

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- PPGCB**

**EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC) SOBRE HEPATÓCITOS DE
CAMUNDONGOS NORMAIS, DESNUTRIDOS E ALCOOLIZADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ALUNA: Sura Wanessa Santos Rocha

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Christina Alves Peixoto

Laboratório de Ultraestrutura – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ)

Recife

2010

Rocha, Sura Wanessa Santos

Efeito da dietilcarbamazina (DEC) sobre hepatócitos de camundongos normais, desnutridos e alcoolizados / Sura Wanessa Santos Rocha. – Recife: O Autor, 2010.

98 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Christina Alves Peixoto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Farmacologia 2. Filariose 3. Desnutrição 4. Farmaco-álcool - interações I. Título.

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-207

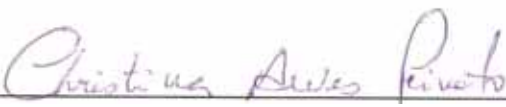
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Sura Wanessa Santos Rocha**

**intitulada:
Efeito da Dietilcarbamazina sobre hepatócitos de camundongos normais, desnutridos e
alcoolizados**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO**

**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Sura Wanessa Santos Rocha faz
jus ao grau de Mestre em Ciências Biológicas pela UFPE, Recife, 27/08/2010.**


**Orientador: Dra. Christina Alves Peixoto
Departamento de Entomologia CPqAM- FIOCRUZ**


**Dr. Mário Ribeiro de Melo-Junior
Departamento de Patologia – UFPE**


**Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura
Departamento de Imunologia – UPE**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter proporcionado essa vitória em minha vida, Deus é FIEL!!!!!!!!!!

Aos meus pais por acreditarem em mim e pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu noivo, Francisco por estar sempre ao meu lado a qualquer hora, sempre me ajudando, me aconselhando e também me proporcionando todo amor e carinho necessário.

A Professora Christina Alves Peixoto pela orientação, incentivo, paciência e credibilidade na realização deste trabalho.

A Professora Ana Célia Oliveira dos Santos pela colaboração, dedicação, conselhos e por não medir esforços em me ajudar.

A Giuliana Schirato pelo apoio nos experimentos e também por toda a equipe do biotério Laurimar, Ceça, Eduardo e Rodrigo, que sempre me ajudaram.

A minha amiga Adriana Oliveira por demonstrar enorme carinho e paciência e por sempre me ajudar quando preciso.

As minhas amigas do laboratório, em especial Karla Barbosa e Fabiana Oliveira pelos momentos de descontração, conselho, incentivo e ajuda.

A todas amigas que fazem parte do Laboratório de Ultraestrutura Edlene, Bruna, Amanda, Dilênia, Mariana, Mayza, pelo apoio e descontração.

As meninas do CETENE Catarina, Carol, Ceça, Jôse, Karina e Gabi que acreditaram em mim e sempre me ajudaram quando precisei.

Aos meus amigos da UPE, André, Tati, Keninha, Clara, Deco, Bob, João e Lúcio que apesar da distância sempre me apoiaram, aconselharam e acreditaram em mim. Muito obrigada pela amizade de vocês.

Aos meus colegas do Aggeu Magalhães Mineo, Sara e Carol.

A todos meus amigos da Primeira Igreja Batista do Recife – PIBR, pelas orações, vigílias, conselhos e pensamentos positivos sobre mim.

A Adenilda, secretária da pós-graduação pela atenção e apoio.

A FACEPE pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	05
2 JUSTIFICATIVA.....	07
3 OBJETIVOS.....	09
3.1 Objetivo geral.....	09
3.2 Objetivos específicos.....	09
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
4.1 Dietilcarbamazina.....	10
4.1.1 Mecanismo de ação da DEC.....	12
4.1.2 O efeito da DEC sobre células de vertebrados.....	12
4.2 Função e Estrutura Hepática.....	14
4.2.1 Fármacos e função hepática.....	15
4.3 Álcool – Aspectos Gerais.....	17
4.3.1 Metabolismo do etanol – desequilíbrio celular.....	19
4.3.2 Alcoolismo e o sistema imune.....	21
4.3.3 Lesão hepática.....	21
4.4 Aspectos Gerais Sobre Desnutrição.....	24
REFERÊNCIAS.....	28

CAPÍTULO I

Artigo.....	42
-------------	----

Article Manuscript: EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC) SOBRE

HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6J SUBMETIDOS À

DESNUTRIÇÃO PROTÉICA.....	43
---------------------------	----

CAPÍTULO III

Artigo	67
--------------	----

Article Manuscript: PROTECTIVE EFFECT OF DIETHYLCARBAMAZINE IN HEPATIC CELLS OF ALCOHOLIC C57BL/6J MICE.....	68
5 CONCLUSÕES.....	95
ANEXO.....	97
Anexo: Parecer do Comitê de Ética.....	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
C	Grupo controle
CD	Grupo controle desnutrido
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CEtOH	Grupo controle alcoolizado
D25	Grupo tratado com DEC 25mg/kg
D50	Grupo tratado com DEC 50mg/kg
DD25	Grupo desnutrido tratado com DEC 25mg/kg
DD50	Grupo desnutrido tratado com DEC 50mg/kg
DEC	Dietilcarbamazina
DHA	Doença hepática alcoólica
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EPT	Eosinofilia pulmonar tropical
EtOH25	Grupo alcoolizado tratado com DEC 25mg/kg
EtOH50	Grupo alcoolizado tratado com DEC 25mg/kg
FA	fosfatase alcalina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização Mundial de Agricultura e Alimento)
G	Partículas de glicogênio
GL	Gotículas lipídicas
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
Li	Lipídeos
L	Lisossomos
Mg	Miligrama

Mi	Mitocôndrias
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo P
NFκB	NF-kappaB (fator de transcrição)
NK	Células natural killer
NO	Oxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Peroxisomos
PEM	Protein-Energy Malnutrition (Desnutrição protéico-energética)
RE	Retículo endoplasmático
REL	Retículo endoplasmático liso
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucléico
RL	Radicais livres
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAMe	S-adenosil-L-metionina
TGF-β	Células T helper
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação estrutural da dietilcarbamazina.....	10
Figura 2: Histologia da estrutura hepática.....	14
Figura 3: Estrutura geral dos componentes do hepatócito.....	15
Figura 4: Metabolismo do etanol demonstrando a participação do CYP 4502E1 nos microsomas hepáticos.....	18
Figura 5: Mecanismos pelos quais o consumo excessivo de etanol pode levar aos danos no fígado.....	20
Figura 6: A ativação do fator de necrose tumoral alfa.....	22
Figura 7: Estimativa do número de pessoas desnutridas por região.....	24
Figura 8: Prevalência de subnutrição na população mundial.....	25

