamente reconhecido como um problema de saúde (MARÍ et al., 2010; CHEN et al., 2015). A maioria dos casos de lesão hepática induzida por drogas (*drug induced liver injury* - DILI) ocorre através de um reconhecimento tardio da hepatotoxicidade induzida pelo fármaco (ABDOLI et al., 2014; AU et al., 2013). DILI pode também assemelhar-se ao conjunto completo de doenças agudas ou crônicas do fígado, como hepatite e colestase (YUAN, L., KAPLOWITZ, 2013). A incidência de DILI na população geral é de cerca de 14-19/100.000 habitantes (BJORNSSON et al., 2013; SGRO et al., 2002). As propriedades do fármaco e os fatores do hospedeiro têm um papel importante no desenvolvimento da DILI (AMIRANA; BABBY, 2015; YUAN, L., KAPLOWITZ, 2013).

No caso das propriedades das drogas, os fatores que levam a lesões incluem ultrapassar uma dose limiar, características físico-químicas, formação de metabólitos reativos,

EO, depleção de antioxidantes e interferência na respiração mitocondrial (CHEN et al., 2015; TAN et al., 2015). O EO gerado em DILI pode ser devido ao estresse citosólico durante o metabolismo do fármaco e/ou resposta subsequente por células hepáticas lesadas (CHEN et al., 2015). O melhor exemplo de DILI é representado por acetaminofeno (APAP) (MARÍ et al., 2010; TAN et al., 2015). O EO gerado por este fármaco é reconhecido por formar N-acetil- *p* -benzoquinona imina (NAPQI) pelo citocromo P450, um metabolito tóxico que mostra capacidade oxidativa através de ataque e modificação covalente de proteínas (MARÍ et al., 2010), bem como a redução da razão GSH/GSSG por oxidação do grupo tiol de GSH (ACHARYA; LAU-CAM, 2010). Além disso, a APAP causa hepatotoxicidade através da geração de ERONs, e produtos da reação de peroxidação (ACHARYA; LAU-CAM, 2010).

A toxicidade do fármaco também pode induzir uma resposta inflamatória através da produção de citocinas por KCs e neutrófilos, tais como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-1 α e IFN- γ que modulam eventos intracelulares (TASLIPINAR et al., 2013). Estas citocinas sensibilizam os hepatócitos ao estresse bioquímico, ou regulam a lesão celular mediada por imunidade adaptativa. Além disso, os adutos de fármaco-proteína são apresentados como um antígeno, desencadeando a resposta imune adaptativa por ligação a receptores das células T CD4⁺, conduzindo à ativação de células T citotóxicas CD8⁺ (YUAN, L., KAPLOWITZ, 2013).

A NAC é um antídoto contra a hepatotoxicidade causada pela overdose de APAP, na prática clínica. Existem muitos estudos relatando os papéis da NAC na APAP indutora da lesão hepática. Segundo o estudo de Taslipinar et al. (2013) (Tabela 2) que avaliou os efeitos hepatoprotetores da NAC em uma overdose de APAP produzindo necrose hepatocelular centrolobular em ratos, observou-se que doses de 100 mg/kg/dia, i.p. durante 5 dias, reduziu significativamente o TNF- α e a IL-6 hepáticos. Estas citocinas foram liberadas na lesão hepática induzida por APAP e foram responsáveis por danos no fígado. Com base nestes resultados, a NAC mostrou efeitos hepatoprotetores. No trabalho de Acharya et al. (2010) (Tabela 2), a NAC aumentou os níveis hepáticos e séricos de GSH e a razão GSH/GSSG e as atividades hepáticas e séricas de GR e GST, e diminuiu os níveis séricos e hepáticos de MDA. A NAPQI é capaz de diminuir a razão GSH/GSSG através da oxidação do grupo tiol de GSH e também pode conduzir à formação de ligações dissulfeto, em ligações cruzadas de proteínas e dissulfetos mistos de proteína-GSH por oxidação de grupos Cys em proteínas. A diminuição da GSH intra-hepática associada à APAP é acompanhada por uma redução nas atividades das enzimas antioxidantes GR, CAT, GPx e SOD-glutamilcisteinil sintetase (GCS). NAC administrada como uma dose única, 0,783 mg/kg/(2 mL), 30 min antes da administração

de APAP, neste estudo, promoveu ações de proteção contra as ações tóxicas de APAP no fígado (Tabela 2).

Foi relatado que o agente imunossupressor ciclosporina A (CsA) exerce efeitos hepatotóxicos mensuráveis, por estimulação da formação de EROs e depleção da defesa antioxidante hepática. No trabalho de Kaya et al. (2008) (Tabela 2) foram investigados os efeitos do tratamento da NAC sobre o dano hepático induzido por CsA em ratos numa dose de 150 mg/kg/dia, i.m., durante 11 dias, começando um dia antes da indução, e foi observada uma diminuição dos níveis hepáticos de NO[•] e MDA, assim como um aumento da atividade hepática da SOD. Verificou-se que a peroxidação lipídica da membrana, um mecanismo de morte celular, foi aumentada por CsA. O tratamento com NAC protegeu contra a toxicidade causada pela administração de CsA, através da sua ação antioxidante e eliminação de radicais.

Pesticidas

Muitos pesticidas são tóxicos para os mamíferos uma vez que não são totalmente seletivos para o organismo alvo. A exposição crônica a pesticidas pode levar a várias condições patológicas, incluindo danos ao fígado (AHMAD et al., 2013; BAVECO, ROSS; 1996). Os pesticidas organofosforados (OPS) são os inseticidas mais utilizados no mundo, e geralmente são os mais tóxicos de todos os pesticidas para os vertebrados. Os pesticidas podem afetar a saúde humana de muitas maneiras, como a aplicação de agrotóxicos agrícolas, na produção de alimentos e o abastecimento de água (OJHA et al., 2013).

OPS, tais como malation, induzem hepatotoxicidade, EO e inflamação do fígado com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. A estrutura e função do fígado são afetadas pelas lesões patológicas causadas pelo malation, levando à hepatoesteatose. Ele induz uma alta produção de EROs no fígado quando metabolizado para malaonoxon através de sulfuração oxidativa. Foram notificadas alterações necróticas. Hepatomegalia também tem sido relatado, possivelmente devido à intensidade dos danos ou acumulação de colágeno. Todas essas descobertas estão relacionadas ao EO (LASRAM et al., 2014). A toxicidade em hepatócitos isolados com aumento da produção de MDA e o esgotamento da atividade de GSH foram induzidas pela administração de triclorfona e diclorvos (ambos OPS) (YAMANO; MORITA, 1992). A OPS também demonstra propriedades genotóxicas e alquilantes no fígado. Pode induzir a apoptose através da diminuição da energia mitocondrial, da indução de enzimas proteolíticas e da fragmentação do DNA (HASSAN et al., 1991; NUMAN et al., 1990).

Existem poucos estudos na literatura avaliando o efeito da NAC contra os danos hepáticos causados por agrotóxicos através da EO. No entanto, nestes casos, demonstrou-se que a NAC atenuou o nível de marcadores de hepatotoxicidade (incluindo o teor de LP e nitrito) induzido pelo paraquat (um herbicida de bipyridina amplamente utilizado) e maneb (um fungicida de ditiocarbamato) via EO (AHMAD et al., 2013) (Tabela 2). Além disso, a NAC restaurou a atividade enzimática do fígado e atenuou os marcadores do EO em lesões hepáticas induzidas por malation (LASRAM et al., 2014) (Tabela 2) e impediu a formação de EROs nas células tratadas com 1 mM de malation (MOSTAFALOU et al., 2012) (Tabela 2).

Estes dados são promissores, no entanto mais estudos são necessários para permitir a aplicação da NAC no tratamento de danos hepáticos induzidos por pesticidas.

Toxinas e Produtos Químicos Diversos

O contato com toxinas ou produtos químicos como tetracloreto de carbono (CCl_4) ou metais em seres humanos não é tão comum e normalmente acontece na indústria durante a produção e em locais onde esses produtos químicos são frequentemente usados (MORMONE et al. 2011).

A maioria dos metais lançados na atmosfera por indústrias são tóxicos e bioacumuláveis. Como exemplos, os metais pesados como o cádmio (Cd), o arsênio (As) e o mercúrio (Hg), disseminados no ambiente, desde o início da Revolução Industrial até os dias atuais, levam a danos nos tecidos por espécies geradas por reações com esses metais. O tipo e o agravamento deste dano dependerá da quantidade e tempo de exposição a estes metais (JOSHI et al., 2014).

