



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

Amylly Sanuelly da Paz Martins

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA EM MODELOS MURINOS DE COLITE
ULCERATIVA MODERADA E GRAVE INDUZIDAS POR SULFATO DE SÓDIO
DEXTRANA**

**Maceió-AL
2019**

Amylly Sanuely da Paz Martins

**AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA EM MODELOS MURINOS DE COLITE
ULCERATIVA MODERADA E GRAVE INDUZIDAS 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 de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Marília Oliveira Fonseca Goulart
Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Fabiana Andréa Moura

Maceió-AL

2019

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

M386a Martins, Amylly Sanuely da Paz.
 Ação da n-acetilcisteína em modelos murinos de colite ulcerativa moderada e grave induzidas por sulfato de sódio dextrana / Amylly Sanuely da Paz Martins. – 2019.
 94 f.: il. color.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Co-orientadora: Fabiana Andréa Moura.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 84-94.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Estresse oxidativo. 3. Antioxidantes. 4. Manifestações extraintestinais. 5. Colite. 6. Sulfato de dextrana. I. Título.

CDU: 616.34



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

Amylly Sanuelly da Paz Martins

Ação da N-acetilcisteína em modelos murinos de colite ulcerativa moderada e grave
induzidas 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 18 de Fevereiro de 2019.

Banca Examinadora

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

Prof.^a Dr.^a Juliana Célio Farias – (Fanut - UFAL)

Prof.^a Dr.^a Maria Izabel Florindo Guedes - (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, Senhor de tudo e de todos, pelo dom da fortaleza, coragem e perseverança, que no Seu infinito amor esteve sempre comigo concedendo-me sabedoria para melhor discernir minhas escolhas.

Aos meus pais, Maria e Antônio, pelo amor, cuidado, zelo, apoio e incentivo incondicional ao longo de minha caminhada. Obrigado por serem quem são!

Aos meus irmãos, Arthur, Jennifer, meus tesouros e maior bem pelo carinho e momentos de alegria, em particular, meu irmão Jefferson por sempre me ajudar de inúmeras formas e estar presente em todos os momentos.

À minha co-orientadora e mãe científica, Prof.^a Dr.^a Fabiana Moura, agradeço pela confiança, zelo, incentivo, dedicação, empenho, conhecimento e ensinamentos, mas principalmente, por sua amizade.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marília Goulart, pela abertura de portas do Laboratório de Eletroquímica e Estresse oxidativo, por seu exemplo de profissionalismo, apoio, incentivo e ensinamentos brilhantes.

Aos meus parceiros de pesquisa e amigos da vida, Orlando, Kívia, Jamerson, Marilene, Samara e Glenn, que de modo especial contribuíram com seu suporte, incentivo, conhecimento, alegria, simplicidade, carinho e amizade.

À todos do Laboratório de Estresse Oxidativo, Orlando, Kívia, Lourdinha, Jamerson, Glenn, Marilene, Samara, Rapha, Gustavo e Anne, por toda ajuda, dedicação e empenho, além dos momentos de descontração e principalmente, compromisso do grupo.

Àqueles que integram o Laboratório de Eletroquímica e Estresse oxidativo.

À Faculdade de Nutrição (FANUT/UFAL) pela concessão do Biotério durante o período experimental.

Aos Laboratórios de Pesquisa em Química em Recursos Naturais (LPqRN) e de Biologia Celular e Molecular (LBC) por todo o suporte sempre que precisamos.

À Prof.^a Dr.^a Salete Smaniotto pelo auxílio nas análises histológicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e aos professores das disciplinas que cursei pelo aprendizado.

À Comunidade Católica Shalom, minha gratidão por ser sinal de Cristo no mundo, por sua espiritualidade, unidade e me direcionar de forma mais concreta a

experimentar diariamente o amor a Deus na vida de cada pessoa. Em especial, Laisse, Iasmine, Lucas, Darllan, Felipe e Thiago.

Aos demais amigos, Juliana, Roberto, Eli, Nicholas e todos que sempre estiveram presentes, mesmo com a distância física, pelo convívio, apoio e aprendizado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - INCT-Bioanalítica/CNPq, pela bolsa de mestrado.

Aos órgãos de fomento (CNPq/CAPES/FAPEAL), demais agências financiadoras e à Universidade Federal de Alagoas.

Por fim, minha sincera gratidão àqueles que contribuíram direta e indiretamente para concretização dessa etapa.

“Ah! Eu chorei
Quando saí lá de casa
Enfrentei o mundo, eu chorei
Ah, só eu sei
Que para chegar onde estou
Eu confesso eu lutei, eu lutei”.

Benito Di Paula

RESUMO

A Colite Ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal que se caracteriza por inflamação crônica na mucosa do cólon com caráter recidivo e etiologia ainda não determinada. A inflamação contínua e o estresse oxidativo sobre o epitélio intestinal estão envolvidos no rompimento da barreira epitelial e no aumento da permeabilidade intestinal, facilitando a entrada de antígenos luminiais que podem se difundir via corrente sanguínea e causar inflamação em órgãos distantes, caracterizando assim as manifestações extraintestinais. Alternativas antioxidantes e anti-inflamatórias vêm sendo investigadas no contexto da colite, destacando-se a *N*-acetilcisteína (NAC), um potente agente redutor e precursor da glutatona. Neste contexto, este trabalho investigou os efeitos da administração oral de NAC sobre os perfis antioxidante e de inflamação, em cólon e rim, em modelos experimentais de colite ulcerativa moderada e grave induzidas por sulfato de sódio dextrana (SSD). Para isso, 31 camundongos machos foram randomizados em 5 grupos: Controle (C), Colite moderada (CM), Colite grave (CG), Colite moderada tratada com NAC (NACM) e Colite grave tratada com NAC (NACG). Durante 37 dias, os animais dos grupos suplementados receberam 150 mg kg d⁻¹ de NAC na água de beber. Do 31^o ao 37^o dia, as colites moderada e grave foram induzidas em seus respectivos grupos, através da adição do SSD na água de beber – 3 e 5% (p/v), respectivamente. Foram realizadas análises histológicas do cólon, a determinação da atividade antioxidante (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutatona reduzida – GSH, glutatona oxidada – GSSG e sua razão – GSH/GSSG) e avaliação do estresse oxidativo (peróxido de hidrogênio - H₂O₂, malondialdeído - MDA) e do perfil inflamatório (mieloperoxidase – MPO, fator de necrose tumoral alfa – TNF- α , interleucina 6 – IL-6, interferon gamma – IFN- γ e interleucina 10 – IL-10), em níveis colônico e renal. Após determinação da normalidade dos dados, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos, sendo a significância considerada quando $p < 0,05$. As análises histológicas comprovaram que o SSD (3 e 5% m/v) induziu a colite, causando destruição da arquitetura das criptas e a administração com NAC restaurou parcialmente esses danos. No cólon, somente a colite moderada (grupo CM) estimulou a SOD em detrimento da CAT e da GSH que foram reduzidas (esse verificado também na colite grave – CG), onde a administração de NAC não teve influência (NACM e NACG). Embora os níveis de H₂O₂ não tenham sido alterados, foi evidenciado dano oxidativo quando a NAC foi ofertada na colite grave (\uparrow MDA), o qual foi corroborado pelo \uparrow TNF- α , mesmo não sendo observado em nível histológico. Em nível renal, o SSD (3 % e 5 % m/v) aumentou o requerimento da CAT, sendo significativo quando administrado a NAC na colite grave (NACG). Além disso, a NAC melhorou a capacidade antioxidante endógena (\uparrow GSH), significativamente na colite moderada - NACM. Contudo, semelhante ao cólon, ocasionou dano oxidativo às membranas (\uparrow MDA), expressivo na colite grave (NACG). Diante dos resultados divergentes nos órgãos avaliados (cólon e rim), a aplicação clínica de NAC na colite, deve ser avaliada com cautela.

Palavras-chave: doença inflamatória intestinal, estresse oxidativo, antioxidante, inflamação, manifestações extraintestinais.

ABSTRACT

Ulcerative Colitis is an inflammatory bowel disease characterized by chronic inflammation of the mucosa of colon, with relapsing character and etiology not yet determined. Continuous inflammation and oxidative stress on the intestinal epithelium are involved in the breakdown of the epithelial barrier and increased intestinal permeability, facilitating the entry of luminal antigens that may diffuse through the bloodstream and cause inflammation in distant organs, thus characterizing extraintestinal manifestations. Antioxidant and anti-inflammatory alternatives have been investigated, in the context of colitis, especially *N*-acetylcysteine (NAC), a potent reducing agent and precursor of glutathione. In this context, this work investigated the effects of oral administration of NAC on the antioxidant and inflammatory profiles of colon and kidney, in experimental models of moderate and severe ulcerative colitis, induced by sodium dextran sulfate (SDS). For this, 31 male mice were randomized into 5 groups: Control (C), Moderate Colitis (CM), Severe Colitis (CG), Moderate Colitis treated with NAC (NACM) and Severe Colitis treated with NAC (NACG). For 37 days, the animals, in the supplemented groups, received 150 mg kg d⁻¹ of NAC in the drinking water. From 31st to 37th days, moderate and severe colitis were induced in their respective groups, by adding SDS in drinking water - 3 and 5% (w / v), respectively. Histological analysis of the colon, determination of antioxidant activity (superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT, reduced GSH, oxidized glutathione - GSSG and their ratio - GSH / GSSG) and oxidative stress markers (hydrogen peroxide - H₂O₂, malondialdehyde - MDA) and inflammatory profile (myeloperoxidase - MPO, tumor necrosis factor alpha - TNF - α , interleukin 6 - IL - 6, interferon gamma - IFN - γ and interleukin 10 - IL - 10). After determination of the normality of the data, parametric or non-parametric tests were used, and significance was considered, when $p < 0.05$. Histological analysis showed that SDS (3 and 5% w / v) induced colitis, causing destruction of the crypt architecture and administration with NAC partially restored this damage. In the colon, only moderate colitis (CM group) stimulated SOD in detriment of CAT and GSH that were reduced (this was also verified in severe colitis - CG), where NAC administration had no influence (NACM and NACG). Although H₂O₂ levels were not altered, oxidative damage was evidenced when NAC was offered in severe colitis (\uparrow MDA), which was corroborated by \uparrow TNF- α , even though it was not observed at the histological level. At the renal level, SDS (3% and 5% w / v) increased the CAT requirement, being significant when administered to NAC in severe colitis (NACG). In addition, the NAC improved the endogenous antioxidant capacity (\uparrow GSH), significantly in the moderate colitis - NACM. However, similar to the colon, it caused oxidative damage to membranes (\uparrow MDA), expressive in severe colitis (NACG). In view of the divergent results in the evaluated organs (colon and kidney), the clinical application of NAC, especially in colitis, should be evaluated carefully.

Key words: inflammatory bowel disease, oxidative stress, antioxidant, inflammation, extraintestinal manifestations.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação dos mecanismos envolvidos na manutenção e na progressão do dano oxidativo colônico na colite ulcerativa - XO (xantina oxidase); JC (junção intercelular); PAMP (padrão molecular associado ao patógeno); PRR (receptor de reconhecimento padrão); MDA (malonaldeído); iNOS (óxido nítrico sintase induzível); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); Gpx (glutaciona peroxidase); GSH (glutaciona reduzida); MPO (mieloperoxidase); Ig (imunoglobulina); células epiteliais intestinais (IECs).....30
- Figura 2 - Ativação do inflamossoma *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3* (NLRP3) durante a resposta inflamatória crônica na colite ulcerativa - LPS (lipopolissacarídeo); TLR (receptor toll-like); PAMP (padrão molecular associado ao patógeno); Nf-κB (fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa das células B ativadas); ERONS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*); PYD (domínio pirina); CARD (domínio de recrutamento da caspase); ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain*).....32
- Figura 3 - Estrutura química da *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC) e fornecimento de cisteína para síntese de glutaciona reduzida e formação da glutaciona oxidada.....42
- Figura 4 - Desenho experimental do modelo de colite ulcerativa moderada e grave induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD) - (3% e 5% - m/v, respectivamente) tratados com *N*-acetilcisteína (NAC) – (150 mg kg d⁻¹).....48
- Figura 5 - Fluxograma da eutanásia e retirada dos órgãos. Punção cardíaca (A), perfusão ventricular (B), retirada dos órgãos (C), imersão em salina (0,9 %), pesagem (D) e acondicionamento em microtubos (E).....51
- Figura 6 - Aferição do comprimento do intestino grosso.....52
- Figura 7 - Preparação de extrato de intestino com nitrogênio líquido.....53
- Figura 8 - Análise histopatológica do cólon segundo o grupo experimental: Controle (A), Colite Moderada (B) e Colite moderada tratada com *N*-acetilcisteína (NAC) (C) - Fotomicrografias representativas de seções do cólon de camundongos. Seta preta tracejada (destruição de cripta); seta verde (separação da lâmina própria da base da cripta); e seta preta (preservação da estrutura da cripta). Aumento de 10x (acimas) e aumento de 20x (abaixo). Coloração hematoxilina e eosina (HE).....61
- Figura 9 - Análise histopatológica do cólon segundo o grupo experimental: Controle (A), Colite Grave (B) e Colite grave tratada com *N*-acetilcisteína (NAC) (C) - Fotomicrografias representativas de seções do cólon de camundongos. Seta preta tracejada (destruição de cripta); seta verde (separação da lâmina própria da base da cripta); seta pontilhada azul (estreitamento da muscular da mucosa); e seta preta (preservação da estrutura da cripta). Aumento de 10x (acimas) e aumento de 20x (abaixo). Coloração hematoxilina e eosina (HE).....62
- Figura 10 - Avaliação da ingestão de água (A, B) e do consumo alimentar (C, D), semanal e total, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, *N*-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e *N*-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 %

+ NAC - Resultados expressos em média \pm EP. ** = $p < 0,01$, vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados das figuras A e C. Pós-teste de Dunn's foi aplicado na figura B. Pós-teste de Tukey foi aplicado nos dados da figura D.....64

Figura 11 - Avaliação do ganho ponderal intergrupo de acordo com a fase do experimento (A), total (B) e intragrupo (C), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, N-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e N-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 % + NAC - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados das figuras 11 A e C. Pós-teste de Dunn's foi aplicado na figura 11 B. F0 = antes do tratamento com NAC; F1 = após 30 dias de tratamento com NAC; F2 = após o período de indução da colite moderada e grave (7 dias) concomitante com suplementação com NAC para os grupos NACM e NACG.....65

Figura 12 - Avaliação da glicemia de jejum segundo a fase experimental (A), e intragrupo (B), segundo o grupo de tratamento: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, N-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e N-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 % + NAC - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados. F0 = antes do tratamento com NAC; F1 = após 30 dias de tratamento com NAC; F2 = após o período de indução da colite ulcerativa moderada e grave (7 dias) e fase de tratamento com NAC para os grupos NACM e NACG.....66

Figura 13 - Marcadores redox do cólon, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Tukey foi aplicado para os dados de SOD e Teste de comparação múltipla de Holm-Sidak's; para os demais marcadores foi aplicado o Teste de Dunn.....72

Figura 14 - Marcadores inflamatórios do cólon, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de IL-10; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.....75

Figura 15 - Marcadores redox do rim, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (teste de Tukey).....78

Figura 16 - Marcadores inflamatórios do rim, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana –

SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de IL-10; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.....80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação da formação do radical ânion superóxido.....	29
Esquema 2 - Reação de Fenton (I, II) e Haber-Weiss (III).....	29
Esquema 3 - Reação da formação do HOCl.....	33
Esquema 4 - Reação entre o ânion radical superóxido e o WST-1 formando o WST-1 formazana.....	54
Esquema 5 - Reação da oxidação da GSH e da redução da GSSG.....	56
Esquema 6 - Reação entre o peróxido de hidrogênio e a <i>orto</i> -dianisidina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento do intestino e pesos absoluto e relativo do cólon, rim e baço segundo o grupo estudado (média ± EP) - <i>N</i> -acetilcisteína (NAC).....	69
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição da dieta comercial RHOSTER®.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ABS	Absorvância
AGE	Produtos finais de glicação avançada - <i>Advanced Glycation Ends</i>
AP-1	Proteína ativadora 1
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butil-hidroxitolueno
CARD	Domínio de recrutamento da caspase
CAT	Catalase
CCR	Carcinoma colorretal
COX	Ciclooxigenase
CUI	Colite ulcerativa idiopática
DII	Doença inflamatória intestinal
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DC	Doença de Crohn
DTNB	Ácido 5,5'-bis-ditionitro-2-nitrobenzóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FANUT	Faculdade de Nutrição

GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HE	Hematoxilina-eosina
HLA-B27	Antígeno leucocitário humano
MHC	Moléculas de histocompatibilidade principal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta eficiência - <i>High performance liquid chromatography</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1 - <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IKK	I κ B cinase - <i>inhibitor of κB kinase</i>
IκB	Proteína inibitória kappa B
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferon- γ
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
LTCD4	Linfócitos T CD4 ⁺
LTreg	Linfócitos T reguladores
LPS	Lipopolissacarídeo
LEEO	Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo
LOX	Lipo-oxigenase
MDA	Malondialdeído
MEIs	Manifestações extraintestinais

NAC	<i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
NEM	N-etilmaleimida
NF-κB	Fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa das células ativadas B - <i>Nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NLRP3	Domínio de ligação de nucleotídeo, família rica em conteúdo de leucina, domínio de pirina contendo-3. <i>Nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3</i>
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMPs	Padrão molecular associado ao patógeno - <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Tampão fosfato
PR	Peroxidase de rabanete
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
PYD	Domínio pirina
p-ANCA	Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilo perinuclear
p/v	Porcentagem em massa/volume
S-S	Ligações dissulfeto
-SH	Grupo sulfidril
R-SH	Tiol
SOD	Superóxido dismutase
SREBP	Proteínas de ligação ao elemento de regulação de esterol - <i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSD	Sulfato de sódio dextrana

STAT 3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição - <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TLR	Receptores semelhantes ao Toll, <i>Toll-like receptors</i>
TLR-4	Receptor Toll-like-4, <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1 - <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
4-HNE	4-hidroxinonenal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Entendendo os fatos.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	Doença Inflamatória Intestinal.....	24
2.2	O estresse oxidativo na gênese das complicações da CUI.....	28
2.3	Manifestações extraintestinais, estresse oxidativo e inflamação: Qual o link entre eles?.....	35
2.4	Possíveis aplicações terapêuticas da <i>N</i> -acetilcisteína na colite ulcerativa.....	41
3	OBJETIVOS.....	46
3.1	Objetivo Geral.....	46
3.2	Objetivos Específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	Material e equipamentos.....	47
4.2	Animais de experimentação.....	47
4.3	Desenho experimental.....	47
4.4	Estimativa da ingestão alimentar.....	50
4.5	Glicemia de jejum.....	50
4.6	Eutanásia e coleta dos órgãos.....	51
4.7	Preparação dos extratos teciduais.....	52
4.8	Análises histológicas.....	53
4.9	Análises bioquímicas.....	53
4.9.1	Dosagem de proteínas teciduais.....	53
4.9.2	Determinação dos marcadores de capacidade antioxidante.....	53
4.9.3	Determinação dos marcadores de EO.....	57
4.9.4	Determinação da atividade inflamatória.....	57
4.9.5	Determinação de marcador de dano oxidativo.....	58
4.9.6	Determinação do perfil inflamatório.....	59
4.10	Análise estatística.....	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	Avaliação histológica no cólon.....	60

5.2	Avaliação da ingestão de água com SSD e/ou NAC sobre a ingestão alimentar, ganho ponderal e glicemia de jejum.....	63
5.3	Avaliação do SSD e/ou NAC sobre o comprimento do cólon.....	67
5.4	Avaliação do SSD e/ou NAC sobre os pesos absoluto e relativo dos órgãos.....	68
5.5	Avaliação dos marcadores de atividade inflamatória, capacidade antioxidante e estresse oxidativo em níveis colônico e renal	70
6	CONCLUSÃO.....	81
7	PERSPECTIVAS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal (DII), de caráter crônico e recidivo, caracterizada por contínua inflamação na mucosa do cólon que leva ao aparecimento de suas manifestações clínicas típicas: diarreia sanguinolenta e dor abdominal (GEIER; BUTLER; HOWARTH, 2007; JAKUBOWSKI et al., 2014; YAMADA et al., 2014).

A incidência e a prevalência da colite ulcerativa vêm crescendo significativamente nos últimos anos, principalmente em regiões desenvolvidas como os Estados Unidos, Canadá e Europa, além disso tem-se verificado uma notável expansão nos países em desenvolvimento. No Brasil, os dados ainda são escassos, mas tem-se notificado um aumento no número de casos diagnosticados. Um estudo multicêntrico conduzido por Parente et al., (2018), na região Nordeste, demonstrou aumento significativo da frequência de DII nas últimas duas décadas, com predomínio em adultos jovens, mestiços e brancos, com alto nível educacional e renda, vivendo em áreas urbanas (PARENTE et al., 2018; VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009).

Apesar da etiologia das DIIs ainda não estar totalmente elucidada (BALLESTEROS POMAR et al., 2010; MOURA et al., 2016; SHEN et al., 2018), sabe-se que múltiplos fatores estão envolvidos, incluindo uma complexa interação entre a susceptibilidade genética, resposta imune desregulada, disbiose e componentes ambientais, como a dieta, o tabagismo e o ciclo circadiano (HAJJ HUSSEIN et al., 2008; KNUTSON et al., 2013; MANICHANH et al., 2012). Diversas evidências científicas têm demonstrado que na colite, há uma resposta imunológica descontrolada, contínua e exacerbada que associada ao aumento da permeabilidade intestinal ocasiona um desequilíbrio redox, com elevação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS) – em especial o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – e diminuição dos níveis intracelulares das defesas antioxidantes enzimáticas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx); e a não enzimática, a exemplo da glutatona reduzida (GSH), o que contribui para progressão e manutenção do dano oxidativo à mucosa do cólon (PAVLICK et al., 2002; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

As contínuas respostas inflamatória e oxidativa sobre o epitélio intestinal estão envolvidas na etiologia de suas manifestações clínicas, desde as mais leves, como

diarreia, febre, até as mais graves, incluindo o megacólon tóxico e o carcinoma colorretal (TOMASELLO et al., 2014; WALDNER; NEURATH, 2015). Além disso, o aumento do estresse oxidativo ocasiona o dano epitelial que leva à ulceração da mucosa e à destruição das proteínas que compõem as junções intercelulares, resultando no rompimento de uma das barreiras protetoras do intestino e consequente aumento da permeabilidade, facilitando a entrada de antígenos luminiais bem como a translocação de bactérias patogênicas e seus produtos tóxicos (DENNIS et al., 2005; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014), os quais podem se difundir pela veia porta e causar inflamação em órgãos distantes, principalmente, no fígado, ossos, pele e olhos, caracterizando assim as manifestações extraintestinais (MEIs) da colite (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; VAVRICKA et al., 2011).

A terapêutica clínica atual tem como objetivo induzir e manter a remissão da doença, evitar possíveis complicações e proporcionar uma melhor qualidade de vida aos portadores. Ela é baseada na atenuação do processo inflamatório eminente, consistindo em aminossalicilatos, corticosteroides, imunossupressores e terapia biológica. Entretanto, além de não promover a cura, os medicamentos utilizados acarretam diversos efeitos colaterais que limitam sua adesão. Adicionalmente, ainda 15% precisarão ser submetidos à alguma intervenção cirúrgica, aumentando assim, o risco de morbimortalidade (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; UNGARO et al., 2017).