RESUMO

A Dietilcarbamazina (DEC) tem sido utilizada como o principal fármaco filaricida, mas seu mecanismo de ação permanece controverso. Alguns autores têm demonstrado suas propriedades anti-inflamatórias, como um resultado de sua interferência no metabolismo do ácido araquidônico, que inclui as enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase. Outros trabalhos demonstram a alta incidência de alcoolismo e da desnutrição na população de baixa renda do nordeste brasileiro, população esta também afetada pela filariose linfática. O presente estudo verificou a ação da DEC sobre hepatócitos de camundongos desnutridos e alcoolizados para possíveis analogias com casos humanos. Os camundongos foram divididos em nove grupos experimentais (n=8): grupo controle (C, DEC25 e DEC50), grupos desnutridos (CD, DD25 e DD50) e grupos alcoolizados (CEtOH, EtOH25 e EtOH50). Após a indução dos modelos de desnutrição e alcoolismo, os animais dos respectivos grupos foram submetidos ao tratamento com DEC nas concentrações de 25 e 50mg/kg por 12 dias. Foram realizadas análises bioquímicas e fragmentos hepáticos foram processados para microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. A dosagem enzimática de AST apresentou diferenças significativas entre os grupos etílicos, e os níveis de fosfatase alcalina e albumina sérica apresentaram valores significativos apenas entre os grupos desnutridos. Nas análises histológicas do grupo controle desnutrido (CD), observou-se a presença marcante de esteatose hepática. Após o tratamento com a DEC, os grupos DD25 e DD50 apresentaram redução da esteatose. Os grupos alcoólicos e tratados com DEC também houve uma redução bastante evidente dos danos causados pela ingestão crônica de etanol. A análise ultratestrutural confirmou a redução de gotículas lipídicas nos animais desnutridos e tratados com DEC, da mesma forma, os grupos etílicos apresentaram diminuição dos danos e suas organelas se encontraram bem preservadas. A imunohistoquímica revelou expressão bastante evidente dos marcadores inflamatórios IL-6, eNOS, CCR2, VCAM e ICAM no grupo alcoolizado, no entanto o grupo que recebeu DEC não apresentaram imunexpressão evidente desses marcadores. Dessa forma, a DEC torna-se um fármaco de potencial hepatoprotetor para o tratamento da inflamação crônica induzida pelo alcoolismo, bem como da desnutrição.

Palavras-chaves: Dietilcarbamazina, alcoolismo, desnutrição, anti-inflamatório, efeito protetor.

ABSTRACT

Diethylcarbamazine (DEC) has been used as the main drug filaricida, but its mechanism of action remains controversial. Some authors have demonstrated their anti-inflammatory properties as a result of its interference with the metabolism of arachidonic acid, which includes enzymes lipooxygenase and cyclooxygenase. Other studies showed the high incidence of alcoholism and malnutrition in low-income population of northeast Brazilian population is also affected by lymphatic filariasis. The present study examined the effect of DEC on hepatocytes undernourished and alcoholized mice for possible similarities with human cases. The mice were divided into nine groups (n = 8): control group (C, and DEC25 DEC50), malnourished group (CD, DD25 and DD50) and alcoholic groups (CEtOH, and EtOH25 EtOH50). After the induction of models of malnutrition and alcoholism, the animals of each group were treated with DEC at concentrations of 25 and 50mg/kg for 12 days. Were analyzed for biochemical assays and liver fragments were processed for light microscopy and transmission electron microscopy. The enzymatic dosage of AST showed significant differences between the alcoholic groups and the levels of alkaline phosphatase and albumin were significantly correlated only among the malnourished group. In histological analysis of the undernourished control group (CD), we observed a marked presence of hepatic steatosis. After treatment with DEC, DD25 and DD50 groups had reduced steatosis. In the groups treated with alcohol and DEC also there was very evident reduction of damage caused by chronic ingestion of ethanol. Ultratestrutural analysis confirmed the reduction of lipid droplets in malnourished animals treated with DEC, the same way, ethyl groups showed a reduction of damages and their organelles were found well preserved. Immunohistochemical analyses revealed an evident expression of inflammatory markers IL-6, eNOS, CCR2, VCAM and ICAM in the alcoholic group, but the group that received DEC presented no evident expression these markers. Thus, DEC becomes a potential hepatoprotective drug for the treatment of chronic inflammation induced by alcoholism and malnutrition.

Keywords: Diethylcarbamazine, alcoholism, malnutrition, anti-inflammatory, protector effects.

1. INTRODUÇÃO

A filariose bancroftiana é uma das mais singulares e menos esclarecidas doenças parasitárias existentes (BUCK, 1991), cujo agente etiológico, *Wuchereria bancrofti*, mantém uma relação com o organismo humano e que continua desafiando a comunidade científica (DREYER & MEDEIROS, 1990).

Embora a dietilcarbamazina (DEC) seja conhecida como agente anti-filarial, o seu mecanismo de ação permanece controverso. A administração da DEC é realizada através de uma posologia padrão de 6mg/kg/dia durante um período de 12 dias (WHO, 1992). O fármaco é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, atingindo um pico no sangue entre 1 a 2 horas após a ingestão oral, não se concentrando em nenhum órgão específico, sendo metabolizado no fígado e sua excreção é basicamente renal (OTTESEN, 1985; DREYER; NORÕES, 1997).

A dietilcarbamazina, apesar de bem tolerada pode produzir reações adversas como, sonolência, náusea, febre, cefaléia, artralgia, linfangite, linfadenite, orquite, epididimite, dentre outras. Essas reações podem ser devido a dois fatores: à toxicidade química da droga, que está relacionada à quantidade de dose ingerida, ou à reação decorrente da morte do parasita, microfilária ou forma adulta (OTTESEN, 1985; DREYER & NORÕES, 1997). A rápida absorção de DEC no trato gastrointestinal e sua alta concentração no plasma sanguíneo contribuem para o aparecimento das reações adversas (DREYER & NORÕES, 1997).

A DEC possui outro papel terapêutico como uma droga anti-inflamatória para condições asmáticas (SALAZAR-MALLÉM, 1971; SRINIVAS e ANTANI, 1971; THIRUVENGADAM *et al.*, 1974). De acordo com o trabalho de Florêncio, Saraiva e Peixoto (2005), após 12 dias de tratamento com DEC os pneumócitos do tipo II de camundongos apresentaram um grande número de vesículas maduras levando a uma ativação do metabolismo de surfactante pulmonar com uma posterior ativação de macrófagos alveolares, que poderiam ser explicadas por uma maior atividade endocítica dessas células, as quais são responsáveis pela fagocitose do surfactante secretado pelos pneumócitos do tipo II. O aumento da síntese e secreção de surfactante promoveria uma diminuição da tensão superficial dos alvéolos, reduzindo os esforços musculares decorrentes dos movimentos respiratórios. Tais resultados poderiam explicar o alívio dos sintomas da asma após o tratamento com DEC como previamente observado por Liu e colaboradores (1996 ; 1997).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que exista cerca de 2 bilhões de pessoas que consomem bebidas alcoólicas em todo o mundo, e mais de 76 milhões com diagnóstico de distúrbios psicológicos devido ao uso excessivo de álcool. Dentre estes valores, aproximadamente 1,8 milhões de pessoas estão sujeitas ao óbito (WHO, 2004).

A distribuição do etanol ocorre de forma razoavelmente uniforme por todos os tecidos do organismo, afetando grande parte das funções vitais devido às suas características hidrofílicas e lipofílicas, e também por ser uma molécula relativamente pequena do ponto de vista molecular (LIEBER, 1992).