Resultados do trabalho de Joshi et al. (2014) (Tabela 2) mostraram que a NAC protege contra a toxicidade por Hg avaliada pela redução dos teores hepáticos de MDA e aumento das atividades da SOD e CAT nos tecidos hepáticos e níveis de GSH, prevenindo a degradação oxidativa das membranas biológicas. NAC protege as células da toxicidade induzida por Cd, por sequestro de radicais livres (WANG et al., 2014) (Tabela 2) ou aumentando os níveis de enzimas antioxidantes, como pode ser visto em alguns trabalhos (ODEWUMI et al., 2011) (Tabela 2). Estudos *in vivo* são necessários para avaliar o papel antioxidante da NAC e assim, juntamente com ensaios clínicos, gerarem mais segurança na sua recomendação como um fármaco protetor contra danos induzidos por Cd no fígado.

O CCl_4 é ativado pelo citocromo CYP2E1 para formar o radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$) e reage com várias macromoléculas interferindo negativamente no metabolismo

celular tal como o lípido, conduzindo a esteatose hepática (DALTON et al., 2009). A NAC mostrou um efeito protetor na hepatotoxicidade induzida por CCl₄ em ratos, através da redução dos níveis plasmáticos e teciduais de TBARS e no aumento das defesas antioxidantes SOD, CAT e GPx e nos níveis de GSH, vitamina C e vitamina E encontrados diminuídos com a administração de CCl₄ (KAMALAKKANNAN et al., 2005). Depleção dos níveis de vitamina C e vitamina E pode indicar aumento do EO e geração de EROs na lesão hepática induzida por CCl₄. Resultados semelhantes foram encontrados por Nissar et al. (2013) (Tabela 2) onde, além de aumentar as defesas antioxidantes, avaliaram o efeito anti-inflamatório da NAC, demonstrando que ela causou uma diminuição na atividade do CYP2E1 no tecido hepático. Em caso de intoxicação crônica por CCl₄, os níveis hepáticos de CYP2E1 são significativamente aumentados. O aumento do EO resulta da formação de metabólitos reativos devido à biotransformação pelo CYP2E1. EROs leva a peroxidação lipídica, desencadeando uma cascata de reações intensificando o EO. O tratamento da NAC mostrou uma diminuição significativa nos níveis de LP, mostrando um efeito da NAC na intoxicação por CCl₄.

4.3.6. Isquemia/Reperusão

Lesão por isquemia-reperusão (I/R), uma condição caracterizada pela ausência de sangue em uma região do órgão com consequente ausência de nutrientes e oxigênio (MURIEL, 2009), levando a dano hepático. Este processo ocorre em algumas situações, como durante a cirurgia, como na ressecção hepática e transplante hepático, e em algumas doenças, como hepatite isquêmica e falência de múltiplos órgãos (DOMENICALI et al., 2005). Quando a oxigenação e o fluxo sanguíneo são restaurados, o dano causado durante o período de isquemia se intensifica, agravando a lesão produzida no nível celular (MONTALVO-JAVE et al., 2008; SERRACINO-INGLOTT et al., 2001). I/R está associado com o aumento do EO e a disfunção mitocondrial (DIESEN; KUO, 2011). As EROs são geradas inicialmente durante a reperusão e levam a lesões graves nos tecidos. O estresse do RE medeia a lesão hepática durante a I/R, e a EROs pode desencadear o estresse do RE *in vivo* e *in vitro* (SUN et al., 2014). Além disso, as EROs produzidos durante a I/R podem estimular a apoptose, a principal causa de morte celular, associada a uma via dependente de caspase (FUKUDA et al., 2007).

O último passo da lesão por I/R é iniciado por proteases mediadas por neutrófilos, TNF- α e IL-1 β . Além disso, existem distúrbios microcirculatórios, formação de xantina oxidase, estimulação de NADPH oxidase por KCs ativados e neutrófilos (DIESEN; KUO,

2011; KIREEV et al., 2013). I/R também causa dano hepático por indução de ERNs. A formação de NO^{*} por iNOS pode levar a danos induzidos por peroxinitrito e também gerar a lesão celular através da inibição direta de enzimas mitocondriais da cadeia respiratória (GLANTZOUNIS et al., 2006; MURIEL, 2009). Isquemia estimula KCs, que são as células centrais responsáveis pela libertação de EROs durante o período de reperfusão (MURIEL, 2009).

Sun et al. (2014) (Tabela 2) avaliaram os efeitos da NAC no estresse do RE e na lesão tecidual durante I/R. Utilizando uma dose de 300 mg NAC/kg/dia, 2 h antes da isquemia em camundongos via i.p., foi observada uma diminuição de MDA e um aumento dos níveis de GSH no tecido hepático. Além disso, Fernández et al. (2013) (Tabela 2) observou que a administração de 1 g de NAC/kg/dia, via i.p., a cada segundo dia durante um período de 10 dias em ratos, atenuou a carbonilação de proteínas nos tecidos hepáticos e aumentou os níveis de GSH. Em adição, Sener et al. (2003) (Tabela 2) avaliaram uma dose de 150 mg NAC/kg, durante 15 min antes da isquemia via i.p., em ratos *Wistar* e observaram que a NAC causou a diminuição dos níveis de MDA no tecido hepático, oxidação de proteínas tecidual e a atividade da mieloperoxidase hepática (MPO) que foram aumentadas por I/R, e o aumentou os níveis de GSH tecidual.

Estes achados mostram que a NAC desempenha um papel protetor no fígado lesionado pela I/R e pode ser um possível agente terapêutico na I/R hepática.

5. 4.3.7. Carcinoma Hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o quinto câncer mais comum no mundo. É causado por uma transformação maligna de hepatócitos, o principal tipo celular no fígado, e representa 80% a 90% do câncer primário do fígado (JIANG et al., 2015). HCC pode ocorrer em pacientes com HBV (DUYGU et al., 2012), álcool (BORRO et al., 2015), EHNA (LINHART et al., 2015) e principalmente HCV (MIURA et al., 2008). Muitos passos associados à inflamação crônica estão envolvidos na patogênese do hepatocarcinoma (TAKAKI; YAMAMOTO, 2015). Entre estes processos, destaca-se o EO, contribuindo para o avanço do estado clínico da doença através do encurtamento dos telômeros nos hepatócitos e o aumento das características malignas do HCC, tais como elevada atividade proliferativa e resistência apoptótica por ativação da telomerase em células cancerosas (NISHIKAWA et al., 2009).

Deste modo, o EO pode desempenhar um papel importante em algumas cascatas de sinalização intracelular, tais como a oxidação de DNA com a geração de moléculas de DNA modificadas como 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-OXOdG) que tem um efeito

mutagênico em células de mamíferos, podendo, portanto, ser considerado cancerígeno (VALAVANIDIS et al., 2009). EO também têm uma ação na sinalização celular, especialmente com fatores de crescimento, citocinas tais como TNF- α e IL-1 β , fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 e regulação da metaloproteinase de matriz 1 (MMP1), uma protease que tem a capacidade de destruir o tecido conjuntivo. Todos eles aumentam o EO com geração de ERONS e/ou são estimulados por EO, e conseqüentemente aumentam a apoptose e, finalmente, causam carcinogênese (ROESSNER et al., 2008). Além do EO, a inflamação foi mostrada em estudos de modelos animais de HCC quimicamente induzido.

Lin et al. (2013) estudando HCC em camundongos deficientes em receptores do tipo toll-like 2 (TLR2), observou que EROs/estresse RE é diretamente responsável pelo agravamento da carcinogênese hepática, e NAC atenuou significativamente esses efeitos (Tabela 2). Outra descoberta importante desses autores foi que o tratamento com a NAC interrompe o *feedback* positivo da inflamação induzida pela resposta a proteína desdobrada (UPR) do estresse RE e apoiou a deficiência de TLR2 que aumenta a suscetibilidade do desenvolvimento e progressão de HCC. Os autores concluíram que EO no RE está intimamente envolvido no desenvolvimento de HCC e NAC é capaz de evitá-lo (ROESSNER et al., 2008).

Este antioxidante não foi estudado em indivíduos com HCC, mas foi testado em outros tipos de câncer, como cabeça e pescoço (YOO et al., 2014) e colon (LIN et al., 2006). No entanto, os resultados não são conclusivos. Combinado a isso, o uso de antioxidantes durante o tratamento do câncer ainda é controverso na comunidade científica (GORRINI et al., 2013).