Nesse sentido, muitas pesquisas vêm investigando a eficácia de substâncias naturais e sintéticas com atividade antioxidante e anti-inflamatória que possam ser empregadas no tratamento da colite. Dentre elas, a *N*-acetilcisteína (NAC) tem demonstrado resultados promissores em diversas doenças, onde a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na sua fisiopatogênese (ANDRADE; MOURA; MARQUES, 2015; MOURA et al., 2015; PEI et al., 2018).

A NAC é um pró-fármaco da cisteína e atua como precursora de GSH, um dos mais eficazes antioxidantes endógenos conhecidos (ALDINI et al., 2018; PEI et al., 2018). Adicionalmente, por ser um tiol (SH) age diretamente, neutralizando espécies reativas como o radical hidroxila (HO[•]) e o ácido hipocloroso (HOCl) e reduzindo ligações dissulfeto em proteínas cisteiniladas, reabastecendo assim, o pool intracelular de tióis (SAMUNI et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

Além de seu papel antioxidante, a NAC apresenta ação anti-inflamatória modulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias como, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 6 e IL-1 β , mediante a supressão da via de ativação do fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa das células B ativadas (NF- κ B), o qual é responsável pela transcrição gênica de enzimas e citocinas envolvidas na resposta inflamatória, e inibindo a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos (AJONK; IESS; OMMER, 2002; OKA et al., 2000).

ENTENDENDO OS FATOS

Desde 2013, o grupo de pesquisa de Estresse Oxidativo do Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO/UFAL), dirigido pela Professora Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart, do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB/UFAL), em colaboração com a Professora Dr^a Fabiana Andrea Moura, da Faculdade de Nutrição (FANUT/UFAL), vem estudando e investigando novas terapêuticas com perfil antioxidante e anti-inflamatório em modelos experimentais de DIIs, com ênfase na colite.

Vários trabalhos publicados pelo grupo nesta linha de pesquisa têm demonstrado o papel de compostos naturais e sintéticos no contexto do estresse oxidativo e da inflamação, incluindo a NAC. Uma revisão sistemática realizada por De Andrade et al. (2015) referente às possibilidades terapêuticas da NAC nas doenças hepáticas, concluiu que, apesar do uso desse fármaco apresentar ainda controvérsias quanto ao seu efeito protetor, a maioria dos estudos mostrou que houve a melhora de pelo menos um biomarcador de estresse oxidativo e de inflamação. Adicionalmente, um trabalho conduzido e publicado por Moura et al. (2016), em ratos com colite leve induzida por sulfato de sódio dextrana (SSD) (2% m/v), a suplementação de NAC (via oral) em uma formulação dietética exerceu ações antioxidante e anti-inflamatória efetivas, pois foi verificada uma diminuição dos marcadores de dano celular e de estresse oxidativo, bem como de atividade inflamatória. Embora a colite esteja associada à MEI, principalmente no fígado, este achado não foi corroborado no referido estudo. Isto pode ser atribuído à concentração de SSD ofertada (2 % m/v) que induz a doença numa intensidade leve, uma vez que outras evidências científicas já comprovaram o dano hepático, porém em graus mais severos de manifestação da colite. Além disso, outros órgãos não foram avaliados para refutar a hipótese de MEI e sua repercussão sobre os biomarcadores estudados, bem como os efeitos de uma

oferta prévia de NAC à indução da colite em sua forma moderada e grave, sobre o fígado e outros órgãos não clássicos para o aparecimento de MEI. Em mestrado anterior, os efeitos da NAC sobre o tecido hepático, em modelos de colite moderada e grave, já foi defendida e aguarda finalização desses resultados para publicação.

Neste contexto, considerando que a colite ulcerativa constitui uma enfermidade em que o estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos na sua patogênese, sintomatologia e progressão clínica e que esta condição pode acometer outros órgãos e sistemas, a avaliação dos efeitos de fármacos como a NAC, sob o ponto de vista antioxidante e anti-inflamatório, torna-se imprescindível para incentivar o seu uso como uma possível estratégia terapêutica eficaz e segura na colite. Portanto, este trabalho visou investigar os efeitos da administração de NAC, em níveis intestinal e extraintestinal em um modelo experimental de colite ulcerativa moderada e grave induzida por SSD a 3% e 5% (p/v), respectivamente. Concomitante ao estudo experimental, foi desenvolvida uma revisão da literatura acerca da participação da microbiota e das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) na gênese das MEIs, estando o artigo pronto para submissão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença Inflamatória Intestinal

As DIIs compreendem a Colite ulcerativa e a Doença de Crohn (DC), as quais são desordens gastrointestinais crônicas e recorrentes, cujo curso clínico é caracterizado por períodos de exacerbação e remissão da sintomatologia (JAKUBOWSKI et al., 2014; ORDÁS et al., 2012).

A colite acomete a mucosa e submucosa do intestino grosso, principalmente as regiões do reto e do sigmoide e, progride de forma proximal, causando ulcerações difusas de diferentes intensidades. Seus principais sintomas são a diarreia com a presença de muco e sangue, dores abdominais, tenesmo e urgência para evacuar (MALATY; HOU; THIRUMURTHI, 2010; PEYRIN-BIROULET et al., 2015).

A DC apresenta caráter transmural e perfil segmentar com lesões granulomatosas descontínuas que podem atingir qualquer parte do trato gastrointestinal, sendo mais prevalente na porção ileocólica. Semelhante à colite, seu quadro clínico compreende diarreia sanguinolenta, dor abdominal, além de perda de peso não intencional e febre (BAUMGART; SANDBORN, 2012; GEIER; BUTLER; HOWARTH, 2007).

As DIIs acometem igualmente ambos os sexos (BERNSTEIN et al., 2006; COSNES; CORTOT, 2011) e têm dois picos de incidência, sendo o primeiro no adulto jovem (20-40 anos) e mais tardiamente, acima dos 60 anos. Em contrapartida, a DC pode surgir de forma mais precoce na população pediátrica (HØVIK et al., 2013; SHAPIRO et al., 2016; TORRES et al., 2012).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que há aumento na incidência dessas enfermidades, destacando-se os países localizados no norte da Europa (24.3 a cada 100.000), Canadá (19.2 a cada 100.000) e Austrália (17.4 a cada 100.000) (BERNSTEIN et al., 2006; MOLODECKY et al., 2012). Taxas altas de prevalência estão presentes na Europa (505 a cada 100000), Canadá (248 a cada 100 000) e nos Estados Unidos (214 a cada 100 000). Apesar de predominar em países desenvolvidos, têm-se observado uma tendência crescente no número de novos casos na Ásia, África do Norte, Oriente médio e América do Sul (BENGTSON et al.,

2009; COSNES; CORTOT, 2011). Este fato pode ser decorrente das transformações socioeconômicas e demográficas que ocorreram nos últimos anos.

Acreditava-se, anteriormente, que as DII eram inerentes ao caucasianos, porém a identificação de etnias com um risco maior para desenvolver a doença, a exemplo dos judeus, e do aparecimento incidente em asiáticos, quando comparados a outras populações, demonstram que estas características variam em cada população estudada, sugerindo a interação entre fatores genéticos e ambientais (ANANTHAKRISHNAN, 2015; BERNSTEIN et al., 2006).

No Brasil, dados de estudos pontuais mostram baixa prevalência da colite e da DC, porém, se percebe um aumento significativo da incidência nos últimos anos (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009). No que se refere à região Nordeste, Parente et al., (2018) desenvolveram um estudo multicêntrico para analisar a frequência, características demográficas e fenótipos clínicos das DIIs, em pacientes acompanhados em hospitais universitários de cada estado, os quais são centros de referência para tratamento dessas doenças. Foi demonstrado um aumento expressivo na frequência de novos casos diagnosticados nas últimas décadas, principalmente no final do século XX e no início do século XXI, com um discreto predomínio da colite sobre DC. Dados deste estudo indicaram uma maior prevalência na população jovem, dentre estes, mestiços e brancos, porém sem distinção de gênero. Adicionalmente, houve uma notável expansão das DIIs em áreas urbanas, acometendo grupos com maior poder aquisitivo e elevado nível de escolaridade. Os autores descrevem que este constitui um fato bastante inusitado, considerando os baixos índices e indicadores socioeconômicos da região. Acrescentam ainda, que a associação encontrada entre as DII e a urbanização não é atribuída somente ao melhor acesso da população aos serviços de saúde, mas principalmente à influência de fatores ambientais inerentes a esta área (PARENTE et al., 2018).

A etiologia de ambas as doenças é multifatorial, envolvendo uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais, imunes e a microbiota. O aumento da permeabilidade intestinal decorrente de disfunção da barreira colônica, permite a entrada de antígenos luminiais na lâmina própria e na submucosa, os quais induzem uma resposta imunológica desregulada, intensa e sustentada, mediada por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T ativados, caracterizada pelo aumento dos níveis de ERONs, em especial o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o H_2O_2 e de citocinas pró-

inflamatórias (TNF- α , IL-6), que por sua vez, atuam causando extensa destruição tecidual que culmina no aparecimento das principais manifestações clínicas acima citadas (ALIPOUR et al., 2015; REZAIIE; PARKER; ABDOLLAHI, 2007; YAMADA et al., 2014).

Para se proteger dos efeitos deletérios causados pelas ERONS, o corpo humano dispõe de um potente sistema de defesa antioxidante que compreende enzimas como SOD, CAT, GPx e peroxirredoxina e outros não-enzimáticos como, GSH, outros tióis e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), além do ácido ascórbico e α -tocoferol. A SOD promove a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e água. Em condições fisiológicas, o H_2O_2 formado é decomposto nos peroxissomos e no citoplasma, pela ação da CAT e/ou peroxidases, respectivamente, principalmente a GPx, que catalisa essa reação por meio da oxidação da GSH, na presença de NADPH. Adicionalmente, a GSH está envolvida na remoção de outros peróxidos como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e serve de substrato para outras enzimas antioxidantes endógenas, a exemplo da glutathione-S-transferase e da peroxirredoxina. Ainda, atua diretamente neutralizando radicais livres, apresentando um importante papel na destoxificação celular e na proteção das biomoléculas aos ataques eletrofílicos (HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008; PAVLICK et al., 2002).

Na colite está presente um desequilíbrio redox, caracterizado pela produção excessiva de ERONS associado à uma diminuição da capacidade antioxidante total, principalmente em nível colônico, onde as reservas são relativamente baixas, o que configura o estresse oxidativo. Achitei et al., (2013) demonstraram que pacientes com DII apresentam defesa antioxidante reduzida (SOD e GPx) e acentuada peroxidação lipídica, avaliada pelos níveis de MDA no soro, mesmo naqueles em fase de remissão. Jena et al. (2012) também descrevem o papel do estresse oxidativo na ativação das vias inflamatórias e influência na defesa antioxidante.

Neste cenário, o processo inflamatório crônico mantido pelos elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, ERONS e outros mediadores celulares, resulta em acentuada peroxidação lipídica, a qual está associada ao agravamento e progressão do dano tecidual e conseqüente risco de complicações inerentes à colite, como fístulas, abscessos, estenose, megacólon tóxico, além do aparecimento de adenocarcinoma (CEDERHOLM et al., 2017; JENA; TRIVEDI; SANDALA, 2012; WALDNER; NEURATH, 2015). Adicionalmente, o rompimento das barreiras intestinais torna o

organismo susceptível ao ataque de diversos agentes antigênicos advindos da luz intestinal, principalmente das bactérias e de seus produtos, como o lipopolissacarídeo (LPS) (DENNIS et al., 2005; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014), os quais podem se difundir via vasos linfáticos mesentéricos e veia porta, ocasionando o recrutamento de mais células do sistema imune e levando o processo inflamatório para outros sítios, caracterizando assim, as MEIs das DIIs (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; VAVRICKA et al., 2011).

Os fármacos utilizados atualmente para o tratamento das DII pertencem às classes dos aminossalicilatos, corticosteroides, imunossupressores, conjuntamente à terapia biológica (anti-TNF- α). De um modo geral, o arsenal terapêutico propõe induzir e manter o portador na fase assintomática da doença, evitando eventuais complicações e melhorando a qualidade de vida. Entretanto, o uso destes medicamentos causa efeitos colaterais que limitam sua eficácia, como náuseas, vômitos, dor de cabeça, e a longo prazo, resistência à insulina e hepatotoxicidade (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; UNGARO et al., 2017). Adicionalmente, alguns estudos têm sugerido efeito neurotóxico resultante da terapia biológica, causando sintomas semelhantes à esclerose múltipla (DEEPAK; STOBAUGH; EHRENPREIS, 2013; VAN ASSCHE et al., 2005). Além da intervenção medicamentosa, procedimentos cirúrgicos que vão desde a ressecção de áreas estenosadas, correções de fístulas até cirurgias mais invasivas, como a colectomia total, podem ocorrer em até 15% dos portadores e aumenta o risco de mortalidade pós-cirúrgica (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2014; UNGARO et al., 2017).

Diante desse contexto, vários modelos de indução de colite são utilizados para mimetizar a doença em modelos animais e permitir a compreensão de sua fisiopatogênese, bem como investigar e justificar tratamentos mais eficazes e seguros. Uma das formas mais utilizadas, consiste na indução química com a adição de SSD na água de beber dos animais, durante sete dias consecutivos. O SSD é um polissacarídeo fosfatado, de alto peso molecular, que contém até três grupos sulfatos por molécula de glicose. Age diretamente no cólon, causando lesão epitelial em sua porção médio-distal e reproduzindo os sinais e sintomas característicos da colite em humanos, como fezes sanguinolentas e perda de peso, além de alterações histológicas típicas, que incluem destruição e desarranjo da arquitetura das criptas e

infiltrado inflamatório (ALIPOUR et al., 2015; DAMIANI et al., 2007; DIAZ-GRANADOS et al., 2000).

Neste estudo, foi utilizado o SSD (40.000 Da), que foi administrado nas concentrações de 3 e 5% (m/v) para induzir a colite ulcerativa em sua forma de apresentação moderada e grave, respectivamente, bem como para investigar a possível ocorrência de MEI, como já corroborado por Farombi et al. (2016), que identificaram danos no tecido hepático com o uso de SSD a 5%, durante 5 dias. Por ser uma molécula de alto peso molecular, o SSD não atravessa a membrana celular e é fracamente absorvido, causando assim efeitos deletérios aos colonócitos e prejudicando a integridade da barreira, que já podem ser observados no primeiro dia, após a indução (FAROMBI et al., 2016).

2.2 O estresse oxidativo na gênese das complicações da colite

Como já descrito anteriormente, a interação entre o sistema imune, fatores ambientais e componentes da microbiota intestinal desencadeiam uma resposta inflamatória crônica e exacerbada, em indivíduos geneticamente predispostos, a qual é responsável pela manutenção da agressão contínua à mucosa colônica (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; REZAIE; PARKER; ABDOLLAHI, 2007).

A infiltração significativa de neutrófilos no interstício da mucosa e lâmina própria é um evento característico da fase aguda da colite. Essas células da imunidade inata atuam na fagocitose de partículas antigênicas, por meio da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase na membrana do fagossomo e subsequente geração de uma significativa quantidade do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), como representado no esquema 1, que age diretamente, desestabilizando o metabolismo microbiano, além de ser rapidamente convertido em H_2O_2 pela ação da SOD (PAVLICK et al., 2002; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

O $O_2^{\cdot-}$ formado a partir da adição de um elétron ao oxigênio molecular, não somente é proveniente da ativação do complexo NADPH oxidase, mas também da reação envolvendo a xantina oxidase presente na membrana celular. Essa espécie é altamente reativa e instável, com tempo de meia-vida curto, o que ocasiona efeitos lesivos pronta- e localmente. Em contrapartida, o H_2O_2 se difunde livremente propagando danos em compartimentos mais distantes. Adicionalmente, o radical hidroxiperoxila, a forma protonada do $O_2^{\cdot-}$, pode iniciar a peroxidação lipídica, gerando

produtos pró-inflamatórios e tóxicos que apresentam propriedade mutagênicas e carcinogênicas (PAVLICK et al., 2002; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

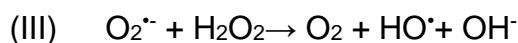
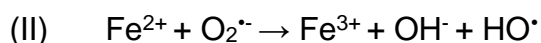
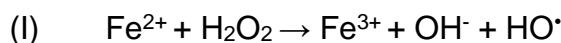
Essas espécies reativas de oxigênio (EROS) também se comportam como sinalizadoras, recrutando outros componentes do sistema imune até o local da lesão, como os macrófagos, células *natural killers* e linfócitos T (BUANNE et al., 2007; FRANSEN et al., 2012; PAVLICK et al., 2002). Em adição ao infiltrado inflamatório, a injúria tecidual requer uma maior quantidade de adenosina trifosfato (ATP) para o processo cicatricial, levando ao aumento acentuado do consumo de oxigênio na mitocôndria, via cadeia transportadora de elétrons e consequente geração descontrolada de EROs (DAMIANI et al., 2007).

Esquema 1 - Reação da formação do radical ânion superóxido.



O $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , na presença de metais de transição, como o íon ferroso (Fe^{2+}), são facilmente convertidos no radical HO^{\cdot} por meio da reação de Fenton ou de Haber-Weiss (esquema 2) (FRANSEN et al., 2012; PAVLICK et al., 2002).

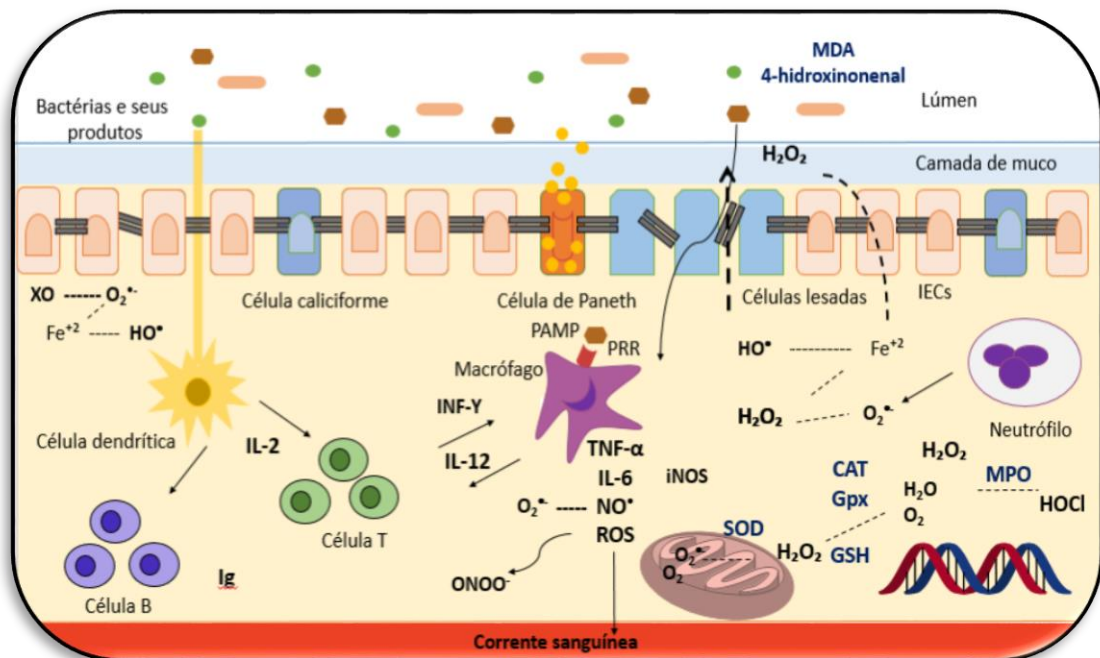
Esquema 2 - Reação de Fenton (I, II) e Haber-Weiss (III).

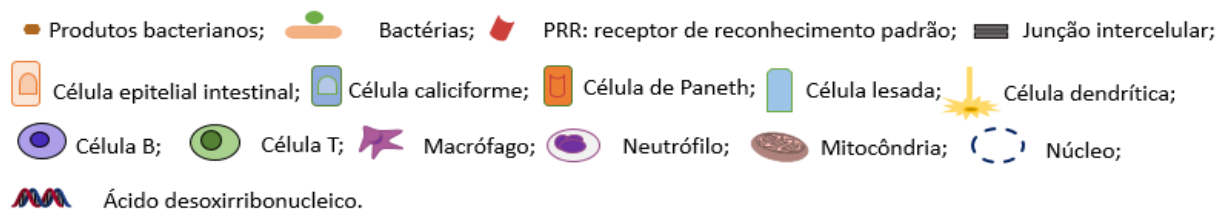


O radical hidroxila é uma espécie altamente reativa, devido à sua rápida taxa de difusão (10^7 - $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), oxida indiscriminadamente proteínas e lipídios, levando à quebra das ligações peptídicas das junções intercelulares e a alterações na arquitetura e fluidez da membrana, respectivamente, causando a disfunção da barreira epitelial (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; SAMUNI et al., 2013). O aumento da permeabilidade intestinal resultante torna o ambiente propício à translocação bacteriana, que consiste na entrada de bactérias, em sua maioria patogênicas e de seus produtos tóxicos na submucosa, até então estéril. Esse evento

resulta no reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), a exemplo dos *Toll-like* (TLR), em células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e os macrófagos, que interagem e ativam linfócitos com perfil Th1 e linfócitos B, que promovem a secreção de suas citocinas e produtos correspondentes, como TNF- α , interferon gamma (IFN- γ), IL-6, linfocinas e imunoglobulinas (Ig), além de estímulo à síntese de moléculas co-estimuladoras que contribuem para manutenção do arsenal inflamatório (Figura 1) (HAJJ HUSSEIN et al., 2008; KNUTSON et al., 2013; PAVLICK et al., 2002).

Figura 1 - Representação dos mecanismos envolvidos na manutenção e na progressão do dano oxidativo colônico na colite ulcerativa - XO (xantina oxidase); JC (junção intercelular); PAMP (padrão molecular associado ao patógeno); PRR (receptor de reconhecimento padrão); MDA (malonaldeído); iNOS (óxido nítrico sintase induzível); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); Gpx (glutaciona peroxidase); GSH (glutaciona reduzida); MPO (mieloperoxidase); Ig (imunoglobulina); células epiteliais intestinais (IECs).