Estudos verificaram que o consumo crônico de álcool ativa a resposta inflamatória hepática (TILG *et al.*, 2000), os monócitos do sangue periférico e algumas subpopulações de linfócitos T citotóxicos (LASO *et al.*, 1997; SONG, *et al.*, 2001; JERRELLS *et al.*, 2002) e células NK (LASO *et al.*, 1997). Por sua vez, a ativação do sistema imunológico pode determinar alterações na produção de certas citocinas, e que desempenham um papel fundamental em determinadas respostas imunes e inflamatórias, angiogênese e do crescimento e diferenciação celular.

A etiologia da desnutrição é multifatorial, pois ela está relacionada à situação de pobreza, condições sanitárias precárias e a baixo padrão sócio-econômico e educacional, o que agrava a situação, uma vez que doenças, infecções ou distúrbios dos processos metabólicos podem levar a alteração na absorção de proteínas, provocando um atraso no crescimento corporal e cerebral (MORGANE *et al.*, 1993).

A deterioração fisiológica está em consonância com seu grau de desnutrição, (GÜLER, *et al.*, 1992) e o fígado, órgão central do metabolismo, torna-se quase sempre afetado. Foi observado que a deficiência protéica afeta os sistemas, de modo que, concomitante ao progresso da doença, sobrevém a deterioração das funções hepáticas, com aumento de aminotransferases no soro (GÜLER, *et al.*, 1994).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a ação da DEC em células hepáticas de camundongos desnutridos ou alcoolizados através de análises morfológicas, bioquímicas e imunohistoquímicas.

2. JUSTIFICATIVA

A Dietilcarbamazina é o filaricida mais amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana, desde 1947 (HEWITT *et al.*, 1947). Atualmente, têm-se realizado alguns estudos sobre o mecanismo de ação deste fármaco, que apesar dos seus 50 anos de uso, teve o seu potencial farmacológico tão pouco explorado.

Alguns trabalhos realizados em vertebrados mostram que esta droga apresenta vários efeitos bioquímicos diretos em diferentes sistemas enzimáticos, incluindo glicólise, metabolismo do folato e atividade da acetilcolinesterase (SUBRAHMANYAM, 1987). A DEC também apresenta propriedades anti-inflamatórias, como um resultado de sua interferência no metabolismo do ácido araquidônico, que inclui as enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase (COX) (MAIZELS & DENHAM, 1992). A via COX apresenta similaridade com a via do óxido nítrico, e ambas possuem isoformas constitutivas e induzíveis de suas enzimas e controlam as respostas inflamatórias (SANO *et al.*, 1992; CLANCY & ABRAMSON, 1995).

O alcoolismo crônico está associado a numerosos processos patológicos e inflamatórios que acometem diferentes órgãos, principalmente fígado, pâncreas, coração e cérebro (PALENCIA *et al.*, 1994; BAUTISTA, 1997; TSUKAMOTO *et al.*, 2002). O interesse de investigação científica, seja para o estudo do seu efeito sobre o organismo humano ou dos distúrbios funcionais a ele associados, justifica-se de um lado pela multiplicidade de ações tóxicas sobre órgãos e tecidos desencadeando mecanismos lesionais associados a diferentes patologias que afetam a saúde do indivíduo, e de outro pela repercussão social e econômica que o seu uso abusivo acarreta (KOREN & NULMAN, 1994).

Adeptos da utilização de modelos animais, Palencia e colaboradores (1994) destacaram a importância dos trabalhos efetuados em países subdesenvolvidos nos quais o alcoolismo é superposto a um substrato metabólico de desnutrição crônica. Na concepção desses autores, esses distúrbios não têm uma relação de causa e efeito, sendo sim um somatório de duas entidades diferentes, porém comuns em populações de baixa renda.

Outros trabalhos demonstram a alta incidência de alcoolismo e da desnutrição na população de baixa renda do Nordeste, população esta também afetada pela filariose linfática (GALDURÓZ & CAETANO, 2004; BATISTA FILHO & RISSIN, 2003). Alterações metabólicas e morfológicas em diversos órgãos, resultantes dessas situações já são bastante conhecidas pela comunidade científica e pela população em geral. Como estas situações estão presentes e são significativas nessa população específica, o estudo de suas repercussões no

funcionamento hepático acrescido ao efeito da DEC é de grande importância, diante da grande utilização deste filacidida, principalmente no Nordeste brasileiro.

Sendo assim, faz-se necessário esclarecer se existem alterações metabólicas e histopatológicas importantes em diversos tipos celulares do indivíduo sob tratamento, que pode se apresentar desnutrido ou exposto ao álcool. O presente trabalho verificou a ação da DEC através de análises morfológicas (morfométricas e ultraestruturais), imunohistoquímicas e bioquímicas sobre hepatócitos de camundongos machos da linhagem C57BL/6J, desnutridos ou alcoolizados para possíveis analogias com casos humanos.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar o efeito do tratamento com DEC sobre hepatócitos de camundongos da linhagem C57BL/6J normais, desnutridos e alcoolizados.

Objetivos Específicos

Nos grupos supracitados :

- Caracterizar as possíveis alterações histopatológicas a nível subcelular pela microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão através do tratamento *in vivo* de DEC nas concentrações de 25mg/kg e 50mg/kg.
- Caracterizar através da imuno-histoquímica a expressão das principais citocinas inflamatórias na resposta ao tratamento com a DEC;
- Examinar por meio de provas bioquímicas o funcionamento hepático.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 DIETILCARBAMAZINA

Dietilcarbamazina (DEC) é o filaricida mais amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana, e que induz um rápido desaparecimento das microfilárias da circulação sangüínea (FREEDMAN *et al*, 2001). A DEC é um derivado da piperazina sintetizada como 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina e preparada na forma de cloridrato, citrato ou fosfato (figura 1). A partir de 1950, foi distribuída como sal citratado por inúmeras companhias farmacêuticas sob diferentes nomes. É um pó branco, muito solúvel em água, estável, mesmo em condições de umidade e temperatura muito elevadas, e resiste, inclusive, à autoclavagem. A denominação dietilcarbamazina genericamente se refere à sua forma citratada, uma vez que é mais comumente utilizada (DREYER; NORÕES, 1997).

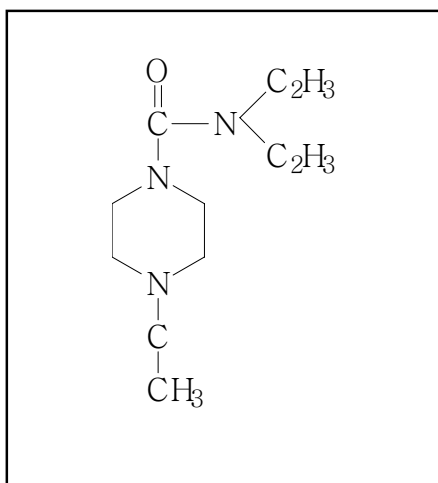


Figura 1 – Representação estrutural da dietilcarbamazina (Ottesen, 1985).