Todos os resultados juntos sugerem que mais estudos sobre a quimioprevenção da NAC em HCC são necessários, primeiro em diferentes modelos induzidos por HCC e depois em humanos.

5. Comentários Conclusivos

Com base na discussão acima e nos resultados listados na Tabela 2, várias observações podem ser escritas, o que pode levar a alguma racionalização ou desenho de novos estudos, desafios e perspectivas na utilização de NAC em doenças baseadas em EO.

5.1. Tipos de Estudo

Os modelos *in vivo* (ratos e camundongos) foram amplamente utilizados em estudos experimentais devido à sua prolificidade, fácil manejo e manutenção, biologia conhecida e

genoma, sendo menos dispendiosos. Estas qualidades, juntamente com a similaridade dos resultados para os seres humanos, apoiam o uso destas espécies como bons modelos animais para experimentação. No entanto, é importante ter uma compreensão profunda da biologia da espécie, porque, desta forma, você pode projetar os melhores objetivos e o protocolo experimental mais adequado, tornando esses modelos animais, experimentalmente confiáveis.

Apesar da limitação no número de variáveis experimentais, os estudos *in vitro* são mais simples e mais rápidos do que os testes *in vivo* e podem servir como um estudo preliminar. Portanto, eles são amplamente utilizados em estudos toxicológicos e, nesta revisão, estudos *in vitro* têm investigado a ação da NAC sobre os danos causados por toxinas, pesticidas e drogas. Nestes casos, o uso de NAC mostrou resultados muito favoráveis na redução dos níveis de marcadores relacionados à geração de EROs e nos danos e aumento da defesa no fígado. No entanto, estes estudos também devem levar em consideração, marcadores de inflamação, uma vez que eles estão relacionados com EO. Estes resultados sugerem que a NAC é um bom antídoto para tal envenenamento e radiação em modelos animais (Tabela 2).

Embora as experiências *in vitro* indiquem habilidades antioxidantes relevantes para a NAC, é questionável se os métodos subestimam a capacidade antioxidante fisiológica. Antes de um uso sistemático, vários estudos ainda são necessários para avaliar a bioatividade de NAC em lesão hepática, principalmente em animais e seres humanos.

5.2. Doses, Via de Administração e Tempo de Estudo

O uso da NAC é atrativo devido à sua ampla disponibilidade, facilidade de administração e baixo custo. Nesta Revisão foram utilizadas várias doses (de cerca de 0,204 g/kg/dia até 2 g/kg/dia de doses totais em estudos *in vivo*) e vias de administração (Tabela 2). A via intraperitoneal foi a mais utilizada nestes estudos (Figura 5). O fornecimento de substâncias em animais para estudos é frequentemente um componente sério do projeto experimental. Portanto, algumas informações são obrigatórias para a administração de substâncias em animais. Este é um procedimento geral. Os parâmetros ADMES (absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância), juntamente com a via, o volume, a frequência de administração, a duração do tratamento, o pH, a estabilidade, a homogeneidade e a osmolalidade da substância a ser administrada (no caso de não ser administrado em estado sólido ou particulado), preparação de solução (TURNER et al., 2011), entre outros, precisam ser considerados. A absorção, distribuição e eliminação de compostos fornecidos por via i.p.

são mais semelhantes aos observados após ingestão oral, porque a principal via de absorção é para os vasos mesentéricos, que drenam para a veia porta e passam pelo fígado (LUKAS et al., 1971). Portanto, os compostos que são fornecidos por via i.p. podem passar pelo metabolismo hepático antes da sua chegada à circulação sistêmica (ABU-HIJLEH et al., 1995).

Figura 5: Efeitos positivos da N-acetilcisteína em testes *in vivo* e *in vitro* avaliados nesta revisão e seus principais resultados.



Fonte: ANDRADE, K. Q.

No estudo de Wang et al. (2006) observou-se que a NAC tinha um efeito estimulante na lesão hepática no pós-tratamento. Estudos adicionais são necessários para confirmar este resultado.

Devido à ampla variação em termos de dose, via e duração da administração da NAC, evidenciada pela análise da Tabela 2, seria necessário informar a razão para qualquer decisão com relação a esses parâmetros. Isso requer a padronização do modelo do estudo, de acordo com cada tipo de lesão hepática, e avaliar a dose ótima para o tratamento de casos crônicos e agudos, permitindo maior segurança na seleção da dose.

5.3. Biomarcadores

A Tabela 1 lista os biomarcadores mais utilizados. Embora um corpo de evidências convincentes indique que o EO está envolvido em vias que levam a danos hepáticos, não há acordo entre os cientistas em termos da melhor e mais precisa medida de EO. Uma atitude comum usada na avaliação do EO é medir a diminuição de antioxidantes endógenos. Com efeito, a suplementação com NAC é eficaz para aumentar os níveis de GSH (SCHMITT et al., 2015), confirmada nesta revisão, independente do tipo e tempo do estudo e da via de administração. Como tal, a GSH é o mais indicado como um marcador de EO. A razão GSH/GSSG pode também ser utilizada como um indicador *in vitro* e *in vivo* do balanço redox nas células e, conseqüentemente, do EO celular (KADIISKA et al., 2015).

Para avaliar adequadamente a inflamação, os marcadores devem ser eficazes. Devem reproduzir o processo inflamatório no estudo e ser preditivos do futuro sobre o estado de saúde. Muitos dos processos, células e moléculas envolvidas na resposta inflamatória causada por diferentes agentes causadores de lesões hepáticas, mencionados nesta revisão, são notavelmente semelhantes. Eles são caracterizados por um aumento no número de leucócitos na corrente sanguínea e tecido hepático e por superprodução e presença na corrente sanguínea de níveis aumentados de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e quimiocinas (IL-8 e MCP-1) (CALDER et al., 2013). O aumento dos níveis desses mediadores atua para amplificar o processo inflamatório e contribuir para a destruição tecidual. Estes marcadores são comuns à inflamação, independente da causa.

6. Desafios e Perspectivas

As doenças hepáticas são altamente prevalentes no mundo, e os resultados benéficos da NAC nos estudos *in vivo* poderiam beneficiar fortemente os pacientes, considerando que a NAC é um antioxidante seguro, barato e bem tolerado, com um mecanismo de ação conhecido. A controvérsia sobre os papéis benéficos em algumas doenças e não em outras deve ser esclarecida. Para permitir a comparação, em termos de tratamento e efeitos protetores, devem ser escolhidos controles positivos e negativos fiáveis.

Poucos estudos clínicos sobre o potencial antioxidante e inflamatório da NAC foram realizados (Tabela 2). Além disso, a ausência de estudos que avaliaram a atenuação de marcadores de estresse oxidativo e inflamação por NAC em hepatite B e C, e na translocação bacteriana e poucos estudos em obesidade e diabetes, levantam dificuldades para a prescrição de NAC aos pacientes. Antes disso, os estudos são necessários para garantir. Portanto, estudos adicionais são importantes para explorar o uso de NAC, usando também a mais recente

análise abrangente de técnicas genômicas e transcriptômicas, o que permitirá uma investigação mais aprofundada sobre como a NAC afeta as vias metabólicas.

Devido aos bons resultados encontrados nesta revisão para a NAC como atenuador de marcadores de estresse oxidativo, especialmente nos níveis de GSH, e inflamação, são necessários esforços adicionais *in vivo* e em seres humanos, para permitir a avaliação da NAC como um potencial terapêutico na lesão hepática. Como desafio, para novos estudos, um projeto validado para o tratamento e modelos de proteção deve ser discutido e implementado. Deve também ser considerada a via de administração que proporciona efeitos mais benéficos nos indivíduos afetados por estas condições. O aumento dos estudos clínicos e a avaliação do estresse oxidativo e marcadores de inflamação no soro/plasma são urgentemente necessários. Essas descobertas fornecerão informações úteis sobre os benefícios para a saúde da NAC sobre a lesão hepática, em relação ao estresse oxidativo e inflamação, para fornecer dados aos profissionais em termos de eficácia e segurança da droga para alcançar uma prescrição futura segura e confiável.