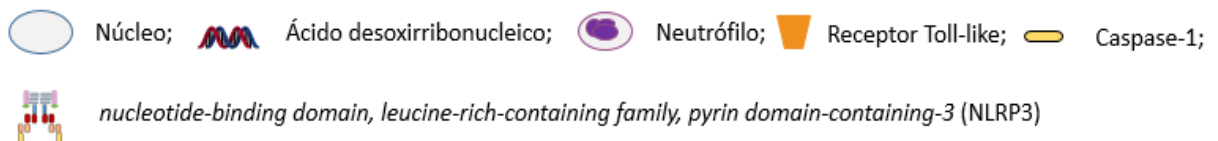
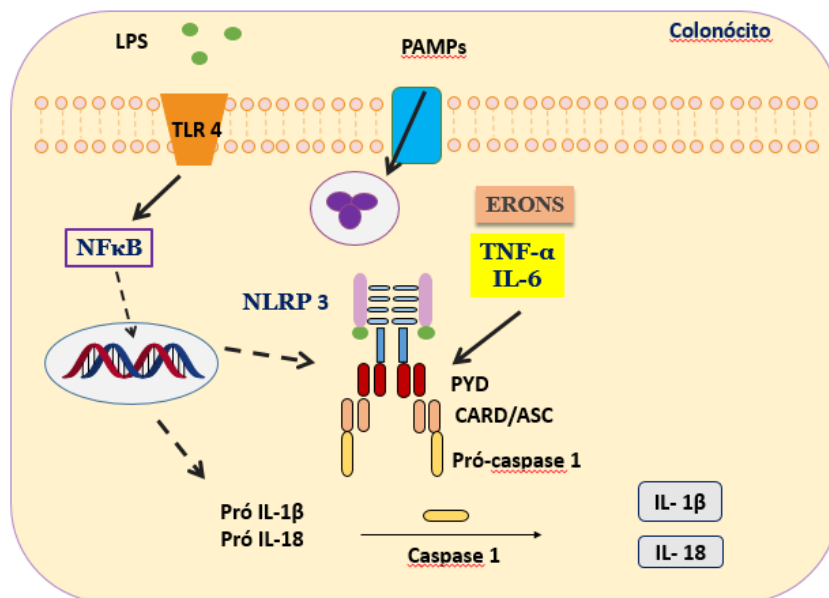


Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

Adicionalmente, a elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias, EROs e antígenos luminais participam diretamente da super-ativação do inflamossoma NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*), o qual constitui um complexo multiproteico intracelular envolvido na maturação e na secreção de IL-1 β e IL-18, que são citocinas com perfil inflamatório, via atividade da caspase-1 (Figura 2) (ITANI et al., 2016; WEI et al., 2017). Por outro lado, a resposta imune envolvida na indução da resposta anti-inflamatória, como a secreção de IL-10 por linfócitos T CD4 (LTCD4) e na manutenção da tolerância imunológica desempenhada pelos linfócitos T reguladores (Treg) está reduzida ou inibida (MAYNE; WILLIAMS, 2013; PAVLICK et al., 2002).

As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) também participam do processo fisiopatológico das DIIs. Estas são formadas constantemente pela ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), que é produzida por células epiteliais e imunes presentes na mucosa intestinal inflamada, somente em condições de estresse. O radical óxido nítrico (NO \cdot) derivado da iNOS, pode reagir com o O $_2^{\cdot-}$ e gerar peroxinitrito (ONOO $^-$), que por sua vez, atua causando danos aos lipídeos da membrana e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Adicionalmente, o ONOO $^-$ e o NO $_2$, provenientes do estresse oxidativo dependente de NO \cdot , podem se ligar ao aminoácido tirosina formando nitrotirosina, a qual foi associada à infiltração neutrofílica (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Figura 2 - Ativação do inflamossoma *nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3* (NLRP3) durante a resposta inflamatória crônica na colite ulcerativa - LPS (lipopolissacarídeo); TLR (receptor toll-like); PAMP (padrão molecular associado ao patógeno); Nf-κB (fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa das células B ativadas); ERONS (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3*); PYD (domínio pirina); CARD (domínio de recrutamento da caspase); ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain*).



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

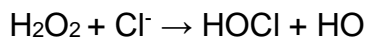
Diante disso, percebe-se que as ERONS e as citocinas pró-inflamatórias apresentam papel central na iniciação, progressão e manutenção do dano colônico, principalmente mediante a ativação de vias de sinalização molecular, envolvendo o Nf-κB (JENA; TRIVEDI; SANDALA, 2012; YASUKAWA et al., 2012).

O Nf-κB é um fator de transcrição heterodimérico, composto por duas subunidades (p50/p65) presente no citoplasma em sua forma inativa ligado à uma proteína inibitória (IκB). Estímulos como o aumento de citocinas pró-inflamatórias,

ERONs e LPS levam à ativação do Nf-κB, por meio da fosforilação de IκB pelo complexo IκB quinase (IKK), o qual é posteriormente ubiquitinado pela ação da ubiquitina ligase e degradado pelo complexo proteossoma 26S. Essa dissociação permite a translocação do Nf-κB até o núcleo, onde se liga em regiões promotoras de genes, alvos responsáveis pela transcrição de moléculas envolvidas na modulação da resposta imune e inflamatória, como TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-8, além de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), bem como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a ciclooxygenase 2 (COX-2) (Figura 2) (AJONK; IESS; OMMER, 2002; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; YASUKAWA et al., 2012).

Neutrófilos e monócitos ativados, além da secreção de O₂^{•-}, estão associados à formação do ácido hipocloroso (HOCl) proveniente da reação entre o H₂O₂ e os íons cloreto (Cl⁻), pela ação da mieloperoxidase liberada por essas células (esquema 3). O HOCl é um potente agente oxidante que reage rapidamente de maneira inespecífica com ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), tióis, nucleotídeos, aminoácidos aromáticos e alifáticos, e compostos nitrogenados, causando dano oxidativo às biomoléculas, principalmente à bicamada fosfolipídica da membrana e induzindo efeito citotóxico (HOY et al., 2002; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Esquema 3 - Reação da formação do HOCl



Concomitantemente, ocorre a liberação de ácido araquidônico da membrana celular via ativação da fosfolipase A2 e subsequente produção de seus mediadores eicosanoides inflamatórios, pela ação da COX-2 e lipoxigenase 2 (LOX 2), além da indução do fator ativador de plaquetas (PAF), que em associação com o aumento da citocinas pró-inflamatórias e ERONs e, redução do óxido nítrico (NO) dos vasos, estão envolvidos na disfunção endotelial e na hipercoagulabilidade, que propicia a ocorrência de eventos tromboembólicos que são inerentes aos pacientes com DII (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014; ZEZOS; KOUKLAKIS; SAIBIL, 2014). Além disso, a ativação da iNOS e da COX-2 contribuem com a agressão tecidual por meio do aumento dos níveis de seus produtos tóxicos e do prejuízo do sistema antioxidante (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

As biomembranas e as lipoproteínas, por serem ricas em AGPI, tornam-se susceptíveis ao ataque por ERONs. Estas se ligam à porção hidrofóbica dos ácidos graxos causando dano oxidativo e consequentes alterações na estrutura, permeabilidade e fluidez da membrana, bem como levam à geração de produtos reativos que podem ocasionar efeitos lesivos em outros compartimentos celulares (CATALÁ, 2009). Os produtos advindos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HE), podem se ligar ao centro nucleofílico de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, gerando produtos finais de glicação avançada (AGE – Advanced Glycation Ends Products), os quais participam da ativação de fibroblastos e da polarização de macrófagos para o perfil M1, induzindo uma resposta pró-fibrótica e pró-inflamatória (ALDINI et al., 2014, 2018; CATALÁ, 2009). Este processo contribui para o surgimento de algumas complicações observadas nos pacientes com colite, como estenose, abscessos e fístulas. Além disso, o dano oxidativo contínuo, ocasionado pelas espécies reativas ao DNA, pode estimular vias de sinalização moleculares responsáveis pela iniciação e progressão do processo carcinogênico, contribuindo para o risco elevado de câncer colorretal (CCR) apresentado pelos pacientes que apresentam colite, quando comparados à população geral, cujos mecanismos envolvidos se relacionam à ativação da via do *Nf-κB/TNF-α/Signal transducers and activator of transcription protein (STAT-3)* (JENA; TRIVEDI; SANDALA, 2012; TOMASELLO et al., 2014; WALDNER; NEURATH, 2015).

As ERONs também contribuem para destruição da camada de muco, visto que agem, oxidando a glicoproteína mucina. Ademais, o $O_2^{\cdot-}$ e o HOCl ocasionam a remoção de Fe^{2+} da ferritina, propiciando a formação de HO^{\cdot} e de seus efeitos deletérios. O sangramento retal característico da colite, ainda torna disponíveis grandes quantidades de ferro provenientes da hemólise, o que contribui para a produção elevada de HO^{\cdot} e aumento do estresse oxidativo (AJONK; IESS; OMMER, 2002).

Adicionalmente, as ERNs estão envolvidas na ativação das vias inflamatórias, onde foi verificado que o NO^{\cdot} estimula a produção de $TNF-\alpha$ e a expressão de ICAM-1 e P-seletiva, no cólon médio e distal, que induzem o recrutamento e infiltração de neutrófilos. Estas células da imunidade inata, por sua vez, estimulam os mecanismos

para ativação do Nf- κ B e AP-1, intensificando dessa forma, a resposta inflamatória e o dano tecidual (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Além do efeito direto, as ERONs podem atuar indiretamente causando lesão tecidual por meio da inativação dos inibidores de proteases extracelulares, tais com o inibidor (alfa) α -1-protease e a α 2-macroglobulina, e ativação de enzimas proteolíticas, permitindo, desta forma, a ação desregulada de elastases, collagenases e outras metaloproteinases, responsáveis pela degradação das organelas e da matriz intersticial da mucosa (AJONK; IESS; OMMER, 2002).

2.3 Manifestações extraintestinais da Doença inflamatória intestinal, estresse oxidativo e inflamação – qual a relação entre eles?

O processo inflamatório crônico, além de propiciar o aparecimento de complicações já discutidas, leva ao rompimento de todas as barreiras intestinais e torna o organismo susceptível às manifestações da doença em nível sistêmico (MEI) visto que, a ausência das defesas propicia a difusão de antígenos luminiais, via corrente sanguínea e vasos linfáticos mesentéricos adjacentes em direção a outros órgãos, conduzindo todo o arsenal inflamatório, inicialmente restrito ao cólon, e causando efeitos deletérios (OLPIN et al., 2017; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

As MEIs são desordens inflamatórias causadas por mecanismos semelhantes àqueles direcionados ao intestino e referidas em até um terço dos pacientes com colite. Devido às fases de oscilação da doença entre remissão e ativação, essas repercussões contribuem significativamente com a morbimortalidade, além disso, estudos de base populacional têm relatado que o surgimento de MEIs está diretamente associado à extensão da lesão colônica (OLPIN et al., 2017; UNGARO et al., 2017). Até 50% dos pacientes com DII apresentam um tipo de MEI até mesmo antes do diagnóstico (HARBORD et al., 2016).

As principais MEIs compreendem as hepatobiliares, osteoarticulares, dermatológicas e oftalmológicas (OLPIN et al., 2017; UNGARO et al., 2017), porém há relatos na literatura que demonstram o acometimento de outros órgãos, tais como o coração (WU et al., 2017), os rins (CORICA; ROMANO, 2015) e o cérebro (MORÍS, 2014), todas associadas ao EO e ao perfil inflamatório.

2.3.1 Manifestações hepatobiliares

A colangite esclerosante primária constitui a principal repercussão hepatobiliar e na MEI mais comum, haja vista a íntima comunicação do intestino e do fígado, via veia porta. Os antígenos luminais e produtos bacterianos, em particular o LPS, provenientes da luz intestinal ligam-se em seu receptor específico TLR4 em células dendríticas hepáticas, cuja interação resulta na ativação das células de Kupffer. Estas, por sua vez, secretam citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e EROs que estimulam as células estreladas a assumirem aspecto miofibroblástico e iniciarem um processo fibrótico nos sinusóides hepáticos. Essa contínua fibrogênese causa lesão nos hepatócitos e vias biliares, e pode levar ao aumento das transaminases, bem como ao aparecimento de colestase e da colangite esclerosante primária (BAFFY, 2009; REYES-GORDILLO; SHAH; MURIEL, 2017).

Além da deposição de colágeno e elastina na matriz extracelular, ocorre a síntese de outros mediadores inflamatórios e recrutamento de outras células do sistema imune, o que induz a ativação do Nf- κ B e da proteína ativadora 1 (AP-1), mecanismo que culmina na produção de maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-1 β , que estão envolvidas na gênese da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (BAFFY, 2009).

Essas citocinas propiciam o aumento da expressão da proteína de ligação ao elemento de regulação de esterol (Sterol Regulatory Element-Binding Protein – SREBP), associada à membrana, a qual é responsável pela transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lipídios e posterior aparecimento de esteatose. Adicionalmente, esse microambiente inflamatório estimula mais citocinas, ERONS e quimiocinas, bem como de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e de iNOS (CARTER-KENT; ZEIN; FELDSTEIN, 2008).

Os produtos bacterianos e as alterações metabólicas inerentes da colite podem causar dano hepático pelo quadro de hiperglicemia e aumento da resistência insulínica, os quais favorecem o desequilíbrio redox no órgão (MOSCHEN; KASER; TILG, 2013).

Diante disso, o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação como mediadores das lesões hepatobiliares desencadeadas pela colite, parecem estar cada vez mais evidentes.

2.3.2 Manifestações osteoarticulares, dermatológicas e oftalmológicas

Essas manifestações ocorrem em até um quarto dos pacientes com DII e podem surgir antes mesmo do diagnóstico da colite, além de se correlacionar ou não com a atividade da doença (OLPIN et al., 2017). As principais formas de apresentação osteoarticulares, cutâneas e oftalmológicas são: espondilite anquilosante (ROSENBAUM et al., 2014), pioderma gangrenoso (GREUTER; NAVARINI; VAVRICKA, 2017) e uveíte anterior (MADY; GROVER; BUTRUS, 2015), respectivamente.

Apesar dos mecanismos ainda não serem completamente compreendidos, sabe-se que a presença do antígeno leucocitário humano B27 (HLA-B27) é considerado o principal fator de risco no aparecimento destas manifestações (PIMENTEL-SANTOS et al., 2013). Contudo, somente o fator genético é incapaz de elucidar as vias fisiopatológicas envolvidas, sugerindo então, o envolvimento de fatores externos. Tem sido proposto que os antígenos advindos da luz intestinal podem formar imunocomplexos circulantes e se depositar nestes órgãos, causando resposta inflamatória e aumento da produção de ERONs, os quais são responsáveis pelas lesões características (LIN et al., 2014; YANG et al., 2016).

Na espondilite anquilosante, muitos estudos têm reportado que a disbiose tem papel central na resposta inflamatória observada. Alterações na permeabilidade intestinal, estímulo do sistema imune e mimetismo molecular têm sido propostos como possíveis mecanismos (SCHER; LITTMAN; ABRAMSON, 2016). Como já foi visto, o aumento da permeabilidade observado na colite, permite que o LPS, por exemplo, adentre a corrente sanguínea e cause inflamação sistêmica, bem como se difunde para o líquido sinovial (CICCIA; FERRANTE; TRIOLO, 2016). Yang et al. (2016) sugerem que níveis elevados de LPS e de ácidos graxos ligados à proteína podem ser característicos das manifestações osteoarticulares, os quais têm sido correlacionados à permeabilidade do intestino. Além disso, a disbiose induz ao fenótipo M1 nos macrófagos, que são responsáveis pelo aumento da produção de

citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-12 (VANDOOREN et al., 2009; YANG et al., 2016).

Dados limitados provenientes de imuno-histoquímica e da análise de proteínas em tecido necrosado no pioderma gangrenoso, têm demonstrado uma superexpressão das vias do TNF- α /Nf- κ B e do STAT3, além de altos níveis de citocinas com perfil inflamatório, tais como a IL-8, IL-17 e IL-1 β (GREUTER; NAVARINI; VAVRICKA, 2017).

Estudos sobre genotipagem nas DIIs levantam a hipótese de que a positividade para o gene HLA-B27, o qual codifica moléculas de histocompatibilidade principal tipo I e II (MHC I e II) na superfície de células apresentadoras de antígeno, torna o indivíduo susceptível à disbiose. Esta, por sua vez, como já referido neste trabalho, quebra a homeostase entre a microbiota do hospedeiro e a resposta imune regulada, levando ao rompimento da integridade e consequente disfunção da barreira epitelial, permitindo então que antígenos tóxicos, via corrente sanguínea, se difundam até a íris, e causem possíveis inflamações oculares, como a uveíte (COSTELLO et al., 2015; LIN et al., 2014). Adicionalmente, o gene do anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos perinucleares (p-ANCA) apresentou-se elevado em pacientes com manifestações oftalmológicas idiopáticas e história familiar de DII (ABBASIAN et al., 2012). Cabe ressaltar que o estresse oxidativo, identificado através da elevação dos níveis de MDA no humor aquoso e da redução na defesa antioxidante (SOD, CAT e GPx), já foi confirmado em um modelo de uveíte anterior induzida por endotoxina, (RAHMAN; BISWAS, 2004), o que reforça o estreito elo entre disbiose/estresse oxidativo e nitrosativo/inflamação/permeabilidade intestinal e as MEIs da colite.

Portanto, percebe-se que há o envolvimento de uma articulada interação entre as vias da resposta inflamatória e que, embora o estresse oxidativo ainda não seja bem estudado no contexto das MEIs, os trabalhos apresentados constatarem sua participação nestas manifestações sistêmicas, sendo necessários estudos adicionais que elucidem seu papel.

2.3.3 Manifestações cardíacas

Pacientes com DII apresentam risco elevado de doença arterial coronariana que, em parte, pode ser atribuído a uma maior susceptibilidade para ocorrência de eventos tromboembólicos. Fatores adicionais vêm sendo investigados e sugere-se

que o risco de aterosclerose e de outras doenças cardiovasculares nestes pacientes esteja associado à disfunção endotelial, ocasionada pela inflamação sistêmica e o estresse oxidativo (WU et al., 2017).

Os níveis sanguíneos elevados de citocinas pró-inflamatórias que incluem TNF- α , IL-1, IL-6 e proteína C reativa, contribuem para disfunção endotelial caracterizada por hiperplasia das células musculares lisas vasculares e diminuição da produção de NO, resultando na redução do relaxamento do vaso (SCHINZARI et al., 2008). Além disso, o aumento do perfil inflamatório induz a infiltração acentuada de leucócitos, principalmente neutrófilos, nos vasos sanguíneos, levando a alterações no fenótipo das células do músculo liso, as quais produzem metaloproteinases de matriz, colagenases e elastases que destroem as fibras de elastina e colágeno, formando fragmentos mais rígidos que induzem ao processo aterosclerótico (SCALDAFERRI et al., 2009; SCHINZARI et al., 2008). Além disso, durante a inflamação crônica, vias de sinalização de TNF- α induzem a expressão de marcadores de osteoblastos nas células endoteliais, permitindo a ocorrência de respostas que acarretarão em mudanças na calcificação e em elasticidade vascular reduzida, levando ao enrijecimento arterial e subsequente doença arterial coronariana e eventual insuficiência cardíaca (WU et al., 2017).

2.2.4 Manifestações renais

O envolvimento renal tem sido demonstrado tanto na DC como na colite ulcerativa, sendo a nefrolitíase e a glomerulonefrite, as manifestações mais frequentes (CORICA; ROMANO, 2015).

A nefrolitíase atinge entre 12-28% dos pacientes com DII, estando presente com frequência naqueles submetidos a procedimentos cirúrgicos como, colectomia com ileostomia e ressecção intestinal. Os cálculos renais surgem em decorrência da diarreia e má-absorção, sendo principalmente compostos por urato e oxalato de cálcio (CORICA; ROMANO, 2015; OIKONOMOU et al., 2011).

Há sugestão de que a exposição ao oxalato ative respostas imunes através das vias de TLRs (1, 2, 3 e 4) expressos nas células epiteliais renais. Várias moléculas endógenas que não PAMPs podem atuar como ligantes nesses receptores, como proteínas de choque séptico, células necróticas, EROs e moléculas de matriz extracelular, e apesar de não estar totalmente clara a participação dos TLRs na

nefrolitíase, têm sido identificadas quantidades de endotoxinas significativas em cálculos renais, independentemente de ser de origem infecciosa. Este fato permite sugerir que endotoxinas bacterianas provenientes do cólon podem ser difundidas na circulação. Ao atingir os túbulos renais, podem se ligar ao seu TLR 4 e ativar múltiplas e complexas vias de sinalização intracelular que regulam a expressão de genes pró-inflamatórios e fatores de transcrição, como o Nf- κ B, que induz a produção de citocinas, antígenos antimicrobianos e estimula a resposta imune adaptativa, culminando assim, na ativação e perpetuação da resposta inflamatória sobre as células epiteliais renais. Adicionalmente, a formação de cálculos renais envolve desregulação de outras vias que estão associadas com a indução da resposta imune pelo oxalato, como a ciclooxigenase-1, IL-6, osteopontina e caspases, visto que a toxicidade resultante às células epiteliais renais, altera a expressão gênica, causa disfunção mitocondrial e gera estresse oxidativo local (CORICA; ROMANO, 2015; JONASSEN et al., 2005).

Os mecanismos fisiopatológicos e os padrões genéticos que correlacionam a glomerulonefrite à DII ainda não estão bem definidos, mas tem sido sugerido que o aparecimento dessa manifestação renal esteja associado com a atividade inflamatória da colite e a alteração na permeabilidade intestinal que podem levar a exposição das células imunes a vários antígenos luminiais, favorecendo a formação de imunocomplexos que se depositam nos glomérulos causando resposta inflamatória local. Corroborando com essa estreita conexão, a revisão conduzida por Oikonomou et al., (2011) sugere que, após tratamento medicamentoso ou cirúrgico da DII, ocorre a melhora da função renal na fase de remissão desses indivíduos (OIKONOMOU et al., 2011).

2.2.5 Manifestações cerebrais

Múltiplos fatores incluindo má-absorção, infecções, tromboembolismo, efeito adverso de fármacos e anormalidades imunológicas então diretamente relacionados a alterações no eixo intestino-cérebro (CASELLA et al., 2014; MORÍS, 2014).

Embora a fisiopatologia para as manifestações cerebrais das DII não estar totalmente compreendida, tem sido proposto um mecanismo pelo qual a inflamação crônica intestinal pode culminar no aparecimento de neuropatias. A resposta imune desregulada envolvendo principalmente células T, em direção aos autoantígenos que

atravessaram a barreira hematoencefálica, induzem no sistema nervoso central, a ativação de astrócitos e da micróglia, que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, EROs, excitotoxicidade glutamatérgica, bem como a geração de autoanticorpos contra a bainha de mielina, causando dessa forma, efeitos lesivos aos axônios e disfunção neuronal (CASELLA et al., 2014; MORÍS, 2014; SINGH et al., 2013).

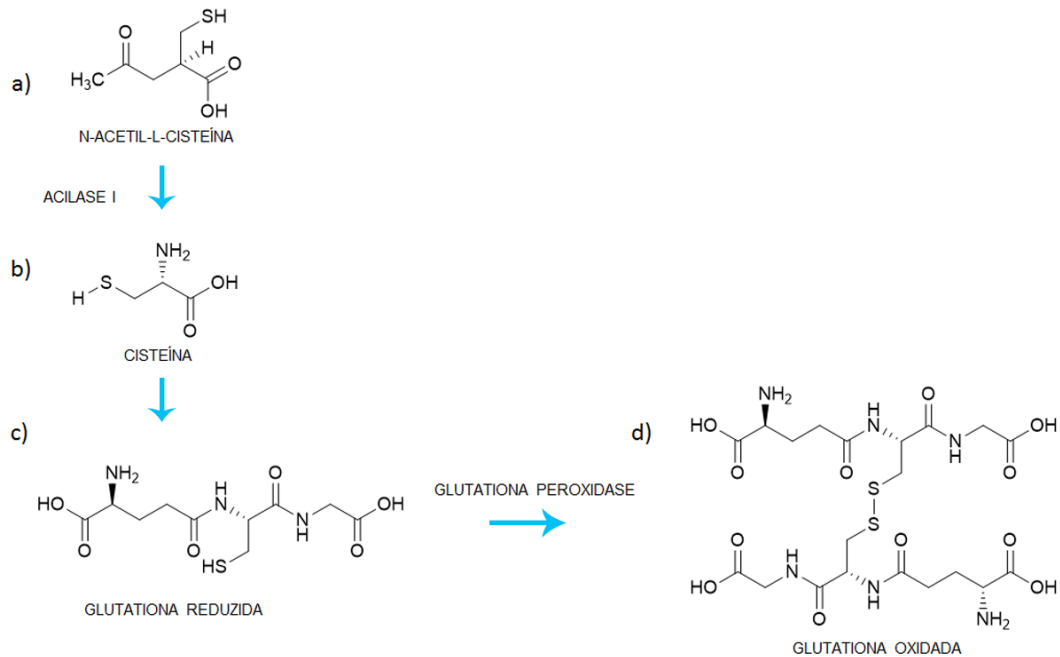
2.4 Possíveis aplicações terapêuticas da *N*-acetilcisteína na colite ulcerativa

Considerando que a CUI é uma doença na qual a inflamação crônica e o estresse oxidativo estão envolvidos, diversas pesquisas têm investigado a eficácia de substâncias com atividade antioxidante e anti-inflamatória, tais como, curcumina (SINGLA et al., 2014) e compostos fenólicos da própolis (WANG et al., 2017) e inclusive, a NAC.