Para o tratamento da filariose linfática, a Organização Mundial de Saúde (OMS), preconiza a administração via oral do Citrato de Dietilcarbamazina, utilizando uma posologia padrão de 6mg/kg/dia durante um período de 12 dias (WHO, 1992) e no caso de eosinofilia pulmonar tropical (EPT), ele deve ser prolongado por até 30 dias (DREYER *et al.*, 1996).

Uma vez ingerida, a DEC se distribui rapidamente e de maneira quase uniforme em todos os compartimentos do organismo – inclusive no líquido hidrocélico e, presumivelmente,

em outros líquidos do corpo (OTTESEN, 1984). Há referência de que o tecido gorduroso constitui uma exceção, parecendo haver uma pequena tendência à acumulação, quando a droga é administrada em doses repetidas (HAWKING *et al*, 1950).

Outro fator atribuído ao surgimento de reações adversas após o tratamento é a liberação em massa de toxinas de uma bactéria endossimbiótica, a *Wolbachia* sp, presente no corpo da microfilária e do verme adulto, após a destruição dos parasitos pela droga (BANDI, *et al*, 2001; TAYLOR, 2002). Com a morte das microfilárias e/ou do verme adulto naturalmente ou devido a drogas antifilárias, a liberação dessa bactéria ativa o sistema imune do hospedeiro, sendo observado níveis séricos elevados de interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ) em indivíduos microfilarêmicos (BANDI *et al.*, 2001; TAYLOR, 2002). Estes dados sugerem que a bactéria levaria à ativação de uma resposta imune específica em indivíduos com filariose linfática e induziria reações inflamatórias que, dependendo da quantidade de parasitas poderiam ser leves, moderadas ou graves (BANDI *et al*, 2001; TAYLOR, 2002).

Para a OMS, as medidas de controle da filariose linfática consistem na administração em massa anual do fármaco, útil para suprimir a transmissão, para o controle da morbidade e no controle do vetor (WHO, 2006b). Segundo Dreyer e Coelho (1997), o uso do DEC e da Ivermectina em tratamentos individuais ou coletivos pode interromper a transmissão da filariose em áreas endêmicas. Com o objetivo de interromper a transmissão da *W. bancrofti*, iniciou-se no ano de 2000, em Leogane no Haiti, a administração anual em massa da DEC e de Albendazol. Após cinco anos, verificou-se uma diminuição significativa na microfilaremia e antigenemia dos indivíduos (GRADY *et al.*, 2007). O tratamento em massa realizado na população pode ser sob os seguintes esquemas: 6 mg/kg de citrato de dietilcarbamazina (DEC) + 400 mg albendazol; ou 150 μ g/kg ivermectina + 400 mg albendazol (em casos de co-endemicidade com oncocercárias) (WHO, 2009).

4.1.1 Mecanismo de ação da DEC

Maizels e Denhan (1992) apresentaram uma hipótese para explicar o mecanismo microfilaricida *in vivo* da DEC. A interpretação mais consistente para o mecanismo da DEC, é a de que ela altera o metabolismo do ácido araquidônico na microfilária e nas células endoteliais do hospedeiro. Essas modificações levariam a uma vasoconstricção amplificando a adesão endotelial, propiciando a imobilização do parasito circulante, aumentando a aderência e a atividade citotóxica das plaquetas e granulócitos do hospedeiro. Esses eventos poderiam representar a ativação do sistema imune inato não específico, independentemente da resposta imune adaptativa antígeno-específico.

Além disso, estudos ultraestruturais sobre a ação da DEC em microfilárias de *Wuchereria bancrofti in vitro* revelaram importantes alterações morfológicas nestes parasitos. Uma das primeiras alterações observadas com o tratamento de 5, 10 e 50 µg/ml de DEC, foi a perda da bainha microfilarial, seguida pela formação de inúmeros vacúolos na hipoderme e destruição do citoplasma de células somáticas. Algumas microfilárias apresentaram drástica desorganização celular com várias organelas degeneradas e condensação nuclear. Corpos lamelares também foram detectados indicando um possível processo de envenenamento celular. Tais resultados revelaram que a DEC exerce um efeito microfilaricida direto sobre microfilárias de *W. bancrofti* (FLORENCIO; PEIXOTO, 2003). De forma similar, após 40 minutos do tratamento de um indivíduo microfilarêmico, a DEC também exerceu um mecanismo de ação direto sobre as microfilárias de *W. bancrofti*, incluindo degeneração de organelas e apoptose (PEIXOTO *et al.*, 2004).

4.1.2 O efeito da DEC sobre células de vertebrados

Muitos trabalhos sobre o mecanismo de ação da DEC em larvas e vermes adultos filariais já se encontram na literatura, no entanto, poucos autores têm se detido sobre seus efeitos em células de vertebrados. Alguns estudos sugerem que a ação da DEC pode ser mediada pelas plaquetas, as quais parecem induzir uma reação inflamatória através da liberação de histamina (OTTESEN, 1985). Esta droga também apresenta diversos efeitos bioquímicos em uma série de sistemas enzimáticos, como por exemplo, a glicólise, metabolismo do folato e na atividade da acetilcolinesterase (SUBRAHMANYAM, 1987).

Estudos realizados por Fujimaki *et al.* (1988) revelam que a DEC inibe o crescimento da linhagem de células de rim de macaco (LLC-MK₂) *in vitro*, além de modificar a morfologia dessas células, tornando-as arredondadas, indicando uma possível alteração da função dos microtúbulos. Outros estudos confirmaram que a DEC promove a inibição da formação dos microtúbulos e, também induz a desorganização dos microtúbulos pré-formados (FUJIMAKI *et al.*, 1990).

Trabalhos posteriores revelaram também que o tratamento com DEC a 5 mM/mL por dez dias produz efeitos dramáticos em cultura de neurônios, induzindo uma completa desorganização do complexo de Golgi, e a formação de grandes vacúolos no citoplasma. Este estudo mostrou que o grupo tratado com a DEC apresentou aumento no tamanho das cisternas de Golgi e também aumento no número de vesículas vazias, sugerindo um dano severo de várias atividades sintéticas e secretoras do complexo de Golgi (BIRD, 2000).

Saraiva e colaboradores (2006), observaram o efeito da DEC sobre a espermatogênese de camundongos e revelaram que após o tratamento com 200mg/kg de DEC, as Células de Leydig se encontravam hipertrofiadas com círculos concêntricos gigantes de REL e numerosas gotículas lipídicas (GL) espalhadas ao longo do citoplasma. Algumas destas células não apresentavam núcleo e estavam repletas de gotículas lipídicas, sugerindo uma inibição da esteroidogênese e ausência de drenagem de colesterol livre, permitindo assim que este seja re-esterificado e armazenado em gotícula lipídica.

De acordo com Queto et al (2010), estudos realizados em colaboração com o nosso laboratório, mostraram que a DEC tem importante ação no bloqueio da inflamação eosinofílica pulmonar em camundongos sensibilizados com ovalbumina. A DEC bloqueia a hiperreatividade pulmonar, a produção de citocinas Th1/Th2 e o acúmulo de eosinófilos, bem como a eosinofiloiose *in vivo* e *in vitro* através de mecanismos da via óxido nítrico sintase induzível (iNOS/CD95).