Abreviação

AGPIs: ácidos graxos poli-insaturados; ADH: álcool desidrogenase; ACR: acrilamida; AGEs: produtos finais de glicação avançada; ALDH: aldeído desidrogenase; ALT: alanina aminotransferase; AP-1: proteína ativador 1; APAP: acetaminofeno; AO: antioxidantes; α SMA: α -actina do músculo liso; AUC: curva concentração-tempo; p.c.: peso corporal; CsA: ciclosporina A; CAT: catalase; Cit c: citocromo c; CKD: doença renal crônica; CLDs: doenças hepáticas crônicas; CP4502E1: citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídio 1; COPD: doença pulmonar obstrutiva crônica; COX: ciclooxigenase; Cp: proteína nuclear; CsA: ciclosporina A; Cys: cisteína; Cys-Cys: cistina; d: dia; De-Acase: deacetilases; DCV: doenças cardiovasculares; DHA: doença hepática alcoólica; DILI: lesão hepática induzida por droga; DNA: ácido desoxirribonucleico; DDT: diclorodifeniltricloroetano; EO: estresse oxidativo; ERNs: espécies reativas de nitrogênio; EROs: espécies reativas de oxigênio; EROns = espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; EHNA: esteatohepatite não alcoólica; ECM: matriz extracelular; RE: retículo endoplasmático; AGL: ácidos graxos livres; GCDCA: ácido glicocodesodexicólico; GCS: γ -glutamyl cysteinyl synthetase; GPx: glutational peroxidase; GR: GSH redutase; GST: glutational S-transferase; GSH: glutational reduzida; GSSG: glutational oxidada; GSH/GSSG: razão glutational reduzida/glutational oxidada; HBV: hepatite B viral; HCC: carcinoma hepatocelular; HCV: hepatite C viral; HIV: vírus da imunodeficiência humana; HFD: dieta com alto teor de gordura; HP: hidroperóxido; HBx: proteína X; HSCs: células estreladas hepáticas; hsPCR: proteína C-reativa de alta sensibilidade; Hsp90: proteína 90; I κ B- α : inibidor do fator nuclear kappa-B; IKK: I κ B quinases; IKK β : inibidor do κ B quinase; I κ B: inibidor do NF- κ B; IL: interleucina; IL-1R: receptor de interleucina-1; i.m.: intramuscular; i.p.: intraperitoneal; I/R: isquemia-reperfusão; IR: resistência à insulina; INF γ : interferon gamma; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; i.v.: intravascular; JNKs: c-jun N-terminal quinases; KCs: Células de Kupfer; LPO: lipoxigenase; LP: peróxido lipídico; LPS: lipopolissacarídeo; LOOH: hidroperóxido; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1; MDA = malondialdeído; MMP1: metaloprotease de matriz 1; MPO: mieloperoxidase; MROs: metabólitos reativos oxigenados; NADPH oxidase:

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase; NADP^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NAC: *N*-acetil-L-cisteína; NF- κ B = fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa das células ativadas B; NAFLD: doença hepática gordurosa não alcoólica; NIK: quinase indutora de NF- κ B; NK: célula natural killer; NKT: célula natural killer T; NAPQI: *N*-acetil-p-benzoquinona-imina; NP-SH: grupamento sulfidril não proteico; NO(x): Total nitrato total/nitrito; Nrf2: Fator nuclear eritroide 2; OPS: Agrotóxicos organofosforados; OSI: índice de estresse oxidativo; ORF: fase de leitura aberta; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; PMN: leucócitos polimorfonucleares; P-SH: proteína com grupamento tiol; p65: subunidade p65 do fator nuclear NF- κ B; PGE2: prostaglandina E2; p50: subunidade p50 do fator nuclear NF- κ B; PON1: paraoxonase-1; Pol: polimerase; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; PRPs: receptores de reconhecimento de padrões; R-SH: tiol; RHD: homologia de domínio; Rel A: v-rel reticuloendoteliase aviária oncogene homólogo A; Ref: referência; ROOH: hidroperóxido orgânico; ROH: álcool; SREBP: proteínas ligadoras de elementos reguladores do esteroide; SOD: superóxido dismutase; STAT-3: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; Sem: semana; s.c.: subcutâneo; Sp: proteína de superfície; SRD: dieta com alto teor de sacarose; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; TLR2: receptor toll-like 2; TLR4: receptor toll-like 4; T2DM: diabetes tipo 2; T1DM: diabetes tipo 1; TNF-R1: TNF- α receptor 1; TGF- β : fator de crescimento beta; TG: triglicerídeos; TIMP1: inibidor da metaloproteinase-1 tecidual; TAS: status antioxidante total; TOS: status oxidante total; TAC: capacidade antioxidante total; T-GSH: glutatona total; UPR: resposta da proteína desdobrada; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; VCAM-1: molécula de adesão de células vasculares 1; XO: xantina oxidase; 4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal; 8-OHdG: 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoxiguanosina; $\text{CO}_3^{\cdot -}$: carbonato radical; $\text{HO}^{\cdot}$ = radical hidroxila; HOCl: ácido hipocloroso; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\text{O}_2^{\cdot -}$: oxigênio singleto; $\text{O}_2^{\cdot -}$ = ânion radical superóxido; ONOO $^-$: peroxinitrito; ONOOH: Ácido peroxinitroso; $\text{NO}^{\cdot}$ = radical óxido nítrico; $\text{NO}_2^{\cdot}$: dióxido de nitrogênio; $\Delta\psi$: potencial da membrana mitocondrial; 1: NADH-ubiquinona redutase; 2: succinato-ubiquinona redutase; 3: ubiquinol-citocromo c redutase; 4: citocromo c oxidase.

Agradecimentos: Agências brasileiras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) São muito reconhecidos para bolsas de pesquisa e bolsas de estudo.

Contribuição dos autores: Kívia Queiroz de Andrade projetou o estudo, revisou a literatura, escreveu o primeiro esboço e preparou os esquemas. Fabiana Andréa Moura revisou a literatura e escreveu o primeiro rascunho. John Marques dos Santos escreveu o primeiro rascunho. Orlando Roberto Pimentel de Araújo: escreveu o primeiro rascunho. Juliana Célia de Farias Santos revisou o artigo. Marília Oliveira Fonseca Goulart criticamente revisou o artigo e supervisionou o estudo.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram nenhum conflito de interesse

Referências

ABDOLI, N.; AZARMI, Y.; EGHBAL, M.A. Protective Effects of N-acetylcysteine Against the Statins Cytotoxicity in Freshly Isolated Rat Hepatocytes. **Adv Pharm Bull**, v. 4, n. 3, p. 249-54, 2014.

ABU-HIJLEH, M.F., HABBAL, O.A.; MOQATTASH, S.T. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. **J Anat**, v.186, n. 3, p. 453-67, 1995.

ACHARYA, M.; LAU-CAM, C.A. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. **J Biomed Sci**, v. 17, n. 35, p. 1-11, 2010.

ACAR, A. et al. [Investigation of oxidative stress and antioxidant defense in patients with hepatitis B virus infection and the effect of interferon-alpha plus lamivudine combination therapy on oxidative stress]. **Mikrobiyol Bul**, v. 43, n. 3, p. 411-23, 2009.

ADAMS, L.A.; LINDOR, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Epidemiol**, v. 17, n. 11, 2007.

AFFORD, S.C. et al. Vascular cell adhesion molecule 1 expression by biliary epithelium promotes persistence of inflammation by inhibiting effector T-cell apoptosis. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1932-43., 2014.

AHMAD, I. et al. Biochemical and molecular mechanisms of N-acetyl cysteine and silymarin-mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. **Chem Biol Interact**, v. 201, n. 1-3, p. 9-18, 2013.

AITIO, M.L. N-acetylcysteine -- passe-partout or much ado about nothing? **Br J Clin Pharmacol**, v. 61, n. 1, p. 5-15, 2005.

AKBULUT, S. et al. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 10158-65, 2014.

AKCA, T. et al. The effect of N-acetylcysteine on pulmonary lipid peroxidation and tissue damage. **J Surg Res**, v. 129, n. 1, p. 38-45, 2005.

ALTINOZ, E.; TURKOZ; Y.; VARDI, N. The protective effect of N-acetylcysteine against acrylamide toxicity in liver and small and large intestine tissues. **Bratisl Lek Listy**, v. 116, n. 4, p. 252-8, 2015.

AL-MUSTAFA, Z.H. et al. Cimetidine enhances the hepatoprotective action of N-acetylcysteine in mice treated with toxic doses of paracetamol. **Toxicology**, v. 121, n. 3, p. 223-228, 1997.

AMIRANA, S.; BABBY, J. A Review of Drug-induced Liver Injury. **J Nurse Pract**, v. 11, n. 2, p. 270-271, 2015.

ATHYROS, V.G. et al. Cardiovascular risk across the histological spectrum and the clinical manifestations of non-alcoholic fatty liver disease: An update. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 22, p. 6820-34, 2015.