A NAC é um tiol (R-SH) derivado do aminoácido L-cisteína contendo um grupo *N*-acetil ligado a um átomo de nitrogênio (Figura 3a). Atua como potente antioxidante em processos bioquímicos diversos, neutralizando EROs e fornecendo cisteína (Figura 3b) para a síntese de GSH (Figura 3c), por meio de uma reação de desacilação catalisada pela acilase I citosólica, principalmente nos rins e no fígado (ALDINI et al., 2018; SAMUNI et al., 2013).

Inicialmente a NAC era utilizada como agente mucolítico em doenças pulmonares e fibrose cística (HURST; SHAW; LEMAISTRE, 1967), sendo posteriormente aplicada em casos de intoxicação por acetaminofeno, mais conhecido como paracetamol (ALDINI et al., 2018; SAMUNI et al., 2013). A partir da década de 80, a NAC vem sendo estudada no tratamento de inúmeras doenças onde o estresse oxidativo e a inflamação são fatores inerentes à sua gênese e progressão clínica (DODD et al., 2008). Vários estudos clínicos e modelos animais de diabetes, isquemia-reperfusão cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, distúrbios psiquiátricos e colite têm demonstrado resultados promissores da NAC (ANDRADE; MOURA; MARQUES, 2015; ATKURI et al., 2015; DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da *N*-acetil-L-cisteína (NAC) e fornecimento de cisteína para síntese de glutathiona reduzida e formação da glutathiona oxidada.



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

De acordo com Amrouche-Mekkioui e Djerdjouri (2012), a suplementação oral de NAC (150 mg kg d⁻¹), gerou um impacto positivo sobre o cólon, diminuindo a peroxidação lipídica e a inflamação, além de melhorar o perfil antioxidante (AMROUCHE-MEKKIOUI; DJERDJOURI, 2012). Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos benéficos da NAC podem ser descritos pelo seu papel antioxidante e anti-inflamatório (ALDINI et al., 2018; SAMUNI et al., 2013).

A NAC aumenta a defesa antioxidante fornecendo cisteína, que é um passo limitante na síntese de GSH (Figura 3) (ALDINI et al., 2018; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Este potente antioxidante é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos L-glutamato, L-cisteína e L-glicina, constituindo o tiol mais abundante no meio intracelular que atinge concentrações de 2 mM e 10 mM no plasma e no fígado, respectivamente (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014). Sua biossíntese ocorre no meio intracelular por meio de duas reações consecutivas: a primeira é catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase, responsável pela ligação peptídica entre o glutamato e a cisteína e, a segunda reação, o aminoácido glicina se associa ao resíduo C-

terminal da γ -glutamilcisteína formada, via ação da glutathiona sintetase (BACHHAWAT et al., 2013; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008).

A GSH reage diretamente com vários radicais e oxidantes como o H_2O_2 e outros hidroperóxidos tóxicos, numa reação catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), onde é convertida a sua forma oxidada (GSSG) (Figura 3d). Além disso, pode remover aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, evitando os efeitos deletérios causados por esses subprodutos às biomoléculas. Essas ações são atribuídas ao seu grupo sulfidríla (-SH), que apresenta boa polaridade e capacidade de doar elétrons, tornando a GSH um excelente agente redutor. Adicionalmente, atua como substrato ou cofator de enzimas antioxidantes endógenas, como a própria GPx, glutaredoxina, peroxirredoxina, glioxilases 1 e 2 e glutathiona transferase. Outra particularidade é o envolvimento da GSH na redução de pontes dissulfeto (S-S) intra ou intermoleculares de proteínas e outros compostos que possuem baixo peso molecular, disponibilizando grupos -SH para o reabastecimento do pool sistêmico (ALDINI et al., 2018; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Para que o papel protetor da GSH acima descrito seja mantido, é necessário o reabastecimento constante dessa molécula por meio do seu ciclo catalítico. Entretanto, em situações onde o EO é intenso e contínuo ocorre depleção dos níveis de GSH, que é resultante do aumento da formação de GSSG após vários ciclos e subsequente degradação no meio extracelular, da S-glutationilação proteica e da geração excessiva de adutos advindos da reação anterior com compostos eletrofílicos, que, em conjunto, ocasionam uma redução da razão GSH/GSSG (GIUSTARINI et al., 2017; HUBER; ALMEIDA; DE FÁTIMA, 2008). Foi observado que a diminuição da razão GSH/GSSG está associada ao desequilíbrio redox da célula e à hiperplasia das criptas, bem como à inflamação da mucosa (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Considerando o cenário inflamatório crônico característico da colite, onde há aumento de ERONs e citocinas, associado a uma diminuição da capacidade antioxidante, principalmente da concentração da razão GSH/GSSG, a qual tem sido observada tanto em pacientes com colite quanto em diferentes modelos experimentais (ALDINI et al., 2018; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014), a NAC torna-se uma alternativa interessante no reabastecimento do pool de GSH.

ERONs, como HOCl, HO[•] e [•]NO, os quais são produtos gerados pela atividade dos neutrófilos e da decomposição de outras espécies reativas, bem como de reações catalisadas por peroxidases específicas, podem ser direta e efetivamente removidos pela ação da NAC. Este fato é atribuído à constante da velocidade de reação alta da NAC frente a estes oxidantes. Apesar da NAC ser um antioxidante fraco quando comparado à própria cisteína, GSH e outros tióis, sua estabilidade em meio aquoso fortalece sua aplicabilidade no meio clínico, visto também o uso terapêutico limitado da GSH devido à sua rápida hidrólise (SAMUNI et al., 2013; SIDDIQUI et al., 2016).

Adicionalmente, a NAC é um eficiente agente redutor de ligações S-S de muitas proteínas tioladas e cisteinadas, incluindo a mercaptoalbumina que constitui um dos mais importantes antioxidantes plasmáticos e do meio extracelular, promovendo a restauração do pool sistêmico de tióis, assim como do -SH de proteínas reduzidas, ainda, a liberação do resíduo de cisteína ligado à proteína pode servir de substrato para a síntese de GSH. Essa habilidade redutora deve-se ao caráter básico (nucleofílico) do grupo -SH da NAC, que é decorrente do resíduo N-acetil e da carboxila que permite estabilizar a alta densidade eletrônica do tiolato, além de torná-la mais resistente à oxidação em meios fisiológicos (ALDINI et al., 2018; ZHOU et al., 2015).

Diversos estudos também ressaltam o papel da NAC como importante anti-inflamatório, o qual está relacionado às vias oxidativas. Como já foi referido, o Nf-κB está envolvido na transcrição de genes de mediadores inflamatórios e na resposta imune. A NAC impede a translocação e ativação do Nf-κB por meio da supressão da ubiquitinação e degradação de sua proteína inibitória (IκB), além de modular determinadas vias transcricionais relacionadas à c-Fos/c-Jun, STAT e inibidores de ciclina. Como precursora da GSH, age neutralizando ERONS e as vias de ativação do Nf-κB e por fim, previne a expressão de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por LPS, como o TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 (AJONK; IESS; OMMER, 2002; OKA et al., 2000).

Apesar dos múltiplos benefícios relatados estarem associados à GSH, a administração por via oral deste antioxidante endógeno não restaura adequadamente seus níveis séricos e assim como a L-cisteína, é instável em meio aquoso e sofre rápida hidrólise no intestino, fígado e rim, tornando sua aplicação clínica limitada, como já referido (ALDINI et al., 2018; WITSCHI et al., 1992). Em contrapartida, a

administração oral de NAC aumenta as concentrações plasmáticas de cisteína reabastecendo o pool de GSH. Além disso, quando comparada à GSH e à cisteína, a NAC devido à sua porção *N*-acetil é menos susceptível à oxidação no TGI, (sendo apenas 3% excretado nas fezes), é mais solúvel em meio aquoso e se difunde facilmente entre as membranas biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica. Ainda, apresenta menor toxicidade, sendo considerada segura, em doses de até 8000 mg/dia (ANDRADE; MOURA; MARQUES, 2015; DE ROSA et al., 2000).

Considerando isso, Moura et al., (2016), em seu modelo experimental de colite leve (2% m/v), ofertaram 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ de NAC na dieta dos animais e verificaram resultados promissores, como diminuição dos marcadores inflamatórios e de EO associado ao aumento das defesas antioxidantes, além de uma melhora em nível tecidual (MOURA et al., 2016).

Para investigar se os efeitos benéficos da NAC vistos na colite leve, são reproduzidos nas formas de apresentação moderada e grave da doença, este estudo optou por utilizar uma dose maior (150 mg kg⁻¹ d⁻¹), tendo em vista o grau mais severo da doença que requer uma maior resposta antioxidante. Essa dose foi baseada no trabalho de Amrouche-Mekkioui e Djerdjouri (2012) onde em seu modelo de colite com SSD a 3% (m/v) (CUI moderada), demonstraram que a NAC, nessa concentração, gerou um impacto positivo sobre o cólon, diminuindo a oxidação de lipídeos e proteínas, e os níveis séricos de MPO, além de melhorar o perfil antioxidante (aumento das atividades de GSH e CAT). Ademais, é de grande importância verificar as implicações da NAC em tecidos extraintestinais pouco investigados, como os rins, tendo como finalidade embasar a sua aplicação como uma possível estratégia terapêutica eficaz e segura na colite.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da *N*-acetilcisteína (NAC) sobre a resposta antioxidante e inflamatória colônica e renal em modelos murinos de colite ulcerativa moderada e grave, induzidas por sulfato de sódio dextrana (SSD).

3.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos das colites (moderada e grave) sem/com a administração de NAC sobre a histologia colônica;
- Determinar os efeitos das colites (moderada e grave) sem/com a administração de NAC sobre ingestão alimentar e hídrica, ganho ponderal e glicemia dos camundongos;
- Investigar os efeitos das colites (moderada e grave) sem/com a administração de NAC sobre a capacidade antioxidante, os marcadores de estresse oxidativo e a atividade inflamatória colônica e renal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material e equipamentos

- Reagentes

O SSD (MW 36,000-40,000 Da) foi adquirido da MP Biomedicals®. LiChrolut®, RP-18 P foi obtido da Merck®, os comprimidos do coquetel de inibidor de protease foram provenientes da Roche®. O tampão RIPA (10X) foi obtido da Cell Signaling®. Todos os outros produtos químicos, enzimas, albumina de soro bovino (BSA) e a NAC foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, EUA).

- Equipamentos

Biofreezer VIP Serie Sanyo; espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific; Agitador magnético AP 55, Phoenix; microscópio óptico Olympus BX51 ligado a um sistema de câmera DP70 Digital, Tóquio, Japão; High Performance Liquid Chromatography (HPLC) acoplado à detecção UV (Shimatzu, Serial no. L201550).

4.2 Animais de experimentação

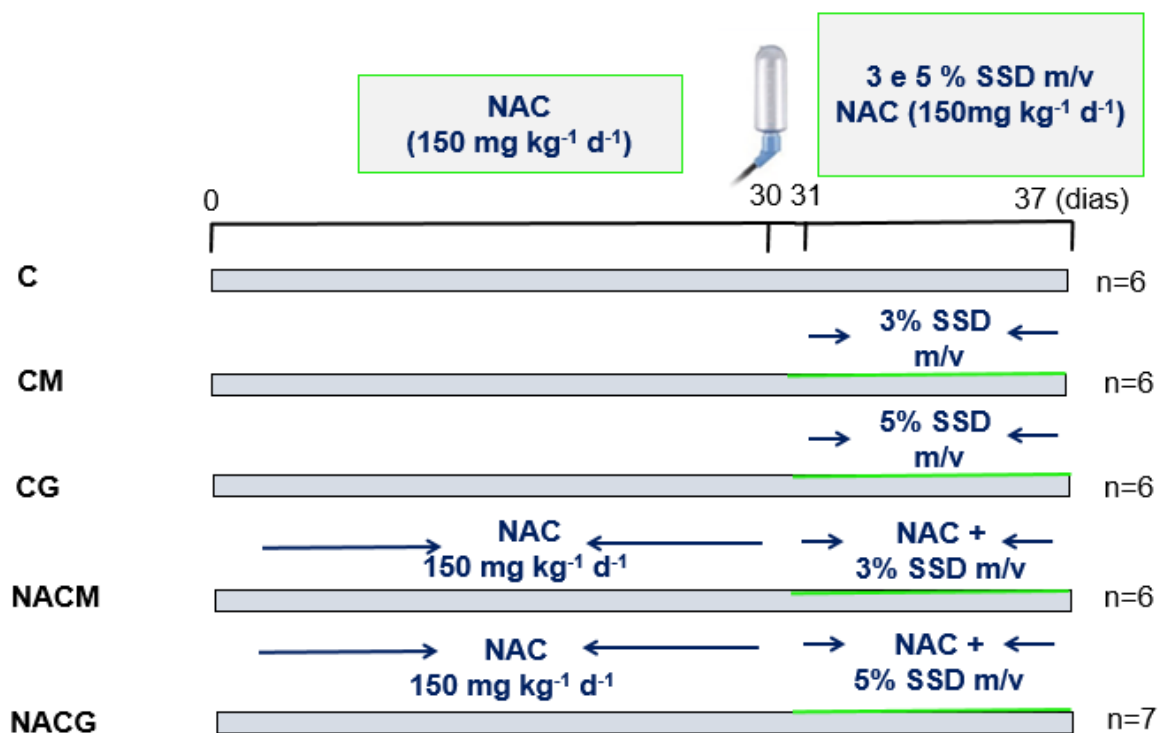
Foram utilizados 31 camundongos machos *Swiss*, com 8 semanas de idade (média de massa corporal: 31 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Durante uma semana (período de adaptação), os animais foram alocados aleatoriamente em gaiolas de polietileno (6 animais por gaiola), no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição da UFAL (24±1°C; ciclo claro/escuro de 12 h) recebendo ração comercial Rhoster® para adaptação (quadro 1). O experimento foi realizado após aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFAL, sob o número do processo 45/2016.

4.3 Desenho experimental

Após o período de adaptação, os animais foram alocados em gaiolas conjuntas de polietileno de acordo com seu grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM); Colite Grave (CG); Colite Moderada + NAC (NACM); e Colite grave + NAC (NACG). A randomização foi realizada segundo o peso do animal, para que não houvesse diferença estatística entre os grupos.

Na primeira fase do experimento, os camundongos dos grupos de tratamento (NACM e NACG) receberam $150 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ de NAC na água de beber, durante 30 dias consecutivos (1º ao 30º dia). No 31º dia, foi iniciada a segunda fase experimental, onde foi realizada a indução das colites moderada e grave por meio da adição de SSD na água de beber, na concentração de 3% e 5% (p/v), respectivamente, por 7 dias consecutivos (31º ao 37º), dando continuidade a suplementação com NAC, totalizando 37 dias de fase experimental (Figura 4). Todas as etapas do estudo foram seguidas de acordo com os cuidados propostos pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996) (CLARK et al., 1997).

Figura 4 - Desenho experimental segundo o grupo de tratamento.



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

- **Grupo controle (C)** (n=6): Sem tratamento com NAC e sem indução de colite;
- **Grupo colite moderada (CM)** (n=6): Sem tratamento com NAC e indução de colite moderada, usando SSD na concentração de 3% (m/v), via oral – água de beber;

- **Grupo colite grave (CG)** (n=6): Sem tratamento com NAC e indução de colite grave, usando SSD na concentração de 5% (m/v), via oral – água de beber;
- **Grupo colite moderada recebendo NAC (NACM)** (n=6): Suplementação oral com NAC (150 mg kg⁻¹d⁻¹ – água de beber) e indução de colite moderada, usando SSD na concentração de 3% (m/v), via oral – água de beber;
- **Grupo colite grave recebendo NAC (NACG)** (n=7): Suplementação oral com NAC (150 mg kg⁻¹ d⁻¹) e indução de colite grave, usando SSD na concentração de 5% (p/v), na água de beber.

A adição de NAC e/ou SSD na água de beber foi realizada diariamente, sendo a água não ingerida desprezada após 24hs de oferta. Os animais tiveram livre acesso à dieta comercial (RHOSTER® Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) – produzida segundo as recomendações da AIN 93 (*American Institute of Nutrition* para roedores, 1993) – (Quadro 1), e à água durante todo o período experimental.

A oferta simultânea de NAC e SSD é baseada no trabalho de Amrouche-Mekkioui e Djerdjouri (2012), que investigaram o efeito protetor da NAC (150 mg kg⁻¹ d⁻¹), durante 45 dias na CUI grave (SSD 5% - m/v) sobre os marcados de estresse e demonstraram a partir de testes preliminares, que não há nenhuma interação ou comportamento inerente a essas moléculas que possa interferir nos resultados do estudo.

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%
Lipídeos (%)	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

A ingestão alimentar foi avaliada semanalmente durante todo o período experimental. O cálculo do consumo alimentar foi baseado na diferença de peso entre a ração ofertada e a sobra desta.

Consumo alimentar (g) = dieta ofertada (g) – sobra da dieta ofertada (g)

4.5 Glicemia de jejum

Após jejum noturno de 12 horas, os camundongos tiveram sua glicemia de jejum aferida por meio da coleta de sangue via veia caudal, utilizando-se um glicosímetro portátil G-TECH® Free, de acordo com as especificações do fabricante. Essa mensuração foi realizada em três momentos ao longo do experimento:

- 1º dia (início da fase experimental); 31º dia (1º dia de indução da colite); 38º (antes da eutanásia).

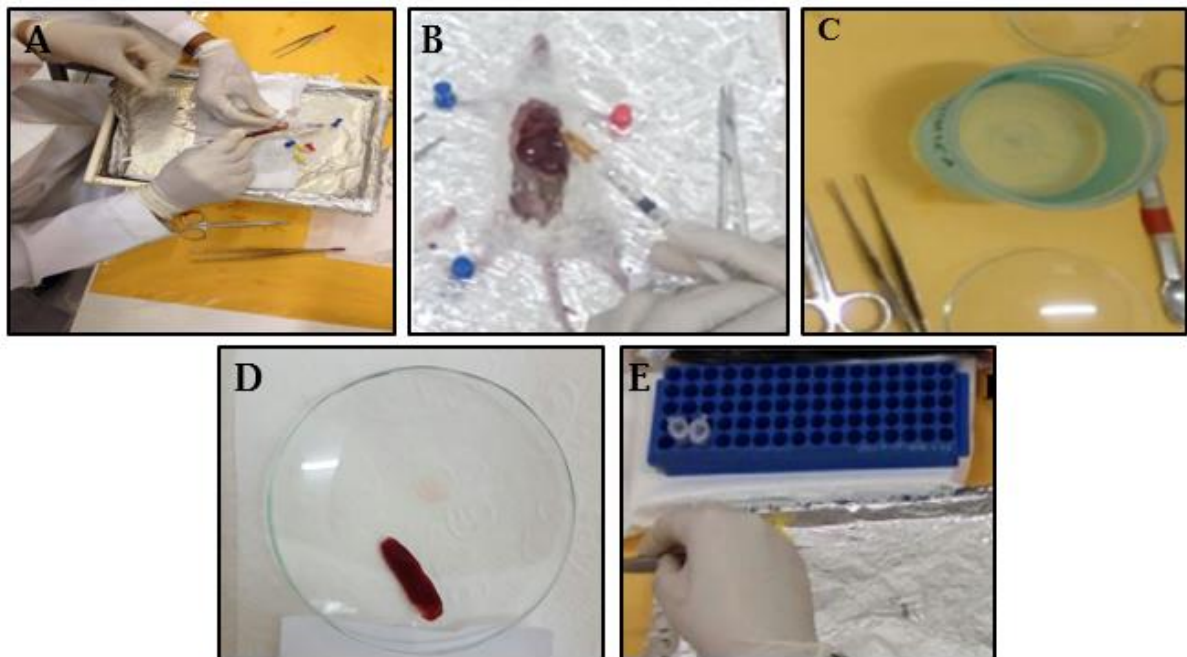
Esse procedimento foi realizado visando avaliar e comparar o comportamento glicêmico antes e após a indução da colite bem como o efeito da NAC sobre esta variável.

4.6 Eutanásia e coleta dos órgãos

Ao final do período experimental, no 38º dia, após jejum noturno de 12 horas, os camundongos foram anestesiados (40 mg kg⁻¹ de tiopental e 5 mg kg⁻¹ de diazepam), via intraperitoneal, no quadrante inferior direito e submetidos à coleta de sangue por punção cardíaca (eutanásia) (Figura 5A). Após a realização da perfusão ventricular com solução de heparina a 2% (Figura 5B), foram retirados o intestino

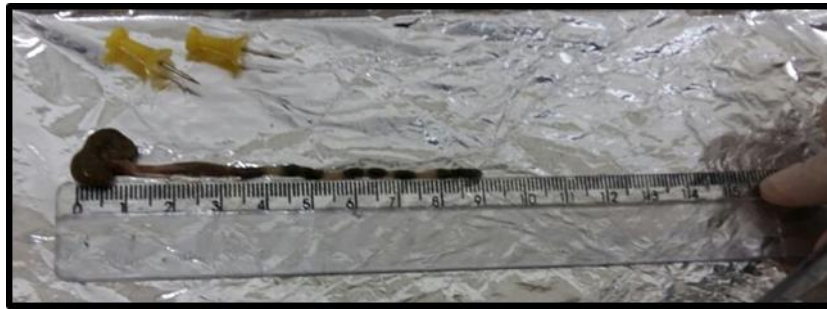
grosso e os rins. O baço também foi removido e pesado, visto que seu aumento é um marcador de inflamação. Os órgãos retirados foram higienizados em solução salina a 0,9 % (Figura 5C) e posteriormente pesados em balança analítica. Em seguida, foram cortados em pedaços específicos, pesados e transferidos para microtubos previamente etiquetados para serem armazenados em biofreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 5D). Um fragmento do intestino grosso, mas especificamente a porção reto-sigmóide, que corresponde à região que geralmente é mais acometida na colite, para fixação e posterior processamento histológico. O cólon teve seu comprimento aferido, tendo em vista que este é um parâmetro para avaliação da gravidade da colite (Figura 6).

Figura 5 - Fluxograma da eutanásia e retirada dos órgãos. Punção cardíaca (A), perfusão ventricular (B), retirada dos órgãos (C), imersão em salina (0,9%) e acondicionamento em microtubos (D).



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

Figura 6 - Aferição do comprimento do intestino grosso.