4.2 FUNÇÃO E ESTRUTURA HEPÁTICA

O fígado pode exercer até 100 funções diferentes, a maioria das quais é exercida pelos hepatócitos. A principal função do fígado envolve as rotas metabólicas, anabólicas e catabólicas (GUYTON, 2006; GARTER; HIAT, 2007). Este órgão desempenha papel fundamental na homeostase corporal, envolvendo múltiplos processos como a regulação do metabolismo protéico e energético (MCCULLOUGH, 2000).

O hepatócito (figura 2) é a célula multifuncional do fígado apresentando um núcleo central e arredondado com um ou dois nucléolos bem evidentes (GUYTON, 2006). O espaço que fica entre as placas de células são os chamados sinusóides, ou seja, capilares hepáticos de parede revestida por dois tipos celulares: células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e macrófagos que, neste órgão são chamados de células de Kupffer. As células de Kupffer possuem núcleo oval, grande e nucléolo evidente. Apresentam intensa atividade fagocitária, pertencendo ao Sistema Mononuclear Fagocitário. O estreito espaço de Disse contém células estreladas armazenadoras de vitamina A em forma de gotículas lipídicas (CORMACK, 2003 ; GARTNER ; HIAT, 2007 ; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

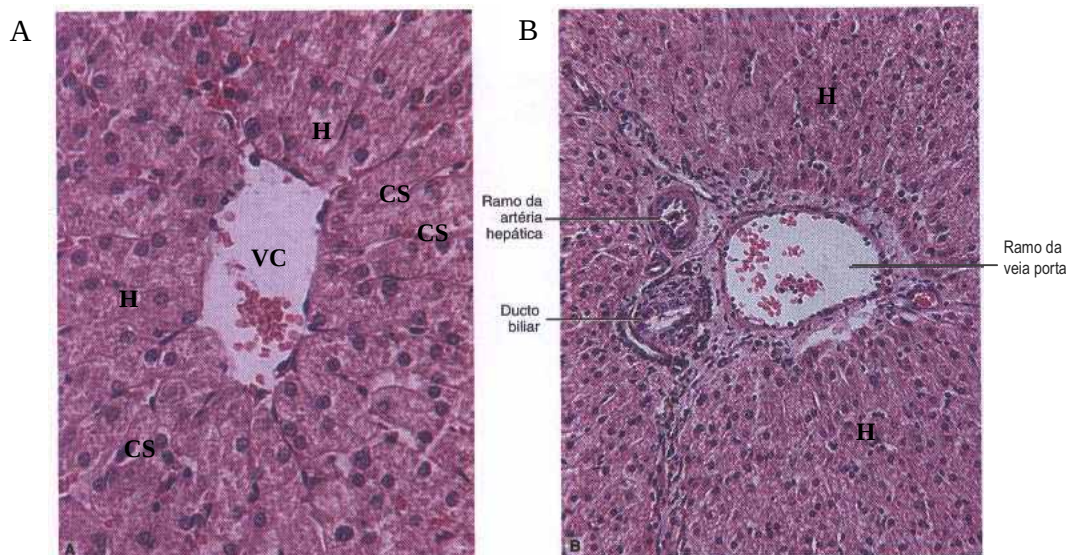


Figura 2: Histologia da estrutura hepática. A- Hepatócitos (H), veia cava central (VC), capilares sinusóides (CS). B- Espaço porta contendo ramo da artéria hepática, ramo da veia porta e ducto biliar. Coloração com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Na microscopia eletrônica (figura 3), a organela mais evidente do hepatócito é o retículo endoplasmático (RE). No retículo endoplasmático rugoso (RER) é onde ocorre a

síntese de várias proteínas como albumina, protrombina e fibrinogênio. Outro componente importante é o glicogênio, de quantidade bastante variável e que funciona como um depósito mobilizado pela célula quando ocorre hipoglicemia (TANIKAWA, 1971).

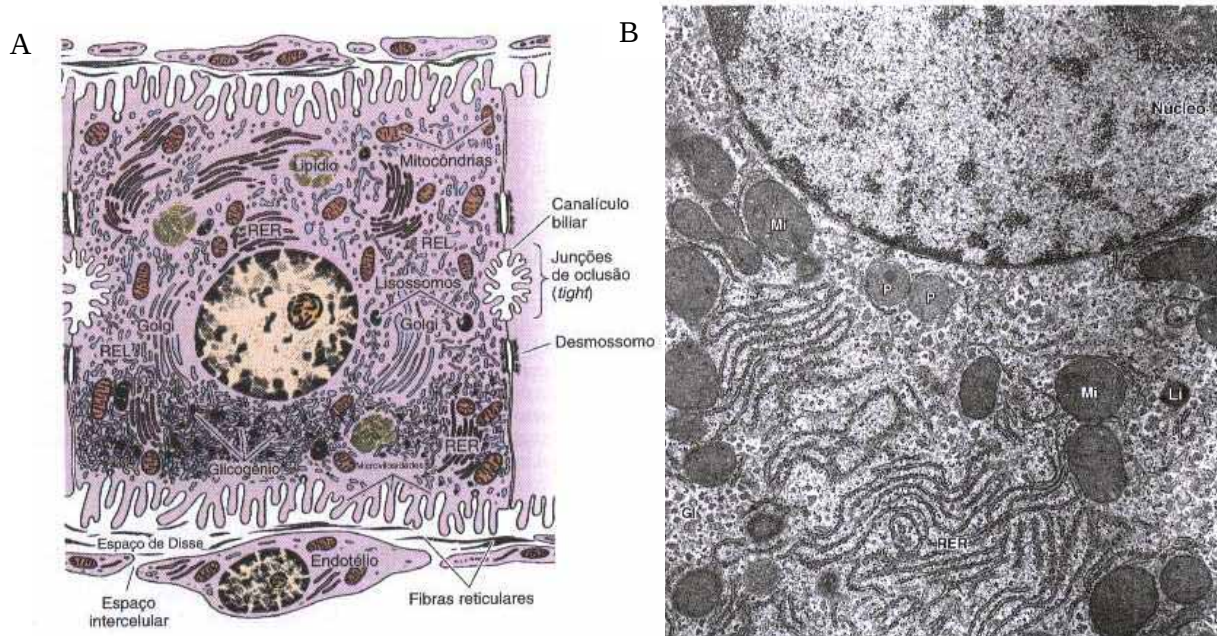


Figura 3: Estrutura geral dos componentes do hepatócito. A- Desenho ilustrando a ultraestrutura de um hepatócito. B- Fotomicrografia de hepatócito que possui numerosas organelas, tais como: núcleo, retículo endoplasmático rugoso (RER) e liso (REL), mitocôndrias (Mi), peroxissomos (P), lisossomos (Li) e partículas de glicogênio (Gl) (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

4.2.1 Fármacos e função hepática

As principais reações metabólicas que se processam nos organismos animal e humano são em grande parte realizadas no fígado.