ATTRI, S. et al. Protective effect of N-acetylcysteine in isoniazid induced hepatic injury in growing rats. **Indian J Exp Biol**, v. 39, n. 5, p. 436-40, 2001.

ATKURI, K.R. et al. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 4, p. 355-9, 2007.

ATKINSON, M.C. The Use of N-Acetylcysteine in Intensive Care. **Critical Care and Resuscitation**, v. 4, n. 1, p. 21-27, 2002.

ARRANZ, L. et al. The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 9, p. 1252-62, 2008.

BAUMGARDNER, J.N. et al. N-acetylcysteine attenuates progression of liver pathology in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **J Nutr**, v. 138, n. 10, p. 1872-9, 2008.

BAVECO, J.M.; ROOS, A.M.D. Assessing the Impact of Pesticides on Lumbricid Populations: An Individual Based Modelling Approach. **J Appl Ecol**, v. 33, n. 6, p. 1451-1468, 1996.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **J Hepatol**, v. 51, n. 1, p. 212-23, 2009.

BAJT, M.L. et al. Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. **Toxicol Sci**, v. 80, n. 2, p. 343-9, 2004.

BAKER, W.L. et al. Use of N-acetylcysteine to reduce post-cardiothoracic surgery complications: a meta-analysis. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 35, n. 3, p. 521-7, 2009.

BEYAZ, S.G. et al. The effects of N-acetylcysteine on hepatic function during isoflurane anaesthesia for laparoscopic surgery patients. **Indian J Anaesth**, v. 55, n. 6, p. 567-72, 2011.

BERK, M., et al., The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 3, p. 167-77, 2013.

BEMEUR, C. et al. N-acetylcysteine attenuates cerebral complications of non-acetaminophen-induced acute liver failure in mice: antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Metab Brain Dis**, v. 25, n. 2, p. 241-9, 2010.

BITETTO, D. et al. Vitamin A deficiency is associated with hepatitis C virus chronic infection and with unresponsiveness to interferon-based antiviral therapy. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 925-33, 2013.

BHOGAL, R.H. et al. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. **Liver Transpl**, v. 16, n. 11, p. 1303-13, 2010.

BJORNSSON, E.S. et al. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1419-25, 2013.

BORRO, P.; LEONE, S.; TESTINO, G. Liver disease and hepatocellular carcinoma in alcoholics: the role of anticraving therapy. **Curr Drug Targets**, v. 16, p. 13, 2015.

BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **Eur J Respir Dis Suppl**, v. 111, p. 45-51, 1980.

BORGSTRÖM, L.; KÅGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 31, n. 2, p. 217-22, 1986.

BRANDAO, R.; NOGUEIRA, C.W. Inhibition of hepatic delta-aminolevulinate dehydratase activity induced by mercuric chloride is potentiated by N-acetylcysteine in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 1, p. 305-8, 2011.

BUNCHORNTAVAKUL, C.; WOOTHANANONT, T.; ATSAWARUNGRUANGKIT, A. Effects of vitamin E on chronic hepatitis C genotype 3: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Med Assoc Thai**, v. 97, p. 31-40, 2014.

BULATOVA, I.A. et al. [Catalase gene rs1001179 polymorphism and oxidative stress in patients with chronic hepatitis C and ulcerative colitis]. **Ter Arkh**, v. 87, n. 2, p. 49-53, 2015.

CAI, Z. et al. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 7, p. 8655-62, 2015.

CALDER, P.C. et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. **Br J Nutr**, v. 109, n. 1, p. S1-34, 2013.

CESARO, C. et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. **Dig Liver Dis**, v. 43, n. 6, p. 431-8, 2011.

CETINKAYA, A. et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **Tohoku J Exp Med**, v. 206, n. 2, p. 131-139, 2005.

ÇAĞLIKÜLEKCI, M. et al. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Pharmacological Research**, v. 49, n. 3, p. 227-238, 2004.

CARO, A.A. et al. N-acetylcysteine inhibits the up-regulation of mitochondrial biogenesis genes in livers from rats fed ethanol chronically. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 38, n. 12, p. 2896-906, 2014.

CARTER-KENT, C.; ZEIN, N.N.; FELDSTEIN, A.E. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 4, p. 1036-42, 2008.

CARVALHO, M. et al. The toxicity of N-methyl-alpha-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. **Toxicology**, v. 200, n. 2-3, p. 193-203, 2004.

CENTER, S.A. Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 34, n. 1, p. 67-172, 2004.

- COMPARE, D. et al. Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 22, n. 6, p. 471-6, 2012.
- CHEN, Y. et al. Oral N-acetylcysteine rescues lethality of hepatocyte-specific Gclc-knockout mice, providing a model for hepatic cirrhosis. **J Hepatol**, v. 53, n. 6, p. 1085-94, 2010.
- CHATTERJEE, R.; MITRA, A. An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. **Int Immunopharmacol**, v. 24, n. 2, p. 335-45, 2015.
- CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food Chem Toxicol**, v. 60, p. 38-44, 2013.
- CHEN, L. et al., S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. **J Hepatol**, v. 62, n. 1, p. 156-64, 2015.
- CHEN, P.J. et al. Epigenetic modifications by histone deacetylases: Biological implications and therapeutic potential in liver fibrosis. **Biochimie**, v. 116, p. 61-9, 2015.
- COHEN-NAFTALY, M.; FRIEDMAN, S.L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 4, n. 6, p. 391-417, 2011.
- CSONTOS, C. et al. Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. **Burns**, v. 38, n. 3, p. 428-37, 2012.
- CZAJA, A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 10, p. 2515-32, 2014.
- DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, 1998.
- DALTON, S.R. et al. Carbon tetrachloride-induced liver damage in asialoglycoprotein receptor-deficient mice. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 7, p. 1283-90, 2009.
- D'AUTREAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 813-24, 2007.
- DIKICI, I. et al. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-alpha treatment. **Clin Biochem**, v. 38, n. 12, p. 1141-4, 2005.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; HOLTZCLAW, W.D.; KENSLER, T.W. The role of Keap1 in cellular protective responses. **Chem Res Toxicol**, v. 18, n. 12, p. 1779-91, 2005.
- DEMIR, S.; INAL-ERDEN, M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. **Clin Chim Acta**, v. 275, n. 2, p. 127-35, 1998.
- DINIZ, Y.S. et al. Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 543, n. 1-3, p. 151-7, 2006.

DODD, S. et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opin Biol Ther**, v. 8, n. 12, p. 1955-62, 2008.

DUYGU, F. et al. Relationship of oxidative stress in hepatitis B infection activity with HBV DNA and fibrosis. **Ann Lab Med**, v. 32, n. 2, p. 113-8, 2012.

DHOUIB, I. E. B. et al. Anti-inflammatory Effects of N-acetylcysteine against Carbosulfan-induced Hepatic Impairment in Male Rats. **Recent Advances in Biology and Medicine**, v 1, p. 29-40, 2015.

DEMIROREN, K. et al. Protective effects of L-carnitine, N-acetylcysteine and genistein in an experimental model of liver fibrosis. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 38, n. 1, p. 63-72, 2014.

DIESEN, D.L.; KUO, P.C. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. **J Surg Res**, v. 167, n. 1, p. 96-112, 2011.

DOMENICALI, M. et al. Oxidative injury in rat fatty liver exposed to ischemia-reperfusion is modulated by nutritional status. **Dig Liver Dis**, v. 37, n. 9, p. 689-97, 2005.

DRÖGE, W.; ECK, H.P.; MIHM, S. HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction--a rationale for treatment with N-acetylcysteine. **Immunol Today**, v. 13, n. 6, p. 211-214, 1992.

DUVAL, F. et al. Protective mechanisms of medicinal plants targeting hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis. **Chin Med**, v. 9, n. 1, p. 27, 2014.

EDWARDS, L.; WANLESS, I.R. Mechanisms of liver involvement in systemic disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 27, n. 4, p. 471-83, 2013.

FARIAS, M.S. et al. Antioxidant supplementation attenuates oxidative stress in chronic hepatitis C patients. **Gastroenterol Hepatol**, v. 35, n. 6, p. 386-94, 2012.

FARHANGI, M.A. et al. Oral coenzyme Q10 supplementation in patients with nonalcoholic fatty liver disease: effects on serum vaspin, chemerin, pentraxin 3, insulin resistance and oxidative stress. **Arch Med Res**, v. 45, n. 7, p. 589-95, 2014.