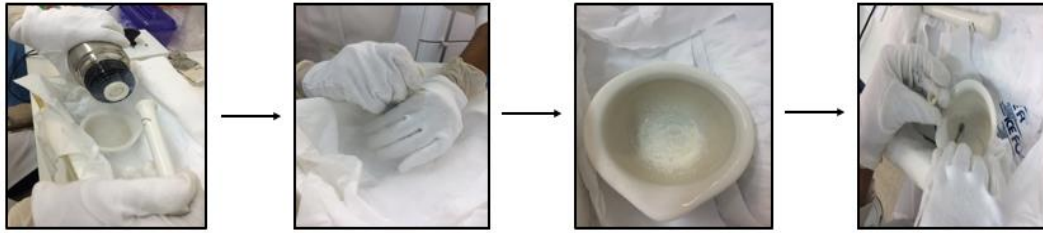
Fonte: MARTINS, A. S. P.

As carcaças foram colocadas em sacos plásticos escuros adequados, lacrados e encaminhados para descarte, o qual é realizado por equipe responsável pela coleta de lixo de material biológico e químico na UFAL. Os materiais perfurocortantes foram armazenados em recipientes apropriados e levados para descarte no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA).

4.7 Preparação dos extratos teciduais

Na preparação dos homogeneizados do rim foram utilizados tampão RIPA (do inglês *Radioimmunoprecipitation assay buffer*) (pH 7,4) (em uma proporção de 1:9, ou seja, o volume do solvente 9x a massa do tecido) e o coquetel de inibidor de protease (um comprimido para 50 mL de tampão RIPA), visando inibir a ação de proteases intracelulares e preservar a integridade das proteínas e outros componentes celulares. Os extratos de intestino, por sua vez, foram obtidos utilizando-se nitrogênio líquido, tendo como objetivo a desintegração do tecido para facilitar a maceração (Figura 7). Após macerado, o pó resultante foi transferido para microtubo e o volume correspondente ao peso do órgão foi adicionado, sendo essa solução posteriormente homogeneizada com o auxílio do vórtex. Em seguida, todos os extratos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm, durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e por fim, aliqotado e armazenado a -80 °C, para posteriores análises bioquímicas.

Figura 7. Preparação de extrato de intestino com nitrogênio líquido.



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

4.8 Análises Histológicas

Os fragmentos do cólon foram fixados em solução Bouin e, posteriormente, imersos em concentrações crescentes de etanol até inclusão tecidual em parafina. Após processamento, foram realizados cortes histológicos de 5 μm e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação das microestruturas celulares. As lâminas coradas foram fotografadas por meio de um microscópio óptico ligado a um sistema de câmera DP70 Digital e, posteriormente, avaliadas.

4.9 Análises Bioquímicas

4.9.1 Dosagem de proteínas teciduais

Baseia-se no método proposto por Bradford (1976). Para preparação das amostras, realizou-se uma diluição de 1:10 para o intestino e de 1:20 para o rim, utilizando o tampão fosfato (PBS) (50 mM, pH 7,4). Em seguida, a solução preparada foi agitada com o auxílio do vórtex para homogeneizar. A partir disso, 20 μL da amostra/ponto da curva (BSA) (1 a 5 mg/dL), foram pipetados, em duplicata, nos poços da microplaca (visível), seguida da adição de 200 μL de reagente de Bradford, aguardando 5 min (protegido da luz). Após esse tempo, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD et al., 1976).

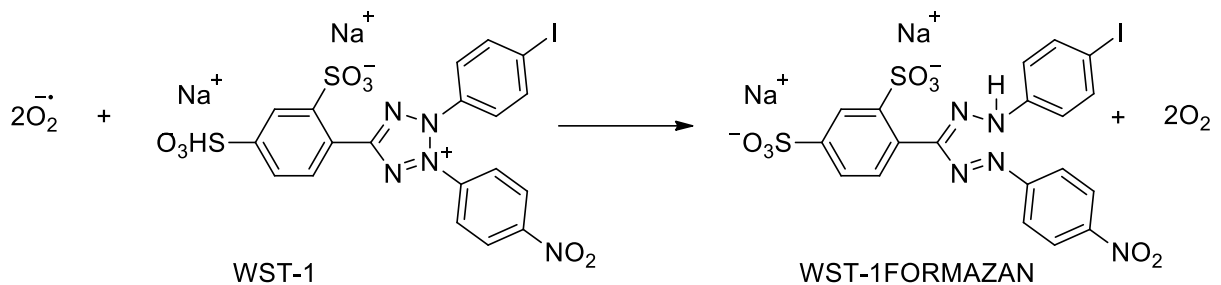
4.9.2 Determinação dos marcadores de capacidade antioxidante

- Superóxido dismutase (SOD)

Inicialmente, os extratos de intestino e de rim foram diluídos (1:20 e 1:10, respectivamente) com tampão PBS 50 mM, pH 7,4. A atividade foi mensurada utilizando o Kit SOD Assay – WST (sal monossódico de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)- 2H-tetrazólio) (#19160, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), e

acordo com informações do fabricante. O método é baseado na inibição em 50% da redução do WST-1 formazana pela SOD, o qual é formado a partir da reação entre o WST-1 e o $O_2^{\cdot-}$ (Esquema 4), a qual é detectada em 450 nm. A atividade da SOD foi expressa como percentual (%) de taxa de inibição.mg proteína⁻¹.

Esquema 4 - Reação entre o ânion radical superóxido e o sal monossódico de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)- 2H-tetrazólio (WST-1) formando o o sal monossódico de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio, monosodium (WST-1) formazana.



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

- Catalase (CAT):

A determinação da atividade da CAT foi realizada de acordo com a adaptação do método descrito previamente por Aebi (1974) (AEBI, 1974). 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 $1 \mu\text{mol}/\text{min}$ de H_2O_2 , a 37°C .

Primeiro, foram pipetados $7,5 \mu\text{L}$ do homogenato intestinal e renal (diluição de 1:30, com tampão PBS 20 mM, pH 7,0), em duplicata, seguido da adição de $187,5 \mu\text{L}$ de tampão PBS (pH 7,0). Posteriormente, a leitura foi realizada 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, $5 \mu\text{L}$ de H_2O_2 (1 mol L^{-1}) foram adicionados, com a leitura sendo novamente realizada a cada 15 s, durante 5 min. Todos os resultados foram expressos em U de CAT.mg.

Cálculo para a concentração de catalase:

$$\text{Catalase U/mg proteína} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (\text{ABSi} - \text{ABSf})}{\text{ABSi} \times \text{mg de proteína}}$$

ABSi = Absorvância inicial;

ABSf = Absorvância final;

2,361= constante;

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

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

- Glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG):

A mensuração dos níveis de GSH total e GSSG foi realizada a partir da adaptação da técnica descrita inicialmente por Tipple & Rogers (2012). Para não haver interferência na análise, a proteína total do homogenato intestinal e renal foi previamente precipitada, por meio da centrifugação de 40 µL da amostra com 80 µL de ácido metafosfórico 5% (m/v) e 80 µL de tampão de ensaio (PBS 0,1 M + EDTA 5 mM, pH 7,4), proporção de 1:2,5 (80:80:40), realizada a 1.400 rpm por 10 min a 4 °C. Para obter GSH total, o sobrenadante desproteínizado do rim foi diluído (1:1) em tampão de ensaio (PBS 0,1 M + EDTA 5 mM, pH 7,4). O intestino e o cérebro por apresentarem baixas concentrações teciduais de GSH, não passaram por essa diluição prévia. Posteriormente, 30 µL do homogeneizado, em duplicata, foram transferidos para a microplaca de leitura (visível), seguida da adição de 50 µL da mistura de reação 1 (ácido 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) – DTNB – 10 mM e glutathiona redutase (GR) – 4,2 U.mL⁻¹) e 50 µL da mistura de reação 2 (NADPH 1% m/v) (Esquema 5).

Para determinação de GSSG, 50 µL dos extratos teciduais desproteínizados foram primeiramente diluídos com tampão de ensaio (PBS 0,1 M + EDTA 5 mM, pH 7,4), sendo o intestino na proporção de (1:6 – 245 µL) e o rim (1:10 – 445 µL). Em sequência, 5 µL de N-etilmaleimida (NEM) foi adicionado e as amostras preparadas centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min, a 4 °C. Logo após, a solução foi incubada em gelo durante 50 min, para propiciar a completa complexação de NEM com a GSH e evitar que esta forma reduzida sofra auto-oxidação e interfira nos resultados. Para

bloquear o complexo (NEM-GSH) e prevenir a inativação da GR a ser adicionada na reação, foi utilizado uma coluna de filtração LiChrolut®, RP-18 E. Por fim, 200 µL desse eluente resultante foram transferidos para microplaca de leitura (visível), sendo então adicionados 50 µL da mistura de reação 1 e 50 µL da mistura de reação 2.

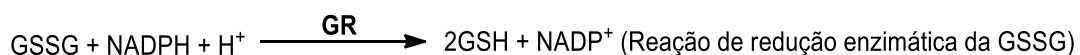
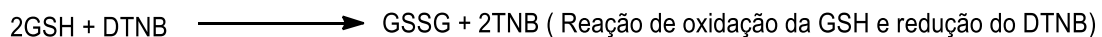
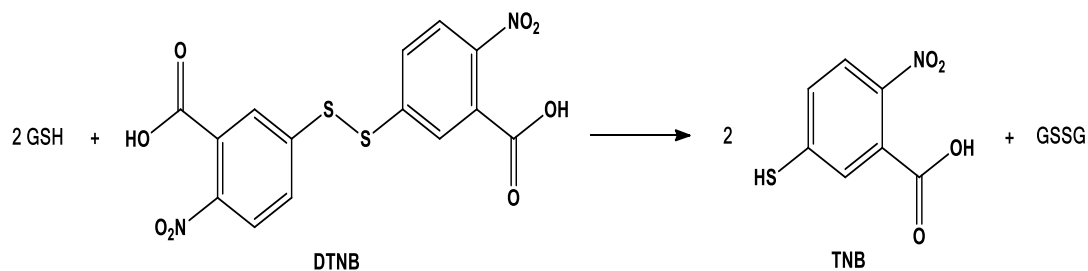
O princípio do método é baseado na reação cinética de oxidação da GSH a GSSG, por meio do DTNB, que gera seu ácido 5-mercaptop-2-nitrobenzóico correspondente. Posteriormente, a GSSG retorna a sua forma reduzida por meio da adição de GR e NADPH no meio (Esquema 5).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em uma cinética de 3 min, com leituras a cada 30 seg, onde as absorbâncias foram medidas num comprimento de onda previamente descrito (412 nm). Os níveis de GSH total e GSSG foram mensurados após comparação dos valores obtidos com curva de calibração padrão com concentrações conhecidas de GSSG (1 nM a 10 nM). Para determinação da GSH, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{GSH} = \text{GSH total} - (2 \times \text{GSSG}).$$

Os resultados foram expressos em pmol mg proteína⁻¹.

Esquema 5 - Reação da oxidação da GSH e da redução da GSSG.



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

4.9.3 Determinação dos marcadores de Estresse Oxidativo

- Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

A concentração foi determinada por meio da adaptação do método colorimétrico de Pick e Keisari (1980). O princípio da técnica consiste na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂ mediada pela peroxidase de rabanete. A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol mg de proteína⁻¹, de acordo com curva de calibração previamente estabelecida.

Inicialmente, os homogenatos do intestino e rim foram adicionados em microtubos, contendo tampão de ensaio (tampão fosfato, dextrose e NaCl (1:25) (pH 7,0)).

Em seguida, foram adicionados 5 µL de vermelho de fenol (0,028 M) e 4,25 µL de peroxidase de rabanete (PR) (1 KU/mL). Os microtubos com a solução foram então incubados a 37°C, durante 30 min. Após esse período, 200 µL das amostras foram transferidas, em duplicata, para uma microplaca de leitura (visível), contendo 25 µL de hidróxido de sódio (1M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 610 nm. A concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol mg de proteína⁻¹, de acordo com curva de calibração previamente estabelecida. (PICK; KEISARI, 1980).

4.9.4 Determinação da atividade inflamatória

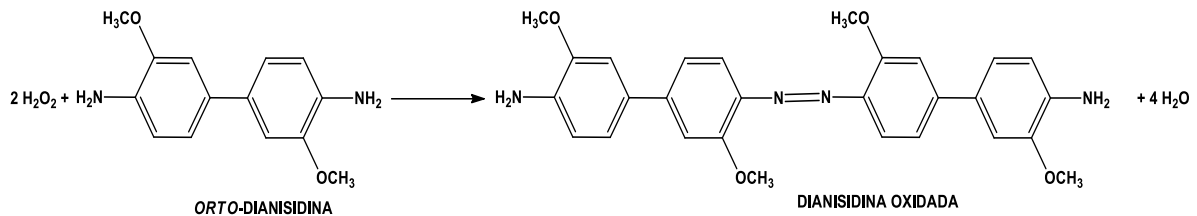
- Mieloperoxidase (MPO)

A mensuração da atividade da MPO foi realizada por meio da adaptação do método proposto por Bradley et al. (1982) (Esquema 5).

Resumidamente, 25 mg dos tecidos intestinal e renal foram homogeneizados, utilizando tampão de ensaio (tampão de fosfato de potássio - 50 mM, 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e EDTA - 5 mM, pH 6,0). Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 4.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 12.000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Posteriormente, 50 µL do sobrenadante foram transferidos em duplicata para uma microplaca e adicionados 50 µL de solução de *orto*-dianisidina (0,68 mg/mL). A microplaca foi incubada a 37 °C por 15 min e em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de H₂O₂ (0,3%). Uma nova incubação foi realizada (37 °C) e após 10 min, a leitura foi

feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 460 nm. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de H_2O_2 (em μmol) decomposta por minuto. Os resultados foram expressos em U de MPO mg de proteína⁻¹

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



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

4.9.5 Determinação de marcador de dano oxidativo

- Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram mensurados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplada à detecção por UV em 270 nm. Os parâmetros para o sistema de HPLC usados foram os seguintes: coluna 5C18 (150mm x 4,6mm) acoplado com pré-coluna (45 mm x 4,6 mm), fase móvel composta por acetonitrila HPLC/UV e tampão Trizma (pH 7,4) (1:9).

A técnica é baseada no método adaptado por Tatum et al. (1990) (VICKIE; CHANGCHIT; CHOW, 1990). As amostras foram previamente preparadas, onde 25 mg do tecido intestinal, renal e cerebral 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 3.500 rpm, por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi filtrado por meio de um filtro com membrana Durapore de 0,22 μm de poro. O volume de 20 μL do filtrado foi injetado no HPLC e a leitura realizada a 270 nm. A duração da leitura foi, no total, de 6 min, onde o tempo de retenção do MDA é em torno de 2'51". Os valores de MDA foram avaliados a partir da curva padrão, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), que é um composto precursor de MDA e expressos em nM MDA mg de tecido⁻¹ sendo posteriormente corrigidos para o peso em miligrama (mg) do tecido analisado, obedecendo o fator de correção, de acordo com a seguinte equação:

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

4.9.6 Determinação do perfil inflamatório

- Determinação dos níveis de TNF- α , IL-6, IFN - γ e IL-10

Inicialmente os extratos do intestino e rim foram diluídos de acordo com a citocina avaliada (TNF- α , IFN- γ e IL-10 - 1:10; IL-6 – 1:5) com tampão PBS (50 mM, pH 7,4). Os níveis teciduais das citocinas foram determinados por ELISA, utilizando o kit da PeproTech® (PeproTech Brasil FUNPEC, Ribeirão Preto, SP, BR.), conforme as instruções do fabricante. A leitura da absorvância foi realizada a 450 nm, em leitor de placa de ELISA e os resultados foram expressos em pg.mg⁻¹ de proteína.

4.10 Análise Estatística

Para verificar a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis paramétricas foram avaliadas usando a análise unidirecional emparelhado de variância (ANOVA), seguida pelo teste t para comparação entre dois grupos, ou o teste de Tukey/teste de Bonferroni para as comparações entre vários 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 da média (SEM) para aqueles com distribuição normal e os valores como mediana e intervalo interquartil para os não-paramétricos. O valor p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os grupos que apresentam diferentes gravidades da doença não são comparados. Foi utilizado GraphPad®Prism versão 5.0 para Windows (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação histológica no cólon

A administração de SSD (3 e 5% m/v) na água de beber, durante sete dias consecutivos, ocasionou alterações visíveis na arquitetura do cólon dos animais dos grupos CM e CG (Figura 8B e 9B), incluindo destruição/desarranjo e encurtamento das criptas (setas pretas tracejada), separação da base da cripta da lâmina própria (seta verde), bem como o estreitamento da camada muscular da mucosa (seta azul pontilhada), que são mais evidentes na colite mais grave, quando se compara ao grupo C (saudável), onde percebe-se a integridade das criptas (setas pretas) (Figura 8A e 9A). Adicionalmente, essas mudanças foram mais intensas no grupo com colite grave, comparativamente ao grupo com colite moderada. Confirmando que o SSD a 5% por 7 dias é capaz desenvolver efeitos mais intensos sobre a arquitetura do cólon, mimetizado o quadro de colite mais grave vista em humanos.

Esses aspectos histológicos foram condizentes com outros trabalhos utilizando SSD, como os de Damiane et al. (2007) e Moura et al. (2016), demonstrando dano tecidual, necrose das criptas e infiltrado inflamatório característicos da colite (DAMIANI et al., 2007; MOURA et al., 2016).

Ao analisar o efeito da NAC sobre esses parâmetros histológicos, percebe-se que nos dois grupos de tratamento (Figuras 8C e 9C, setas em verde), houve uma restauração parcial da estrutura das células epiteliais, por apresentar algumas áreas íntegras indicando assim, uma provável proteção contra o dano causado pela colite.

Figura 8 - Análise histopatológica do cólon segundo o grupo experimental: Controle (A), Colite Moderada (B) e Colite moderada tratada com N-acetilcisteína (NAC) (C) - Fotomicrografias representativas de seções do cólon de camundongos. Seta preta tracejada (destruição de cripta); seta verde (separação da lâmina própria da base da cripta); e seta preta (preservação da estrutura da cripta). Aumento de 10x (acimas) e aumento de 20x (abaixo). Coloração hematoxilina e eosina (HE).

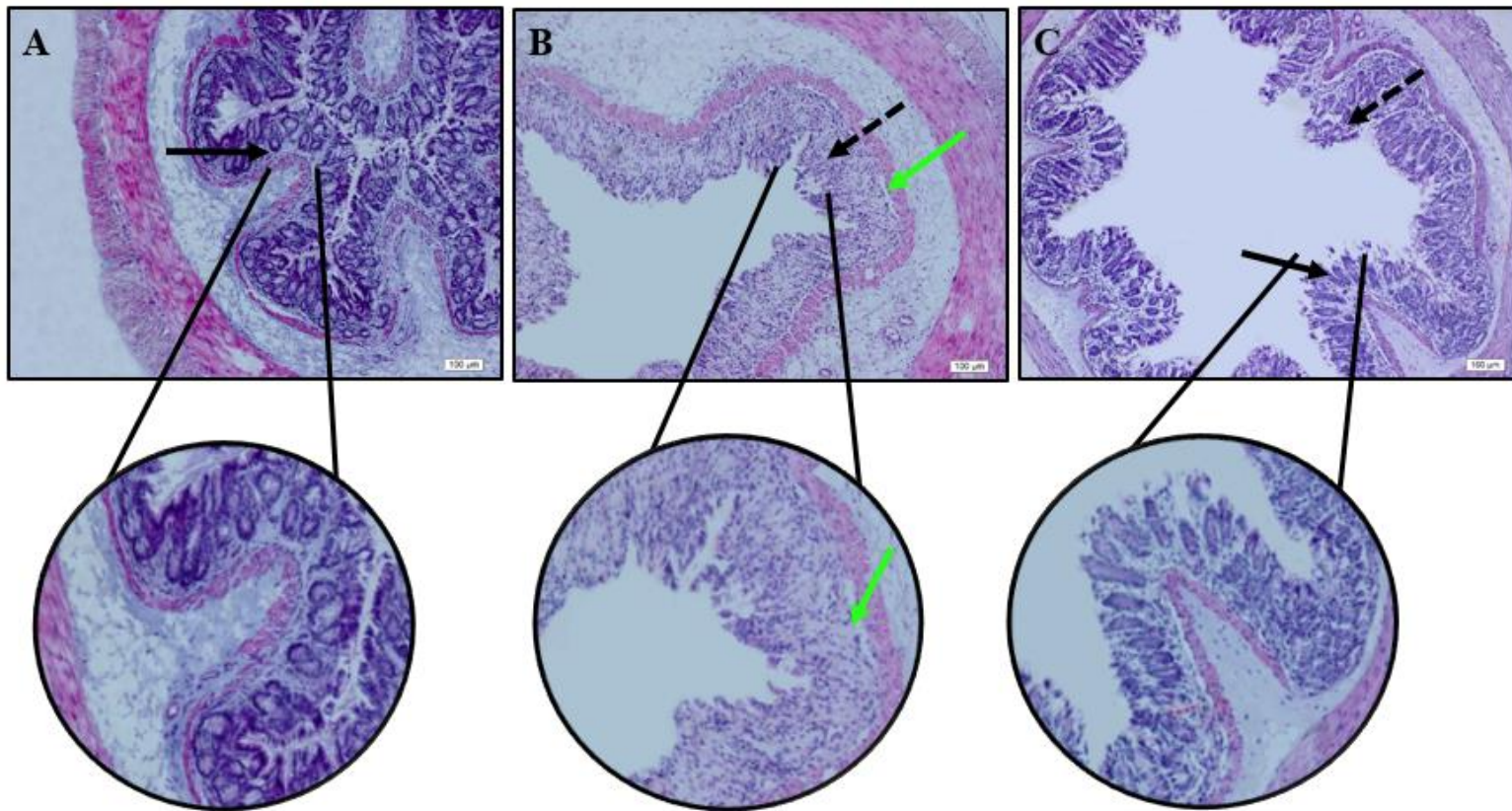
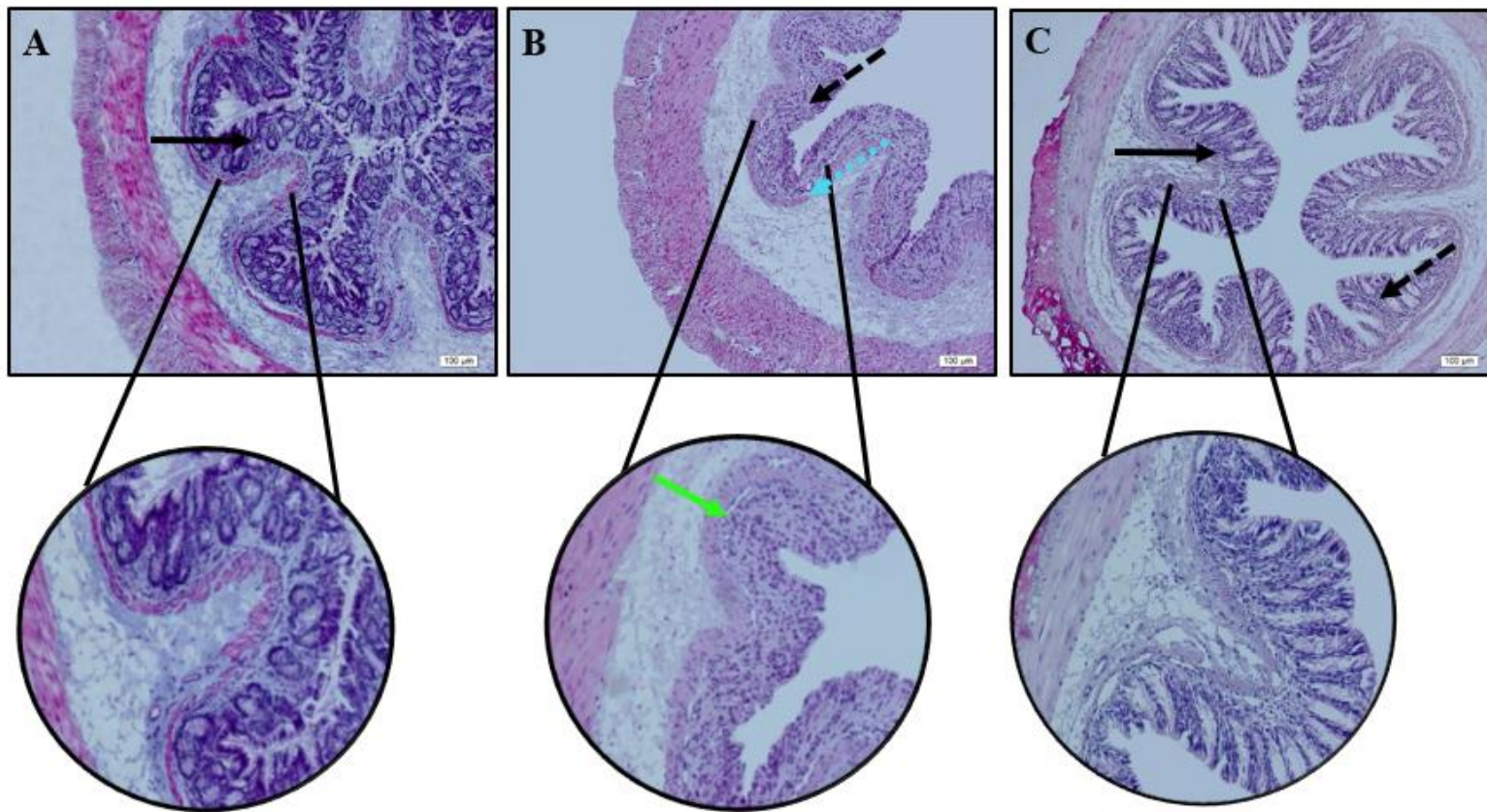


Figura 9 - Análise histopatológica do cólon segundo o grupo experimental: Controle (A), Colite Grave (B) (colite grave induzida por SSD 5%) e Colite grave tratada com NAC (C) - Fotomicrografias representativas de seções do cólon de camundongos. Seta preta tracejada (destruição de cripta); seta verde (separação da lâmina própria da base da cripta); seta pontilhada azul (estreitamento da muscular da mucosa); e seta preta (preservação da estrutura da cripta). Aumento de 10x (acimas) e aumento de 20x (abaixo). Coloração hematoxilina e eosina (HE).