Quando um dado xenobiótico é absorvido pelo organismo, sofre alterações estruturais que permitem uma rápida excreção. Para que isso seja possível o organismo dispõe de um equipamento complexo de enzimas e co-factores bem como de fontes energéticas que, atuando conjuntamente, têm como principal finalidade a desativação ou, pelo menos, a diminuição da sua toxicidade, embora, em alguns casos, se obtenha o efeito oposto (CARVALHO *et al.*, 1993), além disso ocorre o aumento da hidrofilia e subsequentemente a sua eliminação.

As drogas são uma causa muito comum de doença hepática (STEVENSON; LOWE, 2002). Como principal órgão metabolizador e desintoxicador do corpo, o fígado está sujeito à lesão por uma série de substâncias químicas farmacêuticas e ambientais. Toxinas (álcool, infecções virais e parasitárias), perturbações de vascularidade ou de excreção biliar e tumores são as principais causas de doença hepática (ROBBINS *et al.*, 2005). Os indivíduos que ingerem substâncias hepatotóxicas, tal como o álcool, apresentam um número aumentado de depósitos lipídicos nos hepatócitos (MINCIS, 2002)

Muitos medicamentos podem induzir hepatotoxicidade clínica e/ou biológica, havendo necessidade de cuidadosa supervisão. A definição de toxicidade hepática é baseada em parâmetros bioquímicos - elevação das aminotransferases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); gama glutamil transferase (GGT) e da enzima fosfatase alcalina (FA) ou em anormalidades clínicas (hepatite, icterícia) (LEWIS, 2000).

Testes da função hepática fornecem uma boa idéia da provável causa da hepatopatia. Alguns padrões de anormalidade sugerem algum tipo de doença, mas nenhum é específico (STEVENSON; LOWE, 2002).

Os níveis de albumina no sangue refletem as propriedades de síntese do fígado. Em decorrência da vida média, baixos níveis refletem doença hepática de longa duração, particularmente desnutrição e cirrose (STEVENSON; LOWE, 2002).

4.3 ÁLCOOL – ASPECTOS GERAIS

No Brasil, um estudo epidemiológico realizado em 2001 pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas), entre os 8.589 entrevistados, escolhidos aleatoriamente e representativos de 107 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes, observou-se que o uso de álcool, nas diferentes Regiões, variou de 53% na Região Norte a 71,5% na Região Sudeste. Esse mesmo estudo mostrou que a taxa de dependentes de álcool variou de 9,2% na Região Sudeste a 16,9% na Região Nordeste (CARLINI *et al.*, 2002). Os problemas decorrentes do uso abusivo de álcool comprometem profundamente as funções biológicas, psicológicas e sociais dos indivíduos afetados.

Após a ingestão de etanol, sua absorção ocorre principalmente no intestino delgado, por difusão passiva (MINCIS, 2002) e, em menores quantidades, no estômago e no cólon. A eliminação do etanol ocorre através da urina, pulmões e suor em pequenas quantidades (HOLFORD, 1987).

O fígado é o órgão mais susceptível aos efeitos tóxicos exercidos pelo consumo em excesso de bebidas alcoólicas. Ele é responsável por aproximadamente 90% da oxidação do etanol (LIEBER, 1980).

No metabolismo hepático do etanol, atuam duas rotas enzimáticas acessórias e uma principal que são encontradas em diferentes compartimentos celulares. A rota principal para a biotransformação do etanol no fígado ocorre através da atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), encontrada no citoplasma das células hepáticas, a qual produz acetaldeído, posteriormente transformado até acetato, pela ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). As outras duas rotas são compostas pelo sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS – composto pela isoenzima CYP2E1 da família do citocromo P450), encontrado no retículo endoplasmático, e pela ação da catalase, localizada nos peroxissomos (ARTEEL *et al.*, 2003). Uma visão geral do metabolismo do etanol está representada na Figura 4.

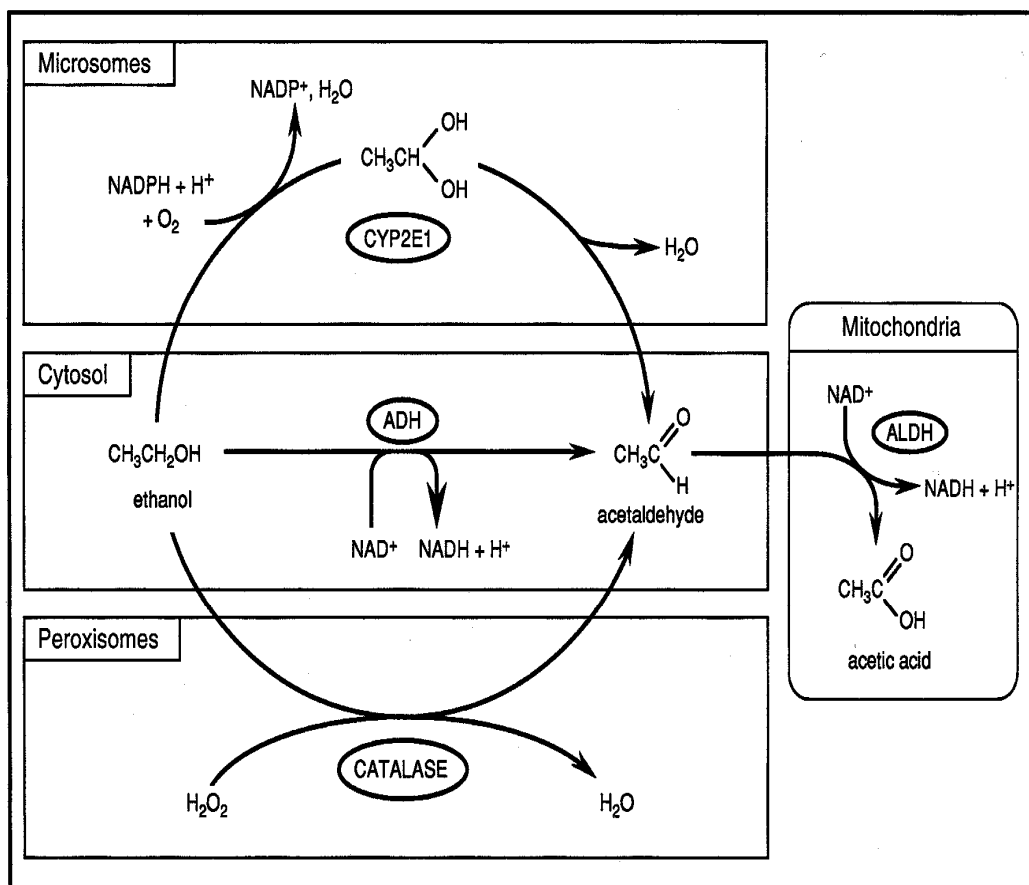


Figura 4: Metabolismo do etanol demonstrando a participação do CYP 4502E1 nos microsossomas hepáticos, a ação da ADH (álcool desidrogenase) citoplasmática e da catalase nos peroxossomas. Todas as reações formam o acetaldeído que será oxidado na mitocôndria pela ALDH (aldeído desidrogenase) (Robbins *et al.*, 2005).