FERNANDEZ, V. et al. Reestablishment of ischemia-reperfusion liver injury by N-acetylcysteine administration prior to a preconditioning iron protocol. **The Scientific World Journal**, p. 1-9, 2013.

FERREIRA, S. F.R. et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats. **Alcohol**, v. 43, n. 2, p. 127-35, 2009.

FORREST, E.; REED, E. Alcohol and the liver. **Medicine**, v. 39, n. 9, p. 532-535, 2011.

- FUKUDA, K. et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 361, n. 3, p. 670-4, 2007.
- GABR, S.A.; ALGHADIR, A.H. Prediction of fibrosis in hepatitis C patients: assessment using hydroxyproline and oxidative stress biomarkers. *Virusdisease*, v. 25, n. 1, p. 91-100, 2014.
- GALICIA-MORENO, M.; FAVARI, L.; MURIEL, P. Antifibrotic and antioxidant effects of N-acetylcysteine in an experimental cholestatic model. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 2, p. 179-85, 2012.
- GIAVAROTTI, K.A.S. Estudo do Estresse Oxidativo Hepático Induzido por Lindano em um Modelo de Hipertireoidismo Experimental, in Instituto de Química. Universidade de São Paulo: São Paulo, 2001.
- GLANTZOUNIS, G.K. et al. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 23, p. 2891-901, 2006.
- GONG, G. et al. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9599-604, 2001.
- GONZALEZ-RUBIO, S. et al. Calcium-dependent nitric oxide production is involved in the cytoprotective properties of n-acetylcysteine in glycochenodeoxycholic acid-induced cell death in hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 242, n. 2, p. 165-72, 2010.
- GORRINI, C.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.
- GRIFFITH, O.W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 11, p. 5606-10. 1979.
- GRASSELLI, E. et al. Altered oxidative stress/antioxidant status in blood of alcoholic subjects is associated with alcoholic liver disease. **Drug Alcohol Depend**, v. 143, p. 112-9, 2014.
- GUIJARRO, L.G. et al. N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: randomized, placebo-controlled pilot study. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 14, p. 2851-7, 2008.
- HAJJOU, M. et al. cDNA microarray analysis of HBV transgenic mouse liver identifies genes in lipid biosynthetic and growth control pathways affected by HBV. **J Med Virol**, v. 77, n. 1, p. 57-65, 2005.
- HADDAD, J.J. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 10, p. 799–810, 2002.

- HAFIZ, A.M.A.E. et al. High dose N-acetyl cysteine improves inflammatory response and outcome in patients with COPD exacerbations. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 62, n. 1, p. 51-57, 2013.
- HASSAN, M.Q. et al. Endrin-induced histopathological changes and lipid peroxidation in livers and kidneys of rats, mice, guinea pigs and hamsters. **Toxicol Pathol**, v. 19, n. 2, p. 108-14, 1991.
- HAYAKAWA, M. et al. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. **EMBO J**, v. 22, n. 13, p. 3356–3366, 2003.
- HENAO-MEJIA, J. et al. Role of the intestinal microbiome in liver disease. **J Autoimmun**, v. 46, p. 66-73, 2013.
- HOROZ, M. et al. Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. **BMC Gastroenterol**, v. 5, p. 35, 2005.
- HOUSTIS, N.; ROSEN, E.D.; LANDER, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 944-8, 2006.
- HOU, Y. et al. N-acetylcysteine reduces inflammation in the small intestine by regulating redox, EGF and TLR4 signaling. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 513-22, 2013.
- HO, E. et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol**, v. 1, p. 483-91, 2013.
- HSU, B.G. et al. Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats. **Life Sci**, v.79, n. 21, p. 2010-6, 2006.
- HUANG, H. et al. Protective effects of melatonin and N-acetylcysteine on hepatic injury in a rat cardiopulmonary bypass model. **J Surg Res**, v. 142, n. 1, p. 153-61, 2007.
- INGARAMO, P.I. et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. **Mol Immunol**, v. 48, n. 12-13, p. 1397-407, 2011.
- INVERNIZZI, P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. **J Autoimmun**, v. 46, p. 1-6, 2013.
- JIANG, W. et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. **Sci Rep**, v. 5, p. 8096, 2015.
- JIANG, L. et al. As(2)O(3) induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway and activation of caspases. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 2, p. 2190-2196, 2015.
- JONES, C.M. et al. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. 6, p. 1337-9, 2003.

- JOSHI, D. et al. N-acetyl cysteine and selenium protects mercuric chloride-induced oxidative stress and antioxidant defense system in liver and kidney of rats: a histopathological approach. **J Trace Elem Med Biol**, v. 28, n. 2, p. 218-26, 2014.
- KASPERCZYK, S. et al. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, n. 2, p. 638-47, 2014.
- KAMALAKKANNAN, N. et al. Protective Effect of N-Acetyl Cysteine in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, v. 4, n. 2, p. 118-123, 2005.
- KAYA, H. et al. The protective effect of N-acetylcysteine against cyclosporine A-induced hepatotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 1, p. 15-20, 2008.
- KALIMERIS, K. et al. N-acetylcysteine ameliorates liver injury in a rat model of intestinal ischemia reperfusion. **J Surg Res**, v. 206, n. 2, p. 263-272, 2016.
- KADIISKA, M.B. et al. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 81, p. 100-6, 2015.
- KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-acetylcysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 9, n. 2, p. 38-44, 2005.
- KHADEM, A. M.H.; OMRANI, M.D.; KHERADMAND, F. Oxidative stress response in patients infected by diverse hepatitis C virus genotypes. **Hepat Mon**, v. 15, n. 2, p. e22069, 2015.
- KIM, H.J. et al. Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor-kappaB DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 9, p. 1483-93, 2006.
- KIM, Y.S.; SEO, H.W.; JUNG, G. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 457, n. 3, p. 328-33, 2015.
- KIM, J.Y. et al. A critical role of STAT1 in streptozotocin-induced diabetic liver injury in mice: controlled by ATF3. **Cell Signal**, v. 21, n. 12, p. 1758-67, 2009.
- KIREEV, R. et al. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. **Eur J Pharmacol**, v. 701, n. 1-3, p. 185-93, 2013.
- KORUK, M. et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Ann Clin Lab Sci**, v. 34, n. 1, p. 57-62, 2004.

KOPPE, S.W. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. **Transl Res**, v. 164, n. 4, p. 312-22, 2014.

KO, W.S. et al. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 30, p. 4697-702, 2005.

LASRAM, M.M. et al. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. **Clin Biochem**, 2015.

LAI, I.K. et al. N-acetylcysteine (NAC) diminishes the severity of PCB 126-induced fatty liver in male rodents. *Toxicology*, v. 302, n. 1, p. 25-33, 2012

LASRAM, M.M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. **Life Sci**, v. 107, n. 1-2, p. 50-8, 2014.

LEUNG, C. C. H.; YOUNG, K. K. Clinical aspects of hepatic disease. **Anaesth Intens Care Medic**, v. 16, n. 1, p. 11-13, 2015.

LEI, S. et al. Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. **Yonsei Med J**, v. 53, n. 2, p. 294-303, 2012.

LIN, H. et al. Antioxidant N-acetylcysteine attenuates hepatocarcinogenesis by inhibiting ROS/ER stress in TLR2 deficient mouse. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. 74130, 2013.

LINHART, K.B. et al. The generation of carcinogenic etheno-DNA adducts in the liver of patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary Surg Nutr**, v. 4, n. 2, p. 117-23, 2015.

LIN, K.T. et al. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 230, n. 1, p. 115-119, 1997.

LI, H. et al. The metabolic responses to hepatitis B virus infection shed new light on pathogenesis and targets for treatment. **Sci Rep**, v. 5, p. 8421, 2015.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The relative importance of HO* and ONOO⁻ in mediating the toxicity of O*. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 5-6, p. 777-8, 1999.

LI, J. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on the liver of brain-dead Ba-Ma mini pig. **Transplant Proc**, v. 42, n. 1, p. 195-9, 2010.

LIN, P.C. et al. N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: preliminary data. **Support Care Cancer**, v. 14, n. 5, p. 484-7, 2006.

LUKAS, G.; BRINDLE, S.D.; GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 178, n. 3, p. 562-4, 1971.