Fonte: MARTINS, A. S. P., 2019.

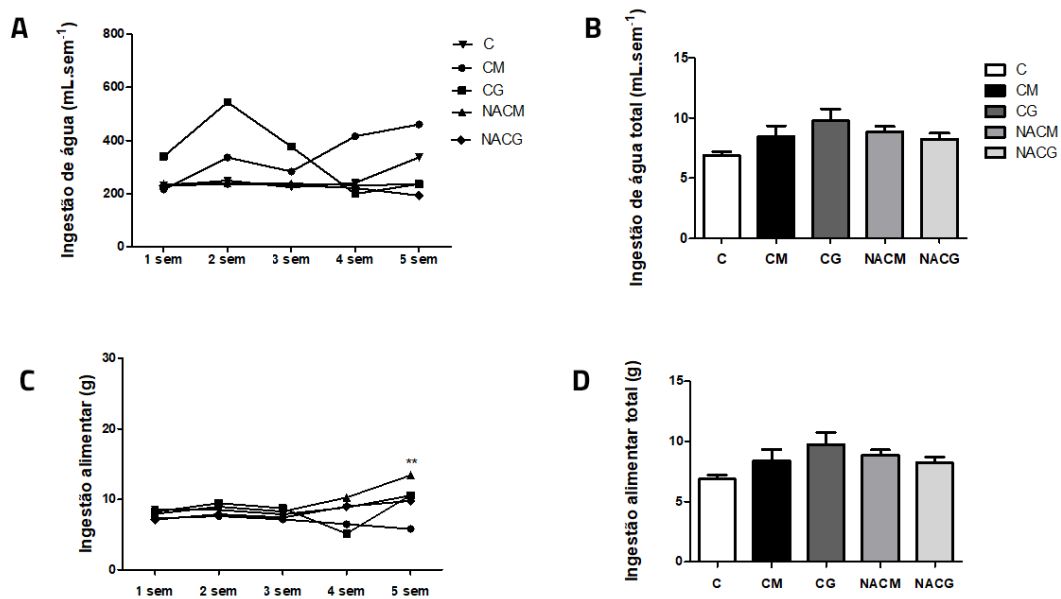
5.2 Avaliação da ingestão de água com SSD e/ou NAC sobre a ingestão alimentar, ganho ponderal e glicemia de jejum

Os principais sinais e sintomas ocasionados pela colite (diarreia com sangue e dor abdominal) repercutem negativamente sobre o estado geral, causando perda de apetite, baixa ingestão alimentar, associada à má-absorção e perda de peso. Além disso, o contexto inflamatório crônico favorece o aparecimento de alterações metabólicas, como resistência à insulina e hiperglicemia (KARRASCH; OBERMEIER; STRAUB, 2014).

Neste modelo experimental de colite induzida por SSD (3 e 5 % - p/v), não foi verificada diferença significativa na ingestão de água em quaisquer dos grupos estudados (Figura 10A e 10B), fato que favorece homogeneidade e uma melhor compreensão dos resultados.

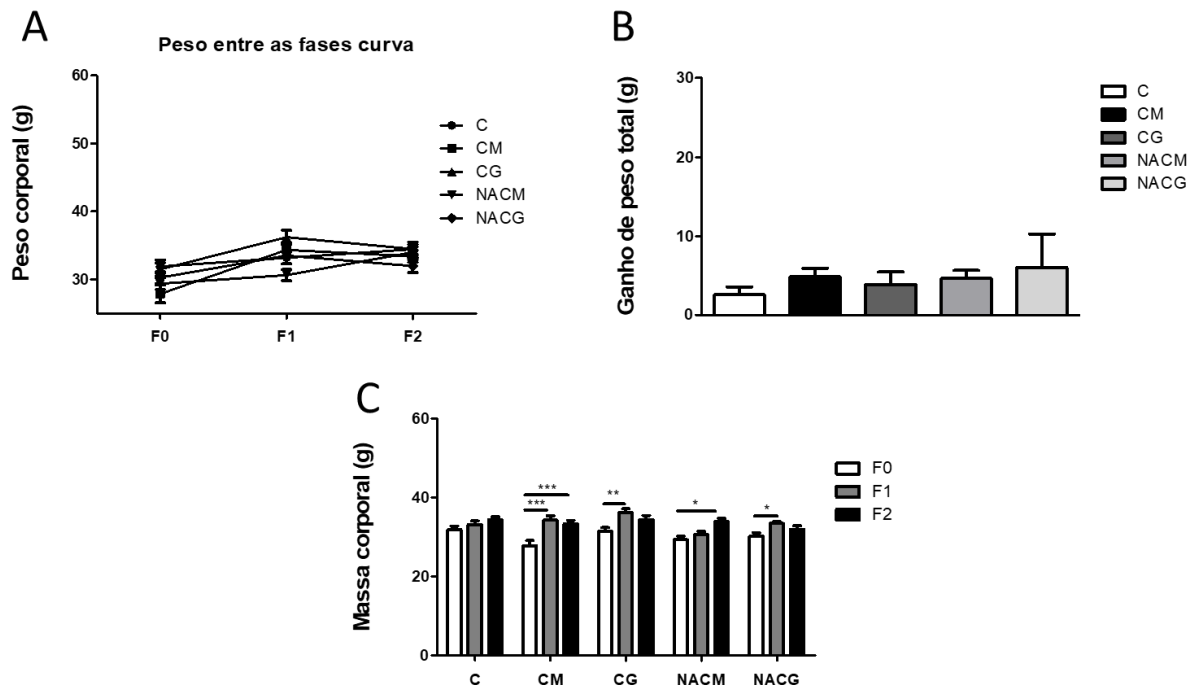
Embora a perda ponderal seja uma característica inerente à colite, não foram observadas alterações na massa corporal dos animais (Figura 11A e 11B), em quaisquer das fases experimentais. Foi verificado um aumento do consumo alimentar após a indução da CUI (F2) no grupo CG em relação ao C (Figura 10C e 10D), provavelmente essa elevação na ingestão foi responsável pela não alteração no peso corporal, uma vez que foram observados sangue nas fezes e sangramento retal nos grupos que receberam SSD (imagem não apresentada). Em contrapartida, percebe-se que houve uma variabilidade intragrupo, onde é notável o ganho de peso na F2 nos grupos CM e NACM em relação à fase inicial, a F0 (Figura 11C). Esses achados sugerem que a manutenção do peso corpóreo quando se comparam todos os grupos, pode ser atribuída ao consumo alimentar compensatório mediante o quadro fisiopatológico da doença, incluindo a destruição das vilosidades e arquitetura das criptas e a diarreia com sangue.

Figura 10 - Avaliação da ingestão de água (A, B) e do consumo alimentar (C, D), semanal e total, segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, N-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e N-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 % + NAC - Resultados expressos em média \pm EP. ** = $p < 0,01$, vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados das figuras A e C. Pós-teste de Dunn's foi aplicado na figura B. Pós-teste de Tukey foi aplicado nos dados da figura D.



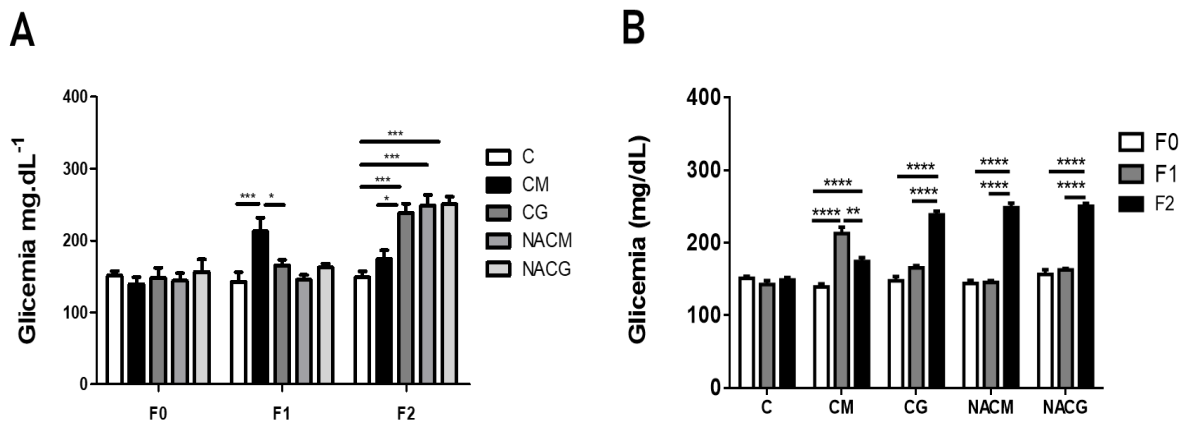
Semelhante a este trabalho, Melgar et al. (2005) e Parmar et al. (2014), em seus modelos de colite induzida por SSD oral a 3 e 5 % (p/v), respectivamente, por sete dias, não observaram mudanças na massa corporal total, quando comparados ao controle, e ao contrário deste modelo, não houve alterações no consumo alimentar. Em contrapartida, outros estudos como o de Trivedi e Jena (2013), corroboraram as repercussões clínicas da colite (significativa perda ponderal, diarreia sanguinolenta e baixa ingestão alimentar) com o uso de SSD a 3% (m/v), por sete dias consecutivos (MELGAR, 2005; PARMAR; TRIVEDI; JENA, 2014; TRIVEDI; JENA, 2013). Moura et al., (2016), por sua vez, também não identificaram diferenças no ganho ponderal em seu modelo de CUI leve, tampouco após a oferta de 100 mg kg⁻¹d⁻¹ de NAC via oral.

Figura 11 - Avaliação do ganho ponderal intergrupo de acordo com a fase do experimento (A), total (B) e intragrupo (C), segundo o grupo experimental: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, *N*-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e *N*-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 % + NAC - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados das figuras 11 A e C. Pós-teste de Dunn's foi aplicado na figura 11 B. F0 = antes do tratamento com NAC; F1 = após 30 dias de tratamento com NAC; F2 = após o período de indução da colite moderada e grave (7 dias) concomitante com suplementação com NAC para os grupos NACM e NACG.



Em relação à glicemia, analisando-se a Figura 12A, percebe-se que na F1 o grupo CM apresentou maiores níveis glicêmicos quando comparado aos grupos C e NACM. Porém, essa alteração não permaneceu na F2. Apesar dos animais desse grupo, no momento da aferição da glicemia na F2 (dia 31) estarem recebendo o mesmo tratamento que o os grupos C e CG, ou seja, a dieta comercial RHOSTER®, sem indução da colite, esses animais apresentaram um maior ganho ponderal (Figura 11 C), que em seguida se normalizou, e que pode ser uma justificativa para a elevação da glicemia.

Figura 12 - Avaliação da glicemia de jejum segundo a fase experimental (A), e intragrupo (B), segundo o grupo de tratamento: Controle (C), Colite Moderada (CM) – sulfato de sódio dextrana (SSD) 3 % -, Colite grave (CG) – SSD 5 % -, N-acetilcisteína Moderado (NACM) – SSD 3 % + NAC – e N-acetilcisteína Grave (NACG) – SSD 5 % + NAC - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,001$ vs grupo C. Pós-teste de Boniferroni foi aplicado nos dados. F0 = antes do tratamento com NAC; F1 = após 30 dias de tratamento com NAC; F2 = após o período de indução da colite ulcerativa moderada e grave (7 dias) e fase de tratamento com NAC para os grupos NACM e NACG.**



Já na F2 (último dia de experimento), observa-se que no grupo NACM ocorreu um aumento significativo na glicemia (vs C e CM), indicando que a NAC apresentou ação hiperglicêmica em animais com colite moderada. Outro achado nessa fase foi o quadro hiperglicêmico identificado na colite grave provocou tratada ou não com NAC, quando comparada ao grupo C.

Ao analisar a variação glicêmica intragrupo ao longo do período experimental (Figura 12B), confirma-se a elevação inicial na glicemia do grupo CM, que se normalizou ao final do experimento, além do aumento significativo dos níveis glicêmicos nos grupos CG, NACM e NACG.

Esses resultados estão de acordo com as alterações metabólicas observadas na CUI, onde a resposta inflamatória crônica leva a uma maior captação de glicose e de outros substratos energéticos pelas células imunes ativadas, resultando no aumento da secreção de insulina e hiperinsulinemia. Adicionalmente, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias interferem na via de sinalização do receptor

de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) – 1, ocasionando resistência insulínica periférica e consequente intolerância à glicose (KARRASCH; OBERMEIER; STRAUB, 2014).

Os achados do presente trabalho em relação ao aumento da glicemia causado pela ingestão de NAC diferem do encontrado por Moura et al., (2016), em seu modelo de CUI leve (SSD a 2% - m/v) em ratos, quando não se observaram alterações na glicemia, em quaisquer dos grupos experimentais (MOURA et al., 2016). Outro trabalho, desenvolvido por Nogueira et al., (2018), investigando o papel da NAC sobre a glicemia, mas em um modelo de camundongos com nefropatia diabética, verificaram que a oferta de 600 mg L⁻¹ deste antioxidante, mesmo não ocasionando alterações na massa corporal, exerceu significativo efeito hipoglicêmico (NOGUEIRA et al., 2018).

As ações hipoglicêmicas da NAC já são estabelecidas na comunidade científica, sendo esta substância utilizada em modelos animais de diabetes, devido ao seu poder hipoglicêmico (FALACH-MALIK et al., 2016). O que poderia justificar os efeitos adversos da NAC no modelo deste trabalho seria a interação com as diferentes vias inflamatórias e oxidantes envolvidas na colite moderada e grave, não presentes no diabetes, o que tornaria ineficaz a ação hipoglicemiante do suplemento.

Diante disso, percebe-se que os estudos são contraditórios quanto a influência da colite sobre os parâmetros metabólicos, independente da dose e do tempo de indução da doença, tornando evidente que múltiplas variáveis intrínsecas ao animal estão envolvidas, na intensidade da sintomatologia, incluindo sua genética, sistema imune e microbiota. Adicionalmente, o efeito hipoglicêmico da NAC ainda apresenta controvérsias, sendo necessários desenhos experimentais que padronizem a dosagem, via de administração e duração do tratamento que permitam elucidar de forma concreta esse papel.

5.3 Avaliação do SSD e/ou NAC sobre o comprimento do cólon

O comprimento do cólon tem sido utilizado como parâmetro para estimar a intensidade da colite. Em relação a esse dado, percebe-se o SSD não teve influência sobre o comprimento deste órgão, ao se comparar os grupos CM e CG com o grupo C. Entretanto, foi observada diferença significativa quando se compara o grupo NACG vs grupo C, sugerindo que o tratamento com NAC, na colite grave provocou encurtamento do cólon por uma possível resposta inflamatória mais proeminente

(Tabela 1). Estes achados divergem daqueles demonstrados por Cha et al. (2017), onde em seu modelo experimental de colite induzido por SSD a 2% (m/v), a administração prévia à indução (três dias) e concomitante ao SSD (sete dias) de 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ de NAC, protegeu contra o encurtamento do cólon, verificado nos grupos com a colite. Moura et al. (2016), por sua vez, no modelo de colite induzida por SSD a 2% (m/v), durante 7 dias consecutivos, observaram que a oferta de NAC (100 mg kg⁻¹ d⁻¹) e de SSD, não alterou o comprimento do cólon de ratos (CHA et al., 2017; MOURA et al., 2016).

Esses resultados indicam que há divergência na literatura, quanto a esse parâmetro e nos permitem sugerir que é possível que uma maior dose de NAC, por um maior espaço de tempo, na apresentação grave da colite, leve a alterações nas vias inflamatórias envolvidas, que resultam em encurtamento do cólon.

5.4 Avaliação do SSD e/ou NAC sobre os pesos absoluto e relativo dos órgãos

A colite (moderada e grave) e o tratamento com NAC não ocasionaram alterações nos pesos do cólon e do rim. Moura et al. (2016), semelhante a este trabalho, não verificaram alterações no peso do cólon em seu modelo leve de colite induzida por SSD (2% m/v), tampouco nos grupos que receberam NAC (100 mg kg⁻¹ d⁻¹). Por outro lado, houve um aumento nos pesos relativo/absoluto do baço nos grupos que receberam SSD e/ou NAC, que foi significativo no grupo NACG quando comparado aos animais do grupo C, indicando assim, inflamação nesse órgão (Tabela 1). O baço é um órgão linfóide que possui células de defesa (linfócitos T e B) que atuam combatendo antígenos advindos da corrente sanguínea pela veia esplênica, cujo aumento reflete o estado ativado dessas células do sistema imune mediante um processo inflamatório (BRONTE; PITTET, 2013).

Tabela 1 - Comprimento do intestino e pesos absoluto e relativo do cólon, rim e baço segundo o grupo estudado (média \pm EP). *p < 0,05; **p < 0,01. Foi aplicado pós-teste de Tukey- Legenda - N-acetilcisteína (NAC).

GRUPO	Comprimento do cólon (cm)	Cólon (g)	Razão cólon/peso corporal	Rim (g)	Razão rim/peso corporal	Baço (g)	Razão baço/peso corporal
Controle	11,5 \pm 1,67	0,283 \pm 0,020	0,008 \pm 0,0005	0,295 \pm 0,015	0,008 \pm 0,0004	0,194 \pm 0,026	0,005 \pm 0,0007
Colite Moderada	10,76 \pm 1,36	0,308 \pm 0,015	0,009 \pm 0,0002	0,276 \pm 0,015	0,008 \pm 0,0003	0,295 \pm 0,066	0,008 \pm 0,001
Colite Grave	10,3 \pm 0,74	0,314 \pm 0,023	0,009 \pm 0,0008	0,277 \pm 0,009	0,008 \pm 0,0002	0,293 \pm 0,034	0,008 \pm 0,001
NAC Moderada	10,3 \pm 1,24	0,292 \pm 0,013	0,008 \pm 0,0003	0,264 \pm 0,012	0,007 \pm 0,0003	0,341 \pm 0,034	0,010 \pm 0,001
NAC Grave	9,06 \pm 1,24*	0,257 \pm 0,012	0,008 \pm 0,0005	0,240 \pm 0,005	0,007 \pm 0,0001	0,335 \pm 0,024**	0,010 \pm 0,0007*

5.5 Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, capacidade antioxidante e atividade inflamatória em nível colônico e renal

- Efeitos das colites moderada e grave e do tratamento com NAC sobre o cólon

A colite ulcerativa compreende uma interação complexa entre células do sistema imune e componentes antigênicos presentes na mucosa que propiciam um cenário inflamatório crônico caracterizado por aumento das citocinas pró-inflamatórias circulantes, EROs, quimiocinas, moléculas de adesão, produtos reativos advindos da peroxidação lipídica e outros mediadores inflamatórios e da resposta imune, os quais estimulam a manutenção e a progressão dos efeitos deletérios às células epiteliais intestinais induzindo necrose e apoptose descontrolada. Além disso, o dano à mucosa colônica requer o aumento da produção de ATP para reparação tecidual. Isso leva ao aumento do consumo de oxigênio, via cadeia transportadora de elétrons que resulta na produção de mais EROs e disfunção mitocondrial. A baixa capacidade antioxidante colônica associada ao arsenal pró-oxidante conduz ao estresse oxidativo característico, o qual agrava significativamente o processo inflamatório intestinal (ACHITEI et al., 2013; DAMIANI et al., 2007; PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014).

Considerando que uma substância com perfil antioxidante e anti-inflamatória, como a NAC, pode atuar sobre o estresse oxidativo e atenuar esse arsenal inflamatório, como foi visto em nosso grupo de pesquisa na colite leve (MOURA et al., 2016), seus efeitos foram também investigados no contexto da colite moderada e grave.