4.3.1 Metabolismo do etanol – desequilíbrio celular

A oxidação do etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase e do CYP2E1 é dependente de dois cofatores o NAD^+ e o NADP^+ , respectivamente. Esta dependência acaba gerando um excesso de equivalentes reduzidos no citoplasma das células (ALBANO *et al.*, 1988; DUPONT *et al.*, 1988) e deste modo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox, gerando várias alterações metabólicas como, por exemplo:

- a) a concentração de lactato eleva-se em relação à concentração de piruvato, originando assim um quadro de hipoglicemia, que podem evoluir para acidose láctica e reduzir a capacidade do rim em excretar ácido úrico;
- b) parte dos equivalentes reduzidos pode passar para a mitocôndria através de processos como o ciclo do alfa-glicerfosfato, ciclo do ácido málico e do ciclo dos ácidos graxos;
- c) acúmulo de triglicerídeos no fígado e diminuição do consumo de ácidos graxos (GALLY *et al.*, 1999), devido à preferência do hepatócito pelo álcool, reduzindo assim a atividade do ciclo do ácido cítrico e aumentando o depósito hepático de gordura, originando a esteatose que representa a primeira fase de lesão hepática alcoólica (BERTELLI e CONCI, 1997).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de doenças hepáticas ocasionadas pelo excesso de ingestão de bebidas alcoólicas. O tempo de consumo e o teor alcoólico da bebida são dados relevantes a se considerar para o diagnóstico. Provavelmente o etanol é como um “potencial de hepatotoxinas” no desenvolvimento de doenças hepáticas devido à coexistência de fatores externos (ARTEEL *et al.*, 2003). Entre estes está o sexo (BECKER *et al.*, 1996), o polimorfismo de enzimas que metabolizam o etanol, fatores imunológicos, exposição a outras substâncias/drogas, infecções hepáticas virais, deficiência nutricional e obesidade.

A seguir, (Figura 5), demonstra-se um esquema que evidencia os múltiplos fatores envolvidos na resposta celular ao consumo abusivo de etanol, bem como as modificações celulares em resposta a esta substância.

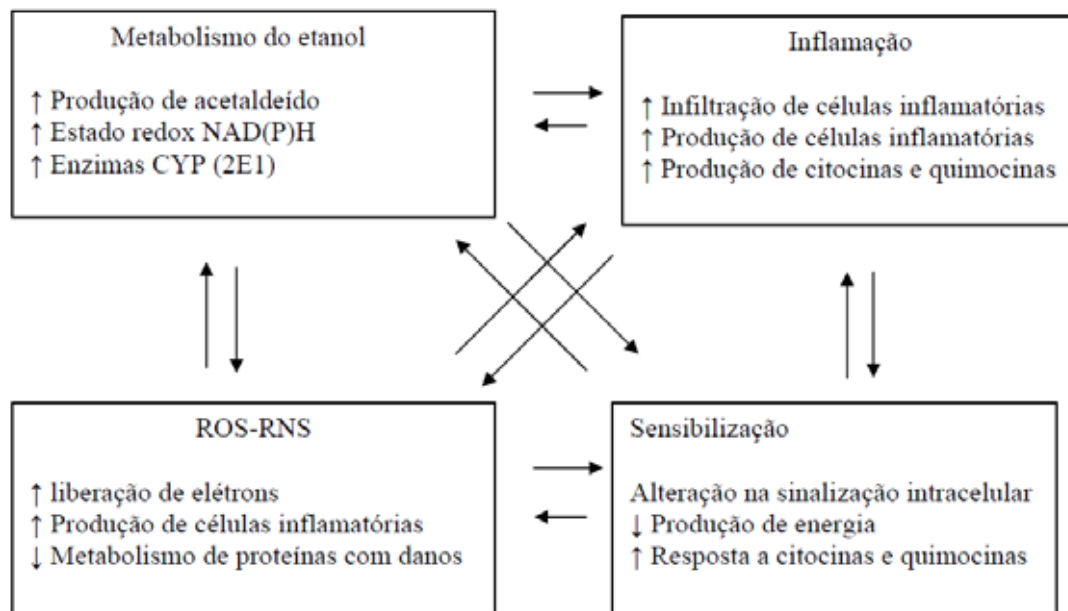


Figura 5: Mecanismos pelos quais o consumo excessivo de etanol pode levar aos danos no fígado. Esquema representando um ciclo contínuo de danos e progressão da doença. Adaptado de ARTEEL *et al.*, 2003.

O metabolismo do etanol produz o acetaldeído, aumentando o estado redox celular e induzindo a síntese de enzimas que metabolizam o etanol. Ocorre a inflamação juntamente com o aumento de células imunes e sinais pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas). A sensibilização das células hepáticas via alteração da sinalização intracelular, depleção das reservas de energia da célula e aumento na resposta a estímulos externos e aumento da resposta celular durante o tempo de ação do etanol. Formam-se espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) via liberação de elétrons do sistema enzimático (mitocôndria e CYP4502E1), produção de células inflamatórias e diminuição da degradação de proteínas. Estes eventos não são mutuamente exclusivos e tendem a aumentar o efeito de outras rotas (ARTEEL *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo tem sido sugerido como uma das principais causas de lesão tecidual. Segundo Lee e colaboradores (2001), o estresse oxidativo tem um papel fundamental na ativação da célula hepática estrelada, através da indução do NFκB.

A formação de radicais livres é um processo fisiológico que ocorre durante o metabolismo celular normal e as células dispõem de defesas para combater as ações nocivas do excesso destes radicais. Entretanto, algumas destas defesas são diretamente atingidas em casos de abuso de etanol (LIEBER, 1997).

Dentre esses radicais livres, estão às espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peróxidos lipídicos, e as espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito, que estão envolvidos nas manifestações clínicas das doenças hepáticas provocadas pelo abuso da ingestão do etanol (HALLIWEL, 1987; LIEBER, 1988; ASHAK *et al.*, 1999). Os radicais livres se tornam tão prejudiciais devido ao fato de serem muito instáveis e reativos. Estes reagem com biomoléculas como o DNA e o RNA, proteínas e lipídios, desestabilizando a fisiologia celular (ALEYNIK *et al.*, 1998; MEAGER *et al.*, 1999).

4.3.2 Alcoolismo e o Sistema imune

É um fato universalmente aceito que o alcoolismo crônico é acompanhado por várias alterações no sistema imunológico, o que induz várias conseqüências patológicas. Nesse sentido, é costume referir-se a defeitos na resposta imune humoral e celular específica (MCGREGOR, 1986; SZABO, 1999; NELSON *et al.*, 2002) e na resposta inespecífica (inata), distúrbios de estresse na depuração de antígenos por macrófagos alveolares e células de Kupffer (LIU, 1979) ou menor atividade citotóxica associados com as células *natural killer* (NK) (LASO *et al.*, 1997). Tudo isto significa o estabelecimento de um estado de imunodeficiência, com conseqüente aumento do risco de infecções graves (SZABO, 1999).

4.3.3. Lesão Hepatocelular

A associação do consumo de álcool com esteatose e necrose dos hepatócitos está bem estabelecida na literatura (TILG *et al.*, 2000). Foi observado que o alcoolismo é também acompanhado por outra forma de morte celular: apoptose (NEUMAN *et al.*, 2002). No desenvolvimento da lesão hepatocelular é considerada de grande importância a ação de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que já está envolvido nos estágios iniciais da doença hepática alcoólica (DHA).