- MANSOUR, H.H. et al. Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 3, p. 773-80, 2008.
- MARÍ, M., et al., Redox control of liver function in health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 11, p. 1295-331, 2010.
- MASRI, O.A.; CHALHOUB, J.M.; SHARARA, A.I. Role of vitamins in gastrointestinal diseases. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 17, p. 5191-209, 2015.
- MAHESWARI, E.; SARASWATHY, G.R.; SANTHRANIL, T. Hepatoprotective and antioxidant activity of N-acetyl cysteine in carbamazepine-administered rats. **Indian J Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 211-5, 2014.
- MAHAPATRA, S.K. et al. Alteration of immune functions and Th1/Th2 cytokine balance in nicotine-induced murine macrophages: immunomodulatory role of eugenol and N-acetylcysteine. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 4, p. 485-95, 2011.
- MACSWEEN, R.N.; BURT, A.D. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, v. 6, n. 3, p. 221-32, 1986.
- MANOV, I.; HIRSH, M.; IANCU, T.C. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. **Exp Toxicol Pathol**, v. 53, n. 6, p. 489-500, 2002.
- MCMAHON, B.J. Natural history of chronic hepatitis B. **Clin Liver Dis**, v. 14, n. 3, p. 381-96, 2010.
- MEDEIROS, I.C., LIMA, J.G. Is nonalcoholic fatty liver disease an endogenous alcoholic fatty liver disease? - A mechanistic hypothesis. **Med Hypotheses**, v. 85, n. 2, p. 148-52, 2015.
- METWALLY, M.A.; ZEIN, C.O.; ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 2, p. 286-91, 2004.
- MIYANISHI, K. et al. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. **World J Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 593-9, 2015.
- MIURA, K. et al. Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1420-9, 2008.
- MITTLER, R. et al. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant Sci**, v. 16, n. 6, p. 300-9, 2011.
- MOSTAFALOU, S. et al. Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. **Adv Pharm Bull**, v. 2, n. 1, p. 79-88, 2012.
- MOORE, S.M. et al. Emerging Roles for Lipids in the Hepatic Innate Immune Response. **Hum Nutr Food Sci**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 2013.

- MONTALVO-JAVE, E.E. et al. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 147, n. 1, p. 153-9, 2008.
- MORMONE, E.; GEORGE, J.; NIETO, N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. **Chem Biol Interact**, v. 193, n. 3, p. 225-31, 2011.
- MOURA, F.A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biol**, v. 6, p. 617-639, 2015.
- MODI, M. et al. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. **J Trace Elem Med Biol**, v. 20, n. 3, p. 197-204, 2006.
- MOHD, H. K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-42, 2013.
- MOURA, F.A. et al. Lipoic Acid : Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Role and Clinical Applications. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 5, p. 458-483, 2015.
- MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatol Int**, v. 3, n. 4, p. 526-36, 2009.
- MUSACCO-SEBIO, R. et al. Rat liver antioxidant response to iron and copper overloads. **J Inorg Biochem**, v. 137, p. 94-100, 2014.
- NAKAMOTO, N.; KANAI, T. Role of toll-like receptors in immune activation and tolerance in the liver. **Front Immunol**, v. 5, p. 221, 2014.
- NISHIKAWA, T, et al. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. **Liver International**, v. 29, n. 6, p. 846-856, 2009.
- NISSAR, A.U. et al. Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from Allium plants, on experimentally induced hepatic prefibrogenic events in Wistar rat. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 828-33, 2013.
- NOSZÁL, B.; VISKY, D.; KRASZNI, M. Population, acid-base, and redox properties of N-acetylcysteine conformers. **J Med Chem**, v. 43, n. 11, p. 2176-82, 2000.
- NUMAN, I.T.; HASSAN, M.Q.; STOHS, S.J. Protective effects of antioxidants against endrin-induced lipid peroxidation, glutathione depletion, and lethality in rats. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 19, n. 3, p. 302-6, 1990.
- ODEWUMI, C. O. et al. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 243-8, 2011.
- OJHA, A. et al. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. **Environ Toxicol**, v. 28, n. 10, p. 543-52, 2013.

OKANOUE, T.; MITSUYOSHI, H. [Non-alcoholic steatohepatitis. 3. Oxidative stress and NASH]. **Nihon Naika Gakkai Zasshi**, v. 95, n. 1, p. 51-6, 2006.

OKA, S. et al. N-Acetylcysteine suppresses TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B kinases. **FEBS Letters**, v. 472, n. 2-3, p. 196-202, 2000.

OLIVEIRA, V.A. et al. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. **J Trace Elem Med Biol**, v. 32, p. 183-8, 2015.

OWUMI, S.E. et al. Co-administration of N-Acetylcysteine and Acetaminophen Efficiently Blocks Acetaminophen Toxicity. **Drug Dev Res**, v. 76, n. 5, p. 251-8, 2015.

OZENIRLER, S. et al. The relationship between advanced oxidation protein products (AOPP) and biochemical and histopathological findings in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **J Dig Dis**, v. 15, n. 3, p. 131-6, 2014.

PAWLOWSKA-GORAL, K.; KURZEJA, E.; STEC, M. N-acetylcysteine protects against fluoride-induced oxidative damage in primary rat hepatocytes. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 8, p. 2279-82, 2013.

PARK, E. et al. Protective effects of N-acetylcysteine against monosodium glutamate-induced astrocytic cell death. **Food Chem Toxicol**, v. 67, p. 1-9, 2014.

PARTHASARATHY, R.; KATTIMANI, S.; SRIDHAR, M.G. Oxidative stress during alcohol withdrawal and its relationship with withdrawal severity. **Indian J Psychol Med**, v. 37, n. 2, p. 175-80, 2015.

PARASASSI, T. et al. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 10, p. 1285-96, 2005.

PAJONK, F. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 6, p. 536-43, 2002.

PATERSON, R.L.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. **Crit Care Med**, v. 31, n. 11, p. 2574-8, 2003.

PELZ, S. et al. A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 3, p. 276-87, 2012.

PIVETTA, L.A. et al. Ethanol inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and glutathione peroxidase activities in mice liver: Protective effects of ebselen and N-acetylcysteine. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, n. 3, p. 338-43, 2006.

PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PISANI, P. et al. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 6, n. 6, p. 387-400, 1997.

POSSAMAI, F.P. Estudo do Estresse Oxidativo em Órgãos de Ratos Wistar Adultos Induzidos à Intoxicação por Malation. 2005, Universidade do Extremo Sul Catarinense: Santa Catarina.

POLI, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 3, p. 49-98, 2000.

QU, B.G. et al. Changes in tumor necrosis factor-alpha, heat shock protein 70, malondialdehyde, and superoxide dismutase in patients with different severities of alcoholic fatty liver disease: a prospective observational study. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 11, p. 643, 2015.

RASCHZOK, N. et al. MicroRNAs in liver tissue engineering - New promises for failing organs. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 88, p. 67-77, 2015.

RAFEIRO, E. et al. Effects of N-acetylcysteine and dithiothreitol on glutathione and protein thiol replenishment during acetaminophen-induced toxicity in isolated mouse hepatocytes. **Toxicology**, v. 93, n. 2, p. 209-24, 1994.

RABKIN, S.W.; KLASSEN, S.S. Nitric oxide differentially regulates the gene expression of caspase genes but not some autophagic genes. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 3, p. 339-47, 2007.

RANA, S.V. et al. Role of N-acetylcysteine in rifampicin-induced hepatic injury of young rats. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 2, p. 287-91, 2006.

RAZA, M. et al. A comparison of hepatoprotective activities of aminoguanidine and N-acetylcysteine in rat against the toxic damage induced by azathioprine. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol**, v. 134, n. 4, p. 451-456, 2003.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 11, p. 1603-16, 2010.

REHM, J. et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet*, v. 373, n. 9682, p. 2223-33, 2009.

RIBEIRO, G. et al. N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats. **Drug Chem Toxicol**, v. 34. N. 4, p. 467-74, 2011.

RIFAI, A. M. et al. The association of nonalcoholic fatty liver disease, obesity, and metabolic syndrome, with systemic inflammation and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Atherosclerosis**, v. 239, n. 2, p. 629-33, 2015.

RITTER, C. et al. Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. *Critical Care Medicine*, v. 32, n. 10, p. 2079-2083, 2004.

ROLO, A.P., TEODORO, J.S.; PALMEIRA, C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

RONIS, M.J. et al. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 5, p. 619-30, 2005.

ROJAS, C. et al. Hepatitis C patients in Puerto Rico have an altered iron balance. **Biol Trace Elem Res**, v. 84, n. 1-3, p. 239-45, 2001.

RONCO, M.T. et al. Role of nitric oxide increase on induced programmed cell death during early stages of rat liver regeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1690, n. 1, p. 70-6, 2004.

ROSA, S.C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **Eur J Clin Invest**, v. 30, n. 10, p. 915-29, 2000.