Os neutrófilos na lâmina própria da mucosa inflamada são marcadores da atividade leucocitária na fase aguda da colite e para estimar seus níveis, a atividade da MPO foi mensurada (Figura 13A). Percebe-se que o SSD não provocou mudanças na produção dessa enzima quando comparado ao C, e o tratamento com NAC também não teve influência sobre este parâmetro. Resultados divergentes foram descritos por Gao et al. (2018) e Yu et al. (2009), que confirmaram a infiltração neutrofílica pelo aumento dos níveis de MPO, em seu modelo de colite induzida por SSD a 3% (m/v) (GAO et al.; WANG et al., 2017). Adicionalmente, Amrouche-Mekkioui e Djerdjourin. (2012) verificaram que houve infiltrado inflamatório significativo com

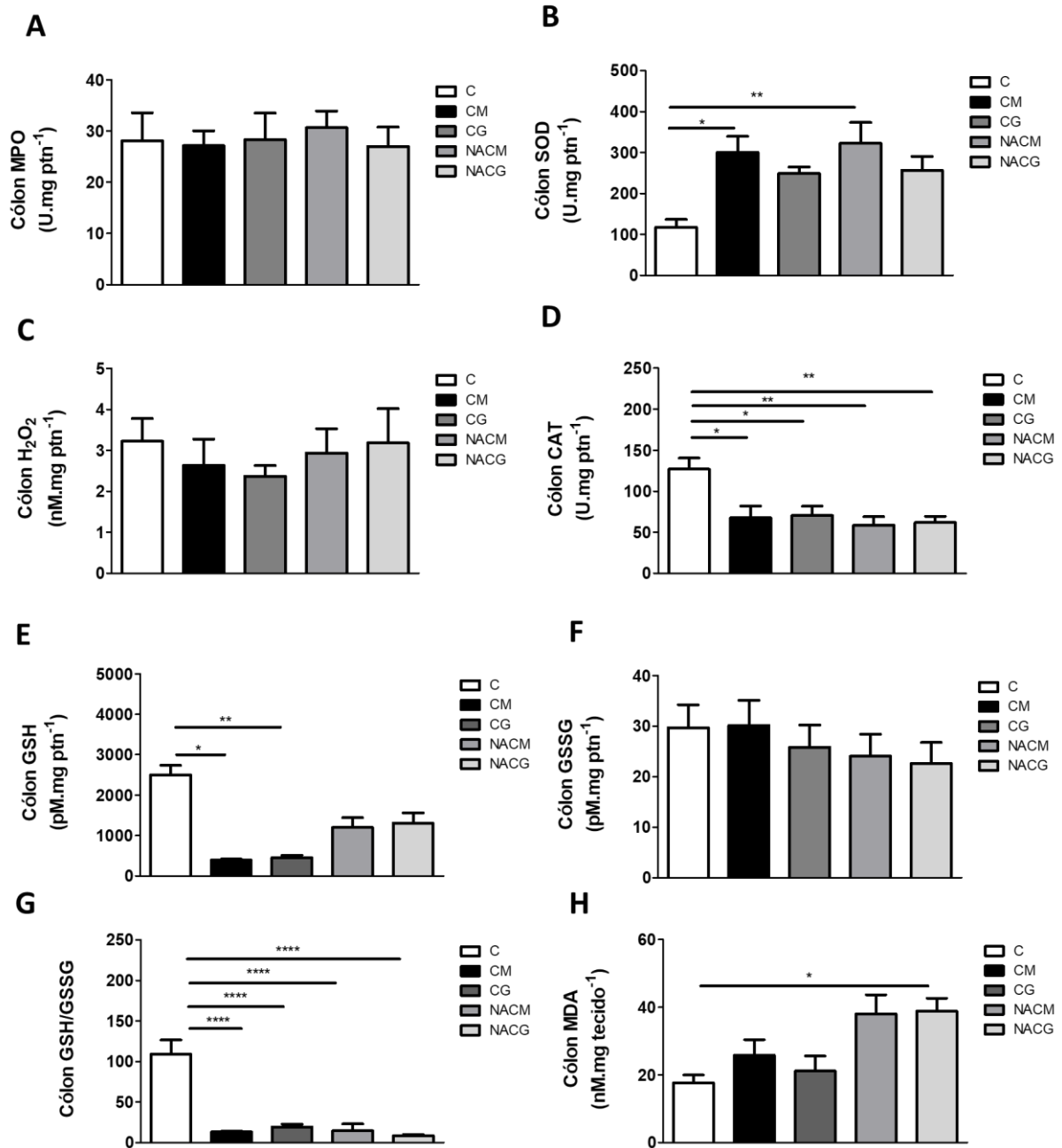
SSD a 5% (m/v) e a oferta de NAC ($150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) atenuou esse cenário pela diminuição da atividade da MPO (AMROUCHE-MEKKIOUI; DJERDJOURI, 2012).

Neste estudo, a relação dos níveis colônicos de MPO com a atividade neutrofílica não foi corroborada, e este achado pode estar relacionado à não padronização do método na literatura para sua determinação, bem como a ausência de dados concretos acerca da concentração destes leucócitos, que são provenientes da MPO na colite.

Em relação à capacidade antioxidante enzimática, a SOD, responsável pela dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , teve seus níveis significativamente ativada nos grupos com colite moderada, quando comparados ao C (Figura 13B), sendo que a NAC não influenciou a mudança nesses níveis. Esses resultados podem ser atribuídos ao mecanismo compensatório do cólon frente ao aumento de EROs circulantes, na tentativa de combater essas espécies danosas. Ao analisar os níveis teciduais de H_2O_2 , percebe-se que não houve diferença entre os grupos experimentais (Figura 13C), indicando que essa espécie reativa proveniente da dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e/ou de outras reações oxidativas pode ter sido reduzida a concentrações basais por enzimas que atuam na sua decomposição em água e oxigênio, como a CAT e as peroxidases. A atividade da CAT, no entanto, foi diminuída expressivamente nos grupos CM e CG, não sofrendo influência do tratamento com NAC (Figura 13D), a qual indica que tanto o SSD (3 % e 5 % m/v) quanto a NAC não causaram alterações no requerimento desta enzima.

De modo similar, foi observado uma redução significativa dos níveis de GSH nas colites moderada e grave (Figura 13E), que refletiu na diminuição na razão (GSH/GSSG) (Figura 13G). Por outro lado, apesar dos grupos com colites tratados com NAC não apresentarem alterações nos níveis isolados de GSH e GSSG (Figura 13E), ao analisar sua razão (GSH/GSSG), verifica-se uma redução significativa, comparativamente ao grupo controle (Figura 13G); seguindo o mesmo padrão de seus grupos de comparação (CM e CG) indicando que a NAC, apesar de manter os níveis normais de GSH (vs grupo C), acaba elevando (não a ponto de ser significativo entre os grupos) os níveis de GSSG, o que acarreta na redução da sua razão.

Figura 13 - Marcadores redox do cólon, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Teste de Tukey foi aplicado para os dados de SOD e Teste de comparação múltipla de Holm-Sidak's; para os demais marcadores foi aplicado o Teste de Dunn.**



Em conjunto, esses dados indicam que apesar da NAC ter conseguido restaurar os níveis de GSH, esta elevação não foi suficiente para melhorar o desequilíbrio provocado pelas colites moderada e grave. Isto nos permite sugerir que o H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , por meio da reação de Fenton, tenha se convertido ao HO^\bullet , causando agressão aos fosfolipídios e proteínas da membrana biológica.

A premissa anterior é confirmada ao avaliar o dano oxidativo mensurado pelos níveis de MDA, onde percebe-se que na colite grave, o tratamento com NAC propiciou o aumento da formação desse aldeído quando se compara ao grupo C (Figura 13H). Apesar de não ser significativa, verificamos também um aumento do MDA no grupo NACM ($38,04 \pm 5,6$ vs $17,64 \pm 2,3$), o que pode ser fisiologicamente importante, indicando que o NAC nas colites moderadas e grave pode agir como pró oxidante, uma consequência provável do seu efeito na redução da razão GSH/GSSG observada nos dois grupos de tratamento. Alguns autores sugerem que o metabolismo da NAC pode produzir radicais livres bem como EROs, via reação de Fenton, ao mesmo tempo que outros afirmam que esta mesma substância pode atuar, quelando metais de transição e assim não os disponibilizando para reações oxidativas, o que gera controvérsias acerca do seu real papel nestas vias (ANDRADE; MOURA; MARQUES, 2015; DAMIANI et al., 2007).

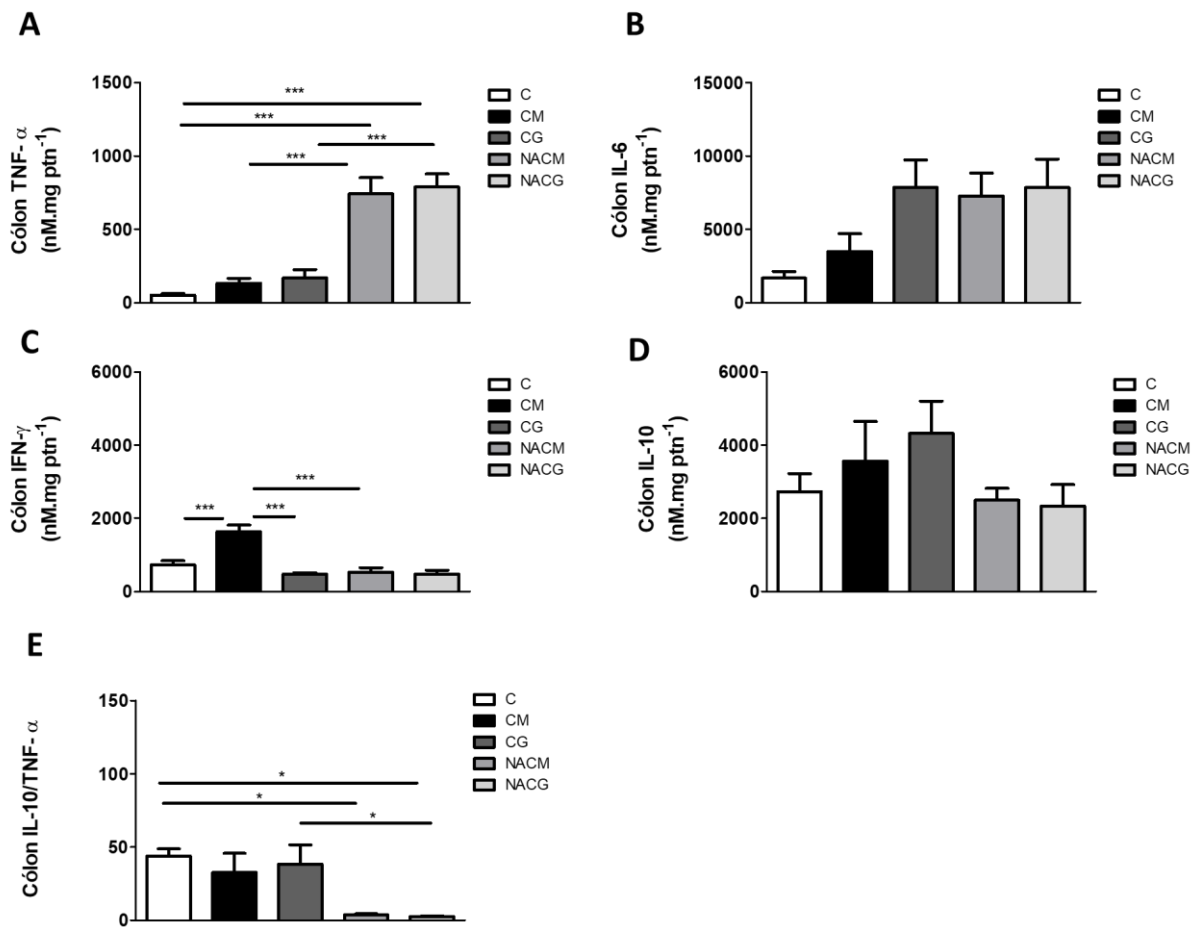
Resultados divergentes foram relatados por Amrouche-Mekkioui e Djerdjourin (2012), onde a oferta de NAC ($150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) durante 45 dias por via oral, propiciou melhora moderada na capacidade antioxidante (SOD, CAT e GSH) e atenuação de marcadores inflamatórios e pró-oxidantes (MPO, $^\bullet\text{NO}$ e MDA). De maneira semelhante, Cha et al., (2017) e Moura et al. (2016), corroboraram os efeitos benéficos da NAC pela diminuição dos marcadores de estresse oxidativo (H_2O_2 e MDA) e da resposta inflamatória (MPO). Contudo, é importante frisar que ambos os trabalhos utilizaram tempo de tratamento e dosagem de NAC, diferentes deste estudo, o que pode justificar os resultados divergentes.

O processo inflamatório crônico direcionado ao cólon é um evento típico na colite e que é responsável por sua sintomatologia, complicações e progressão clínica, caracterizado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β , IFN- γ e IL-17, secretadas por células da imunidade inata e linfócitos T ativados, e pela diminuição de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, cujo papel é inativar os macrófagos e inibir a ação dos linfócitos e células natural killers, auxiliando assim no

controle da inflamação (PIECHOTA-POLANCZYK; FICHNA, 2014). Para avaliar esse parâmetro, os níveis das citocinas pró (TNF- α , IL-6 e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10) foram dosados (Figura 14). Nota-se que houve um aumento significativamente expressivo na concentração de TNF- α nos grupos NACM e NACG quando comparados ao grupo saudável (C) e seus controles doentes sem tratamento (CM e CG, respectivamente), indicando que o tratamento com NAC e não a doença por si levou a ativação da via do TNF- α (Figura 14A). Em relação aos níveis de IFN- γ , somente foi observado aumento significativo dessa citocina no grupo CM (Figura 14C). Adicionalmente, não houve mudanças nos níveis teciduais de IL-6 (Figura 14B) e IL-10 (Figura 14D) em quaisquer dos grupos experimentais. Porém, foi visto redução da razão IL-10/ TNF- α nos grupos tratados com NAC (NACM e NACG) que foi significativa no grupo NACG quando comparado aos grupos C e CG (Figura 14E), sugerindo então que a NAC causou inflamação no órgão.

Em contrapartida, Moura et al. (2016) em seu modelo de colite leve (SSD a 2% - m/v), não observaram alterações no perfil das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10), quando ofertado 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ de NAC. Uraz et al. (2013), por outro lado, relataram que a administração de 500 mg.kg.d⁻¹ de NAC, por via intrarretal, diminuiu dos níveis de TNF- α e de IL-6 em seu modelo de colite induzida por ácido acético (4 % v/v) (URAZ et al., 2013). Esses achados mostram que há divergência na literatura quanto ao modelo de colite e o tempo/dosagem de NAC utilizados, os quais influenciam diretamente os resultados dos estudos.

Figura 14 - Marcadores inflamatórios do cólon, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de IL-10; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.**



Portanto, nestes modelos de colite induzida por SSD (3 e 5%), pode-se perceber que a colite moderada em detrimento da colite grave, apresentou um comportamento distinto quanto ao estímulo da atividade antioxidante enzimática e não enzimática (\uparrow SOD e \downarrow CAT e GSH), sobre a qual o tratamento com NAC não teve influência. Ademais, não foram observadas mudanças no marcador de estresse avaliado (H_2O_2). Em contrapartida, o dano oxidativo causado pela NAC na colite grave foi evidente, o qual foi corroborado pela ativação da via do TNF- α , embora essa elevação não tenha refletido em nível histológico. É importante ressaltar do ponto de

vista inflamatório que a colite grave, diferentemente do esperado, não ocasionou o aumento das citocinas pró-inflamatórias avaliadas, sugerindo que nessa intensidade da doença outras vias inflamatórias e/ou citocinas (IL-1 β , IL-8, IL-18) podem estar sendo acionadas (ITANI et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2005; YASUKAWA et al., 2012).

- Efeitos do SSD e da NAC sobre o rim

Sabe-se que na colite, o aumento da permeabilidade intestinal e a disbiose favorecem a formação de cálculos de urato e de oxalato de cálcio, os quais se difundem, via corrente sanguínea, e se depositam nas células epiteliais renais, causando lesão local. Esta é caracterizada pela destruição das junções comunicantes, recrutamento de células inflamatórias e produção de EROS (DEUCHANDE; ALMEIDA, 2016; YU et al., 2017). Foi demonstrado em alguns estudos que a NAC inibe o estresse nitroxidativo neste órgão por meio de seu papel antioxidante. Neste contexto, os efeitos da NAC sobre o rim foram investigados (NOGUEIRA et al., 2018; YU et al., 2017).

Em relação a atividade da MPO no tecido renal, não foram verificadas alterações em quaisquer dos grupos (Figura 15A), indicando que o recrutamento de neutrófilos em direção a esse sítio não foi expressivo. De maneira similar, a colite (moderada e grave) e a suplementação com NAC não provocaram mudanças nos níveis de SOD e H₂O₂ (vs Grupo C) (Figura 15B e 15C, respectivamente). Por outro lado, houve um aumento na atividade da CAT no grupo NACG quando comparado ao grupo C (Figura 15D). Apesar de visualmente percebemos uma elevação nas médias de CAT nos grupos com colite moderada e grave, esta não foi significativa. Isto sugere que no tecido renal, a atividade da CAT foi mais requerida mediante o contexto inflamatório da colite e que o tratamento com NAC na CUI grave foi eficaz em recrutar essa enzima.

A figura 15 mostra ainda que a NAC, no contexto da colite moderada, foi eficaz em elevar os níveis de GSH (vs Grupos C e CM) (Figura 15E) e reduzir os níveis GSSG (Vs Grupo CM) e, conseqüentemente, promover um aumento na razão GSH/GSSG (vs Grupo C) (Figura 15G). Adicionalmente, na colite grave, a suplementação com NAC, por reduzir os níveis de GSSG (Figura 15F), também foi eficaz na melhora da razão GSH/GSSG, comparativamente ao Grupo C mas não ao

Grupo CG. Em conjunto, esses achados indicam um bom poder antioxidante da NAC sobre o tecido renal, através do fornecimento de cisteína e posterior formação de glutatona a nível renal, provavelmente devido à quantidade abundante de acilase I presente no local (ALDINI et al., 2018; SAMUNI et al., 2013).

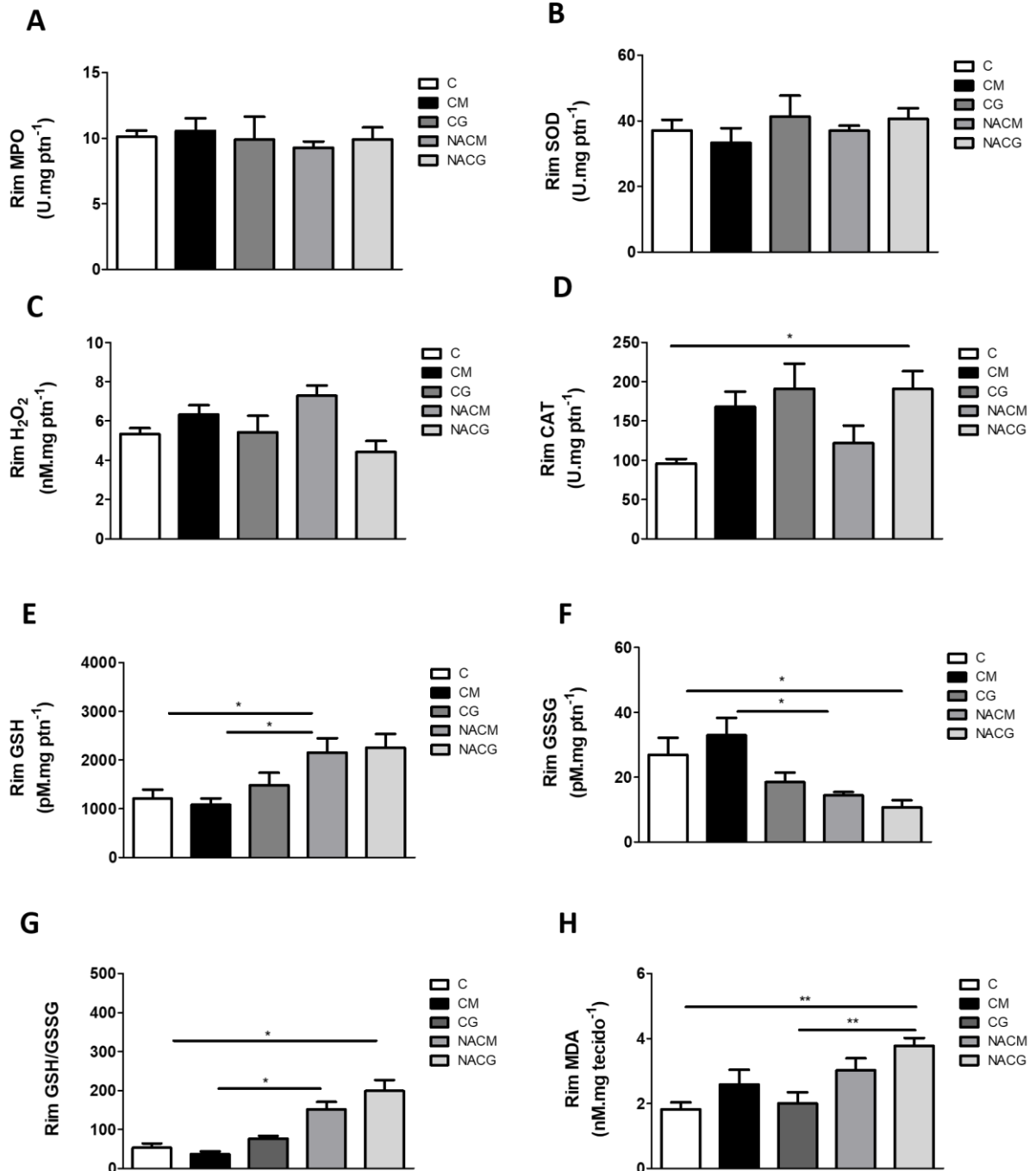
Por outro lado, ao analisar os níveis de MDA é notável o aumento expressivo deste produto de peroxidação lipídica no grupo NACG, quando comparado aos grupos C e CG, evidenciando que a NAC causou dano oxidativo em um tecido extraintestinal, mesmo tendo aumentado alguns marcadores da atividade antioxidante (CAT e GSH e razão GSH/GSSG) (Figura 15H).

Em outros trabalhos, ao se investigar os efeitos da NAC sobre o tecido renal mediante condições onde o estresse oxidativo é eminente, foi verificado resultados diferentes do nosso estudo, como o realizado por Kondakçi et al., (2016), com um modelo de estresse oxidativo renal induzido por homocisteína tiolactona. Neste experimento, o tratamento com $1 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de NAC, durante seis semanas, promoveu a redução dos níveis teciduais de EROs e MDA (KONDAKÇI et al., 2017).

Uma forte limitação deste estudo, é a não mensuração das ERNS, como por exemplo, nitritos e nitratos (marcadores indiretos do óxido nítrico), o que poderia explicar a elevação da peroxidação lipídica identificada nesse tecido.

Nogueira et al., (2018) demonstraram que fornecimento de NAC na água de beber (600 mg L^{-1}), por oito semanas, teve efeito protetor contra injúria renal induzida pelo diabetes, melhorando a defesa antioxidante, pelo aumento da atividade da CAT (semelhantemente ao encontrado neste estudo para o grupo NACG) e da GSH (como identificado neste trabalho no grupo NACM), como pela atenuação do estresse oxidativo por meio da inibição da iNOS (NOGUEIRA et al., 2018).