RUSHWORTH, G.F.; MEGSON, I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacol Ther**, v. 141, n. 2, p. 150-9, 2014.

ROESSNER, A. et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathology, research and practice**, v. 204, n. 7, p. 511-24, 2008.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 8, p. 4117-29, 2013.

SAYRE, L.M. et al. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. **Drug Metab Rev**, v. 38, n. 4, p. 651-75, 2006.

SARNSTRAND, B. et al. N,N'-Diacetyl-L-cystine-the disulfide dimer of N-acetylcysteine-is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 3, p. 1174-84, 1999.

SANTOS, J.C. et al. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 19846-66, 2013.

SANTOS, J.C. et al. Choline and Cystine Deficient Diets in Animal Models with Hepatocellular Injury: Evaluation of Oxidative Stress and Expression of RAGE, TNF-alpha, and IL-1beta. **Oxid Med Cell Longev**, 2015.

SAMUHASANEETO, S. et al. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. **J Med Assoc Thai**, v. 90, n. 4, p. 788-97, 2007.

SADOWSKA, A.M.; MANUEL, Y.K.B.; DE BACKER, W.A. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effects: a review. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 20, n. 1, p. 9-22, 2007.

SATHISH, P. et al. N-acetylcysteine attenuates dimethylnitrosamine induced oxidative stress in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 654, n. 2, p. 181-6, 2011.

- SCHMITT, B. et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. **Redox Biol.**, v. 6, p. 198-205, 2015.
- SENER, G. et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. **Life Sciences**, v. 72, n. 24, p. 2707-2718, 2003.
- SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 952-68, 2013.
- SEIF EL-DIN, S.H.; AL-HROOB, A.M.; EBEID, F.A. Schistosoma mansoni: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. **Exp Parasitol**, v. 128, n. 3, p. 230-5, 2011.
- SETSHEDI, M. et al. Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 35, n. 12, p. 2139-51, 2011.
- SGRO, C. et al. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 451-5, 2002.
- SHAN, Y.; LAMBRECHT, R.W.; BONKOVSKY, H.L. Association of hepatitis C virus infection with serum iron status: analysis of data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 6, p. 834-41, 2005.
- SILVA, D.C., CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações Patofisiológicas entre Estresse Oxidativo e Arteriosclerose. **Quim Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.
- SKRZYDLEWSKA, E.; FARBISZEWSKI, R. Protective effect of N-acetylcysteine on reduced glutathione, reduced glutathione-related enzymes and lipid peroxidation in methanol intoxication. **Drug Alcohol Depend**, v. 57, n. 1, p. 61-7, 1999.
- SOURIANARAYANANE, A. et al. Risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease. **J Crohns Colitis**, v. 7, n. 8, p. e279-85, 2013.
- SERRACINO-INGLOTT, F.; HABIB, N.A.; MATHIE, R.T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. **Am J Surg**, v. 181, n. 2, p. 160-6, 2001.
- SETSHEDI, M.; WANDS, J.R.; MONTE, S.M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 3, n. 3, p. 178-85, 2010.
- SEIVA, F.R.F. et al. Effects of N-acetylcysteine on alcohol abstinence and alcohol-induced adverse effects in rats. **Alcohol**, v. 43, n. 2, p. 127-35, 2009.
- SHEDLOFSKY, S.I. Role of iron in the natural history and clinical course of hepatitis C disease. **Hepato-gastroenterol**, v. 45, n. 20, p. 349-55, 1998.
- SHEFFNER, A.L. et al. Metabolic studies with acetylcysteine. **Biochem Pharmacol**, v. 15, n. 10, p. 1523-35, 1966.

SUN, Y. et al. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 41, p. 15289-98, 2014.

TASLIPINAR, M.Y. et al. Hyperbaric oxygen treatment and N-acetylcysteine ameliorate acetaminophen-induced liver injury in a rat model. **Hum Exp Toxicol**, v. 32, n. 10, p. 1107-16, 2013.

TARDIF, K.D.; WARIS, G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. **Trends Microbiol**, v. 13, n. 4, p. 159-63, 2005.

TASDELEN, F. N. et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis B. **Clin Lab**, v. 58, n. 3-4, p. 273-80, 2012.

TAN, C.Y. et al. Comparative hepatoprotective effects of tocotrienol analogs against drug-induced liver injury. **Redox Biol**, v. 4, p. 308-20, 2015.

TAKAKI, A; YAMAMOTO, K. Control of oxidative stress in hepatocellular carcinoma: Helpful or harmful? **World J Hepatol**, v. 7, n. 7, p. 968-79, 2015.

TAKHTFOOLADI, M.A. et al. Effects of N-acetylcysteine on liver remote injury after skeletal muscle ischemia reperfusion in rats. **Turk J Gastroenterol**, v. 25, n.1, p. 43-7, 2014.

TERNEUS, M.V. et al. Comparison of S-adenosyl-L-methionine (SAdMe) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. **Toxicology**, v. 244, n. 1, p. 25-34, 2008.

TELL, G.; VASCOTTO, C.; TIRIBELLI, C. Alterations in the redox state and liver damage: hints from the EASL Basic School of Hepatology. **J Hepatol**, v. 58, n. 2, p. 365-74, 2013.

THONG-NGAM, D. et al. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 38, p. 5127-32, 2007.

TIAN, Y. et al. Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 6, p. 1025-34, 2015.

TIROUVANZIAM, R. et al. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 12, p. 4628-33, 2006.

TOBWALA, S. et al. Comparative evaluation of N-acetylcysteine and N-acetylcysteineamide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in human hepatoma HepaRG cells. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 240, n. 2, p. 261-72, 2015.

TONG, A. et al. Proteomic analysis of cellular protein alterations using a hepatitis B virus-producing cellular model. **Proteomics**, v. 8, n. 10, p. 2012-23, 2008.

- TONDER, V. J. J. et al. In vitro effect of N-acetylcysteine on hepatocyte injury caused by dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites. **Hum Exp Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 41-53, 2014.
- TRÉPO, C., CHAN, H.L.Y.; LOK, A. Hepatitis B virus infection. **The Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2053-2063, 2014.
- TSUYUKI, S. et al. N-acetylcysteine improves cytotoxic activity of cirrhotic rat liver-associated mononuclear cells. **Int Immunol**, v. 10, n. 10, p. 1501-8, 1998.
- TURNER, P.V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 50, n. 5, p. 600-13, 2011.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 27, n. 2, p. 120-39, 2009.
- VENDEMIALE, G. et al. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 175, n. 2, p. 130-9, 2001.
- VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 34, n. 3, p. 274-85, 2011.
- VIDELA, L.A. et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. **Clin Sci (Lond)**, v. 106, n. 3, p. 261-8, 2004.
- VONGHIA, L.; MICHELSEN, P.; FRANCQUE, S. Immunological mechanisms in the pathophysiology of non-alcoholic steatohepatitis. **Int J of Molec Sci**, v. 14, n. 10, p. 19867-90, 2013.
- WANG, J. et al. N-acetylcysteine protects against cadmium-induced oxidative stress in rat hepatocytes. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 4, p. 485, 2014.
- WANG, A.L. et al. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. **Hepatol Res**, v. 34, n. 3, p. 199-206, 2006.
- WANG, C. et al. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 108855, 2014.

WANG, D. et al. [The antagonistic effect and mechanism of N-acetylcysteine on acrylamide-induced hepatic and renal toxicity]. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v. 34, n. 1, p. 13-7, 2016

WILLIAMS, C.D. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 124-31, 2011.

YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 45, n. 6, p. 1366-74, 2007.

YAMANO, T.; MORITA, S. Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes. **Toxicology**, v. 76, n. 1, p. 69-77, 1992.

YOO, J. et al. Cisplatin ototoxicity using transtympanic L-N-acetylcysteine: a pilot randomized study in head and neck cancer patients. **Laryngoscope**, v. 124, n. 3, p. E87-94, 2014

YUAN, L., KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug-induced liver injury. **Clin Liver Dis**, v. 17, n. 4, p. 507-18, 2013.

ZARAGOZA, A. et al. Effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on endogenous antioxidant defense system gene expression in a rat hepatocyte model of cocaine cytotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1496, n. 2-3, p. 183-195, 2000.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 1, p. 6-20, 2000

ZHOU, W.C.; ZHANG, Q.B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 23, p. 7312-24, 2014.

ZHANG, S. et al. Effects of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester drops on streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. **Mol Vis**, v. 14, p. 862-70, 2008