Figura 15 - Marcadores redox do rim, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$ (teste de Tukey).**

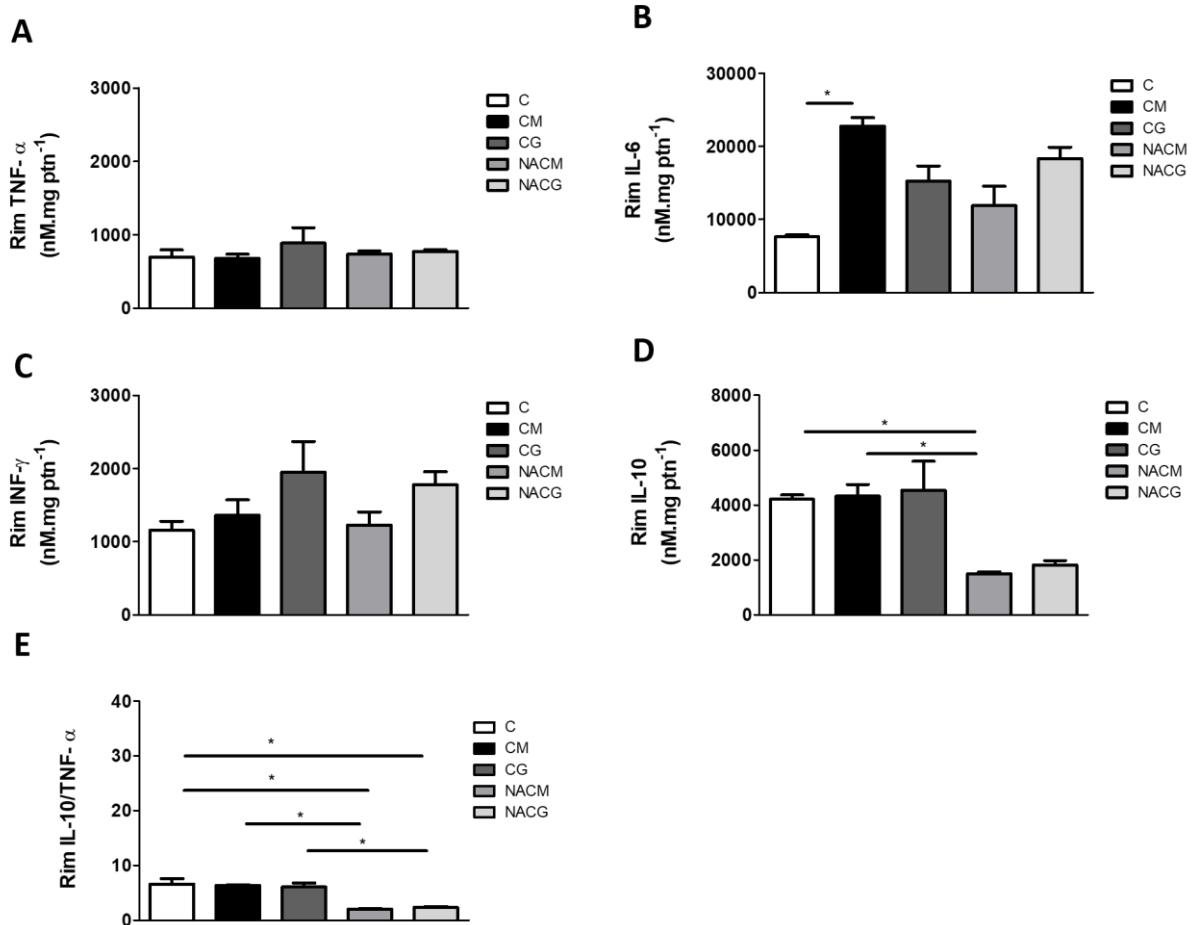


O perfil inflamatório renal também foi investigado neste trabalho (Figura 16). Os resultados mostram que as vias dos TNF- α e do IFN- γ não foram estimuladas visto que não houve mudanças em seus níveis em qualquer dos grupos do estudo (Figura 16A e 16C). Entretanto, percebe-se que a colite moderada causou um aumento significativo da IL-6 em relação ao grupo C, sugerindo que em nível renal e nessa gravidade da colite, as vias dessa citocina são ativadas (Figura 16B). As concentrações de IL-10, por sua vez, foram significativamente reduzidas no grupo NACM e fisiologicamente no grupo NACG (mas não significativamente) quando se compara aos grupos C e CM (Figura 16D). Além disso, ao avaliar a razão IL-10/TNF- α (Figura 16E), nota-se uma diminuição significativa nos grupos tratados com NAC (NACM e NACG) em relação aos grupos nos quais a colite foi induzida (CM e CG) e ao grupo saudável (C), indicando assim, que a NAC provocou uma inibição das vias anti-inflamatórias.

Yao et al. (2017), por sua vez, verificaram que a administração oral de 150 mg kg⁻¹ d⁻¹ de NAC, durante sete dias consecutivos, resultou na redução dos níveis de TNF- α e de IL-6 em seu modelo de síndrome nefrótica induzida por adriamicina, porém as concentrações de IL-10 não foram mensuradas (YAO; CAI; SHENG, 2017).

Portanto, a NAC (na colite grave), em nível renal, promoveu uma maior produção de CAT local em detrimento da SOD como possível tentativa de neutralizar os níveis circulantes de H₂O₂, além de melhorar a reserva antioxidante endógena (\uparrow GSH e \downarrow GSSG). Contudo, o dano oxidativo às membranas fosfolipídicas foi expressivo neste grupo, sugerindo que a NAC, nesta intensidade da doença, pode estar se comportando de forma reativa por meio da possível formação de ânion tiolato, o qual interage com outras moléculas oxidantes. Além disso, a heterogeneidade verificada nos estudos pode ser explicada pela dose utilizada e pelo período de oferta da NAC, variabilidade dos métodos para mensuração desses marcadores, bem como pelo próprio contexto inflamatório inerente a cada doença estudada.

Figura 16 - Marcadores inflamatórios do rim, segundo o grupo de tratamento: Controle (C); Colite Moderada (CM) (colite moderada induzida por sulfato de sódio dextrana – SSD – 3%); Colite grave (CG) (colite grave induzida por SSD 5%); Colite moderada tratada com NAC (NACM); e colite grave tratada com NAC (NACG) - Resultados expressos em média \pm EP. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Teste de Dunn foi aplicado para os dados de IL-10; e para os demais dados foi aplicado o Teste de Tukey.



6 CONCLUSÃO

Neste estudo, o modelo experimental utilizando SSD, na água de beber, durante sete dias consecutivos, conseguiu induzir tanto a colite moderada quanto a grave, o que foi evidenciado pelas alterações histológicas, as quais demonstraram alterações na arquitetura colônica, características da doença. A administração prévia de NAC, por 30 dias consecutivos na água de beber e, posteriormente de forma concomitante à indução das formas de colite, parece ter exercido efeito protetor, restaurando parcialmente o epitélio lesionado.

Adicionalmente, as colites moderada e grave, induzidas por SSD (3% e 5% - m/v), respectivamente, e a administração de NAC ($150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) não ocasionaram mudanças na massa corpórea dos animais, mesmo tendo sido observado um aumento no consumo alimentar ao final do experimento no grupo NACG, comportamento que pode ser atribuído a um mecanismo compensatório frente aos aspectos fisiopatológicos presentes. Em relação à glicemia, verificou-se que a colite, principalmente na forma grave, provocou um quadro hiperglicêmico, que a suplementação com NAC não conseguiu reverter.

As análises laboratoriais colônicas são contraditórias aos achados histológicos. Na colite moderada, com ou sem a oferta de NAC, ocorreu um aumento na atividade SOD e diminuição nos níveis de CAT e GSH, porém sem alteração nas concentrações de H_2O_2 . No entanto, mesmo não sendo observado em nível histológico, o dano oxidativo causado pela NAC na colite grave foi evidente (\uparrow MDA), o qual foi corroborado pelo aumento nos níveis de TNF- α e da diminuição da razão IL10/TNF- α .

De maneira similar, em nível renal, o dano oxidativo às membranas foi expressivo quando a NAC foi administrada na colite grave, mesmo tendo aumentado a produção de CAT e melhorado a reserva antioxidante endógena (\uparrow GSH, \downarrow GSSG e \uparrow razão GSH/GSSG).

Portanto, esses resultados nos permitem sugerir que a NAC, especialmente na colite grave, pode estar se comportando de forma pró-reativa e pró-oxidante, o que gera uma série de questionamentos acerca das reais ações anti-inflamatória e antioxidante da NAC, mediante o contexto inflamatório da colite. Por outro lado, conduz a uma nova perspectiva, pois deve ser considerado que no campo da biologia

redox, vários fatores estão envolvidos nas intrincadas vias e mecanismos relacionados ao processo inflamatório, sistema imune e estresse oxidativo, pois como já foi referido neste trabalho, há uma complexa rede de interações e de sinalizações que influenciam sobremaneira a resposta inerente a este cenário.

7 PERSPECTIVAS E DIRECIONAMENTOS

Diante dos resultados desse trabalho, percebe-se que ainda existem muitas lacunas a serem investigadas acerca dos efeitos da NAC, principalmente no contexto da colite. É necessário que próximos estudos sejam conduzidos de forma a esclarecer os mecanismos e as vias pelos quais a NAC está exercendo ação pró-inflamatória e pró-oxidante, como a determinação das ERNs (limitação do trabalho), quantificação de colágeno, avaliação da apoptose e investigação das vias da IL-10 e NF- κ B, além de outras células/ componentes do sistema imune e outras citocinas que possam estar envolvidas (macrófagos, neutrófilos, células T ativadas, inflamossoma NLRP3, IL-1 β , IL-8, IL-18). Ademais, é imprescindível a avaliação da colite e da NAC em outros órgãos. Dessa forma, irá direcionar o estabelecimento de terapias mais eficazes e seguras.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, J. et al. Immunologic and genetic markers in patients with idiopathic ocular inflammation and a family history of inflammatory bowel disease. **American Journal of Ophthalmology**, v. 154, n. 1, p. 72–77, 2012.
- ACHITEI, D. et al. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 5, p. 1244–1249, 2013.
- AEBI, H. Catalase. **Methods of Enzymatic Analysis**, p. 673–684, 1974.
- AJONK, F. R. P.; IESS, K. A. R.; OMMER, A L. S. N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits 26S Proteasome Function : v. 32, n. 6, p. 536–543, 2002.
- ALDINI, G. et al. Free Radical Biology and Medicine Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal : toward the discovery of a novel class of bioactive compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 145–156, 2014.
- ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent : the reasons why. **Free Radical Research**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2018.
- ALIPOUR, M. et al. MUCOSAL BARRIER DEPLETION AND LOSS OF BACTERIAL DIVERSITY ARE PRIMARY ABNORMALITIES IN PAEDIATRIC ULCERATIVE COLITIS Accepted. **Journal of Crohn's and Colitis**, p. 1–16, 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. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 209–217, 2012.
- ANANTHAKRISHNAN, A. N. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.
- ANDRADE, K. Q. DE; MOURA, F. A.; MARQUES, J. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases : Therapeutic Possibilities of N -Acetylcysteine. p. 30269–30308, 2015.
- ATKURI, K. R. et al. Deficiency. v. 7, n. 4, p. 355–359, 2015.

BACHHAWAT, A. K. et al. Biochimica et Biophysica Acta Glutathione transporters ☆. v. 1830, p. 3154–3164, 2013.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 212–223, 2009.

BALLESTEROS POMAR, M. D. . et al. Impacto de la nutrición en la evolución de la enfermedad inflamatoria intestinal. **Nutr Hosp.Nutr Hosp**, v. 25, n. 2, p. 181–192, 2010.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn ' s disease. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1590–1605, 2012.

BENGTSON, M. et al. Familial aggregation in Crohn ' s disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 3, n. 2, p. 92–99, 2009.

BERNSTEIN, C. N. et al. A Population-Based Case Control Study of Potential Risk Factors for IBD. 2006.

BRADFORD, M. M. et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRONTE, V.; PITTET, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. **Immunity**, v. 39, n. 5, p. 806–818, 2013.

BUANNE, P. et al. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice Abstract : Polymorphonuclear leukocyte infiltra-. v. 82, n. November, p. 1239–1246, 2007.

CASELLA, G. et al. Neurological disorders and inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 27, p. 8764–8782, 2014.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and / or pathological conditions. v. 157, p. 1–11, 2009.

CEDERHOLM, T. et al. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 49–64, 2017.

CHA, H. et al. Increased susceptibility of IDH2-deficient mice to dextran sodium sulfate-induced colitis. **Redox Biology**, v. 13, n. May, p. 32–38, 2017.

CICCIA, F.; FERRANTE, A.; TRIOLO, G. Intestinal dysbiosis and innate immune responses in axial spondyloarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 28, n. 4, p. 352–358, 2016.

CLARK, J. D. et al. The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **ILAR Journal**, v. 38, n. 1, p. 41–48, 1997.

CORICA, D.; ROMANO, C. Renal involvement in inflammatory bowel diseases. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 2, p. 1–10, 2015.

COSNES, J.; CORTOT, A. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. **YGAST**, v. 140, n. 6, p. 1785–1794.e4, 2011.

COSTELLO, M. E. et al. Brief Report: Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 67, n. 3, p. 686–691, 2015.

DAMIANI, C. R. et al. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 22, n. 11, p. 1846–1851, 2007.

DE ROSA, S. C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 10, p. 915–929, 2000.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: Current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 78–86, 2011.

DEEPAK, P.; STOBAUGH, D. J.; EHRENPREIS, E. D. Infectious Complications of TNF- α Inhibitor Monotherapy versus Combination therapy with Immunomodulators in Inflammatory Bowel Disease : Analysis of the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System *. v. 22, n. 3, p. 269–276, 2013.

DENNIS, M. et al. Review New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease IN. p. 895–904, 2005.

DEUCHANDE, S.; ALMEIDA, M. Lesão Renal na Doença Inflamatória Intestinal : Revisão da Literatura a Propósito de um Caso Clínico. p. 147–154, 2016.

- DIAZ-GRANADOS, N. et al. Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Histopathology , but not Altered Epithelial Ion Transport , Is Reduced by Inhibition of Phosphodiesterase Activity. v. 156, n. 6, p. 2169–2177, 2000.
- DODD, S. et al. Drug Evaluation N -acetylcysteine for antioxidant therapy : pharmacology and. p. 1955–1962, 2008.
- FALACH-MALIK, A. et al. N-Acetyl-L-Cysteine inhibits the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in diabetes-prone mice. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 9, p. 3744–3756, 2016.
- FAROMBI, E. O. et al. Dietary protocatechuic acid ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis and hepatotoxicity in rats. **Food and Function**, v. 7, n. 2, p. 913–921, 2016.
- FEUERSTEIN, J. D.; CHEIFETZ, A. S. Ulcerative colitis: Epidemiology, diagnosis, and management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 11, p. 1553–1563, 2014.
- FRANSEN, M. et al. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 9, p. 1363–1373, 2012.
- GAO, W. et al. The combination of indirubin and isatin attenuates dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice. p. 1–37, [s.d.].
- GEIER, M. S.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 1–11, 2007.
- GIUSTARINI, D. et al. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 112, n. May, p. 360–375, 2017.
- GREUTER, T.; NAVARINI, A.; VAVRICKA, S. R. Skin Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 2017.
- HAJJ HUSSEIN, I. A. et al. Inflammatory bowel disease in rats: Bacterial and chemical interaction. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 25, p. 4028–4039, 2008.

HARBORD, M. et al. The first european evidence-based consensus on extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 10, n. 3, p. 239–254, 2016.

HØIVIK, M. L. et al. Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: Results from the IBSEN study. **Gut**, v. 62, n. 3, p. 368–375, 2013.

HOY, A. et al. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 1, p. 2–8, 2002.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutaciona e enzimas relacionadas: Papel biologico e importancia em processos patologicos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HURST, G. A.; SHAW, P. B.; LEMAISTRE, C. A. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. **American Review of Respiratory Disease**, v. 96, n. 5, p. 962–970, 1967.

ITANI, S. et al. NLRP3 inflammasome has a protective effect against oxazolone-induced colitis : a possible role in ulcerative colitis. **Nature Publishing Group**, n. December, p. 1–14, 2016.

JAKUBOWSKI, A. et al. Rising hospitalization rates for inflammatory bowel disease in Poland. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej**, v. 124, n. 4, p. 180–190, 2014.

JENA, G.; TRIVEDI, P. P.; SANDALA, B. Oxidative stress in ulcerative colitis: An old concept but a new concern. **Free Radical Research**, v. 46, n. 11, p. 1339–1345, 2012.

JONASSEN, J. A. et al. Oxalate toxicity in renal cells. **Urological Research**, v. 33, n. 5, p. 329–339, 2005.

KARRASCH, T.; OBERMEIER, F.; STRAUB, R. H. Systemic metabolic signaling in acute and chronic gastrointestinal inflammation of inflammatory bowel diseases. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 6, p. 445–451, 2014.

KNUTSON, C. G. et al. Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease. **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences**, v. 110, n. 26, p. E2332–E2341, 2013.

KONDAKÇI, G. et al. The effect of N-acetylcysteine supplementation on serum homocysteine levels and hepatic and renal oxidative stress in homocysteine thiolactone-treated rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 123, n. 2, p. 128–133, 2017.

LIN, P. et al. HLA-B27 and human β 2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

MADY, R.; GROVER, W.; BUTRUS, S. Ocular Complications of Inflammatory Bowel Disease. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–5, 2015.

MALATY, H. M.; HOU, J. K.; THIRUMURTHI, S. Epidemiology of inflammatory bowel disease among an indigent multi-ethnic population in the United States. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 3, n. 1, p. 165–170, 2010.

MANICHANH, C. et al. The gut microbiota in IBD. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 10, p. 599–608, 2012.

MAYNE, C. G.; WILLIAMS, C. B. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1772–1778, 2013.

MELGAR, S. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 6, p. G1328–G1338, 2005.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46–54.e42, 2012.

MORÍS, G. Inflammatory bowel disease: An increased risk factor for neurologic complications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 5, p. 1228–1237, 2014.

MOSCHEN, A. R.; KASER, S.; TILG, H. Non-alcoholic steatohepatitis: A microbiota-driven disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 24, n. 11, p. 537–545, 2013.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.

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. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

NOGUEIRA, G. B. et al. N-acetylcysteine protects against diabetic nephropathy through control of oxidative and nitrosative stress by recovery of nitric oxide in rats. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 78, p. 22–31, 2018.

OIKONOMOU, K. et al. Renal manifestations and complications of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 4, p. 1034–1045, 2011.

OKA, S. et al. N-acetylcysteine suppresses TNF-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaB kinases. **FEBS letters**, v. 472, n. 2–3, p. 196–202, 2000.

OLPIN, J. D. et al. Beyond the Bowel: Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. **RadioGraphics**, v. 37, n. 4, p. 1135–1160, 2017.

ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606–1619, 2012.

PARENTE, J. M. L. et al. Marked expansion of inflammatory bowel diseases in Northeast Brazil in the last decades. **World Journal of Gastroenterology**, 2018.

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. **Reproductive Toxicology**, v. 49, p. 171–184, 2014.

PAVLICK, K. P. et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease^{1,2} ¹This article is part of a series of reviews on “Reactive Oxygen and Nitrogen in Inflammation.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. ²Gues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 311–322, 2002.

PEI, Y. et al. Review Article Biological Activities and Potential Oral Applications of N-Acetylcysteine : Progress and Prospects. v. 2018, 2018.

PEYRIN-BIROULET, L. et al. Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel

Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 9, p. 1324–1338, 2015.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 605–620, 2014.

PIMENTEL-SANTOS, F. M. et al. HLA alleles and HLA-B27 haplotypes associated with susceptibility and severity of ankylosing spondylitis in a Portuguese population. **Tissue Antigens**, v. 82, n. 6, p. 374–379, 2013.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K. Non-invasive biomarkers of oxidative stress: reproducibility and methodological issues. **Redox Report**, v. 9, n. 3, p. 125–143, 2004.

REYES-GORDILLO, K.; SHAH, R.; MURIEL, P. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Current and Future Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. ii, 2017.

REZAIE, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: An epiphenomenon or the cause? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 9, p. 2015–2021, 2007.

ROSENBAUM, J. T. et al. Does the microbiome play a causal role in spondyloarthritis? **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 6, p. 763–767, 2014.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 8, p. 4117–4129, 2013.

SCALDAFERRI, F. et al. VEGF-A Links Angiogenesis and Inflammation in Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 585–595.e5, 2009.

SCHER, J. U.; LITTMAN, D. R.; ABRAMSON, S. B. Review: Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 1, p. 35–45, 2016.

SCHINZARI, F. et al. Tumor necrosis factor- α antagonism improves endothelial dysfunction in patients with Crohn's disease. **Clinical Pharmacology and**

Therapeutics, v. 83, n. 1, p. 70–76, 2008.

SHAPIRO, J. M. et al. Incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Rhode Island: Report from the ocean state Crohn's and colitis area registry. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1456–1461, 2016.

SHEN, Z.-H. et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 5–14, 2018.

SIDDIQUI, M. R. et al. High-Throughput UPLC-MS Method for the Determination of N-Acetyl-L-Cysteine: Application in Tissue Distribution Study in Wistar Rats. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 7, p. 1244–1252, 2016.

SINGH, S. et al. Neurologic complications in patients with inflammatory bowel disease: increasing relevance in the era of biologics. **Inflammatory bowel diseases**, v. 19, n. 4, p. 864–872, 2013.

SINGLA, V. et al. Induction with NCB-02 (curcumin) enema for mild-to-moderate distal ulcerative colitis - A randomized, placebo-controlled, pilot study. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 8, n. 3, p. 208–214, 2014.

TATUM, V. L.; CHANGCHIT, C. K.; CHOW, C. K. Measurement of Malondialdehyde by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Lipids**, v. 25, n. 4, p. 226–229, 1990.

TOMASELLO, G. et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18121–18130, 2014.

TORRES, J. et al. Ulcerative colitis as a progressive disease: The forgotten evidence. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1356–1363, 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. **Chemico-Biological Interactions**, v. 201, n. 1–3, p. 19–30, 2013.

UNGARO, R. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 389, n. 10080, p. 1756–1770, 2017.

- URAZ, S. et al. N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 73, n. 1, p. 61–66, 2013.
- VAN ASSCHE, G. et al. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy after Natalizumab Therapy for Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 4, p. 362–368, 2005.
- VANDOOREN, B. et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in Peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 966–975, 2009.
- VAVRICKA, S. R. et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the swiss inflammatory bowel disease cohort. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 1, p. 110–119, 2011.
- VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. DE C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer. **Cmgh**, v. 1, n. 1, p. 6–16, 2015.
- WANG, K. et al. Dietary propolis ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis and modulates the gut microbiota in rats fed a western diet. **Nutrients**, v. 9, n. 8, 2017.
- WEI, W. et al. Protective effects of wedelolactone on dextran sodium sulfate induced murine colitis partly through inhibiting the NLRP3 inflammasome activation via AMPK signaling. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 27–36, 2017.
- WITSCHI, A. et al. The systemic availability of oral glutathione. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 667–669, 1992.
- WU, P. et al. Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease (review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 2, p. 395–400, 2017.
- YAMADA, S. et al. Marine hydroquinone zonarol prevents inflammation and apoptosis in dextran sulfate sodium-induced mice ulcerative colitis. **PLoS ONE**, v. 9,

n. 11, 2014.

YAMAMOTO, T. et al. Systemic and local cytokine production in quiescent ulcerative colitis and its relationship to future relapse: A prospective pilot study. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 6, p. 589–596, 2005.

YANG, L. et al. A possible role of intestinal microbiota in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

YAO, H.; CAI, Z. Y.; SHENG, Z. X. NAC attenuates adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats through regulating TLR4 signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 1938–1943, 2017.

YASUKAWA, K. et al. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. **Free Radical Research**, v. 46, n. 12, p. 1427–1436, 2012.

YU, L. et al. Calcium oxalate crystals induces tight junction disruption in distal renal tubular epithelial cells by activating ROS/Akt/p38 MAPK signaling pathway. **Renal Failure**, v. 39, n. 1, p. 440–451, 2017.

ZEZOS, P.; KOUKLAKIS, G.; SAIBIL, F. Inflammatory bowel disease and thromboembolism. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 38, p. 13863–13878, 2014.

ZHOU, J. et al. Intravenous Administration of Stable-Labeled N-Acetylcysteine Demonstrates an Indirect Mechanism for Boosting Glutathione and Improving Redox Status. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 8, p. 2619–2626, 2015.