O TNF- α é sintetizado principalmente por monócitos e macrófagos ativados. No fígado apenas as células de Kupffer são capazes de produzi-lo, embora não de forma constitutiva, mas com ativação prévia. O TNF- α pode condicionar tanto à morte (necrose e/ou apoptose) dos hepatócitos como sua proliferação. A iniciação do programa de apoptose

dependerá do equilíbrio estabelecido entre os sinais pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (LASO *et al.*, 2005) (Figura 6).

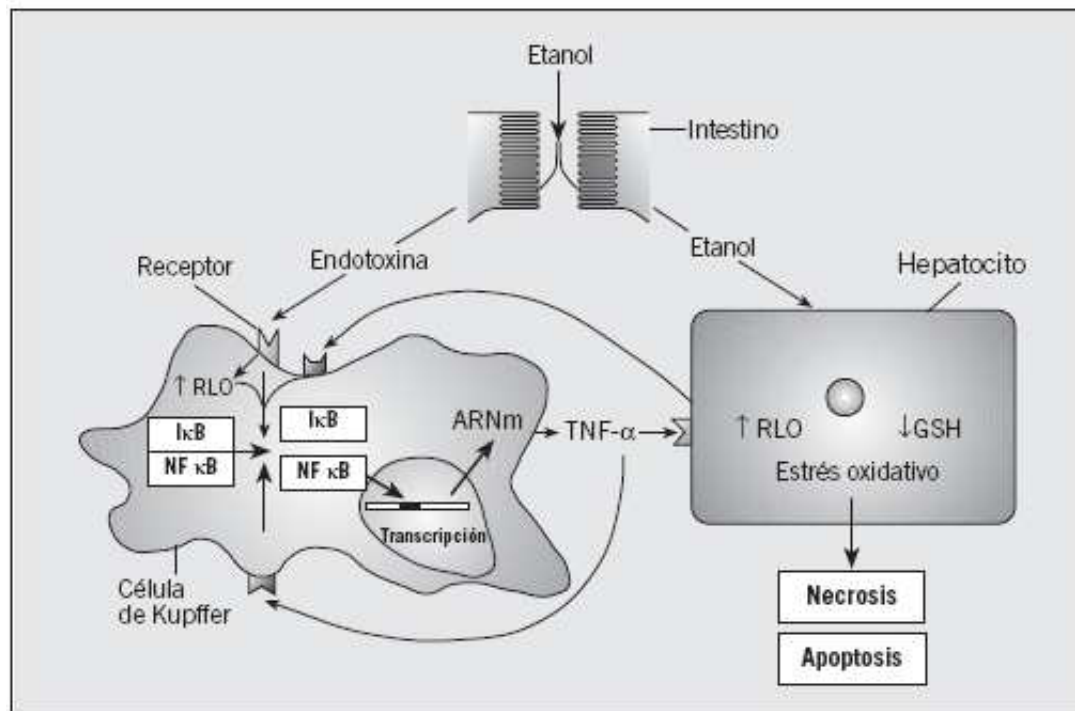


Figura 6: A ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no desenvolvimento da apoptose e necrose dos hepatócitos na doença hepática alcoólica. Inter-relações entre TNF- α e estresse oxidativo. GSH: glutatona; IκB: inibidor do fator nuclear kappa B, NFκB: fator nuclear kappa B; RLO: radicais livres de oxigênio (LASO *et al.*, 2005).

O TNF- α é um importante determinante da disfunção endotelial, que se manifesta pelo aumento da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais dos sinusóides hepáticos. Em conjunto, as quimiocinas exercem uma ação quimiotática e ativadora dos neutrófilos polinucleares e favorecem o recrutamento de leucócitos circulantes para o fígado (LASO *et al.*, 2005). Alguns pesquisadores ainda encontraram uma elevação de TNF- α e IL-8 em amostras de tecido hepático (NEUMAN *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo gerado pelo metabolismo do etanol no hepatócito não é apenas um fator promotor de necrose e apoptose, mas também radicais livres (RL) liberados neste processo ativam as células de Kupffer e NFκB, aumentando a síntese de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias (LANDS, 1995), e nesse sentido, a deficiência de antioxidantes S-adenosil-L-metionina (SAME) está associada com aumento da secreção de TNF- α (CHAWLA

et al. 1996; ROMAN *et al.* 1999). Por outro lado, a endotoxina promove a formação de RL nas células de Kupffer, o que contribui para aumentar ainda mais a produção de citocinas (LASO *et al.*, 2005).

Embora a inflamação do parênquima hepático seja a definição patológica de hepatite alcoólica, a presença de alterações inflamatórias no fígado pode ser visto claramente em qualquer momento da evolução da DHA. Isto porque, na grande maioria, envolve mecanismos semelhantes aos descritos na lesão hepatocelular. De fato, na hepatite alcoólica tem-se constatado um aumento dos níveis séricos de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (HILL *et al.*, 1992; NEUMAN *et al.*, 2002).

4.4 ASPECTOS GERAIS SOBRE DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é um dos problemas nutricionais mais preocupantes nos países em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Agricultura e Alimento (*Food and Agriculture Organization* - FAO), há 1,02 bilhões de pessoas desnutridas no mundo (FAO, 2009). A Figura 7 mostra o número da composição regional de pessoas subnutridas em 2009, estimada pela FAO. E a figura 8 ilustra a distribuição da prevalência de subnutrição na população mundial.

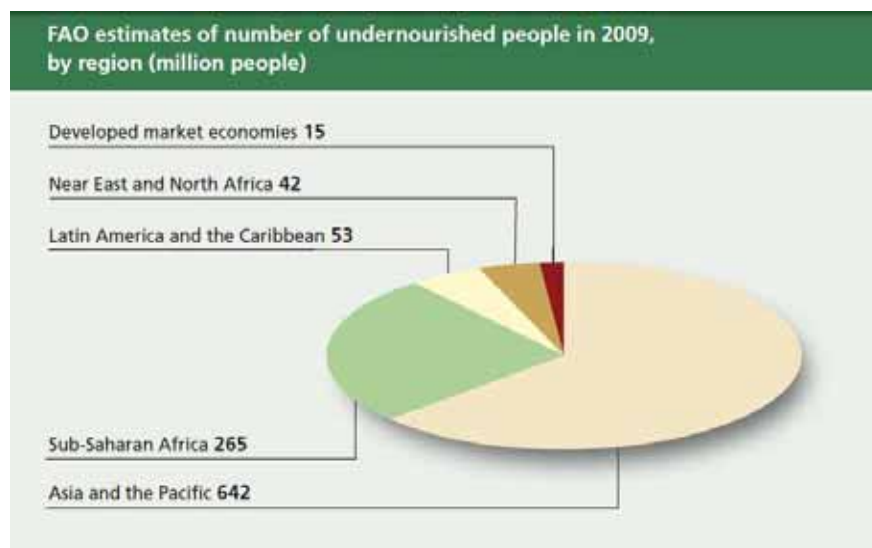


Figura 7: Estimativa do número de pessoas desnutridas por região (FAO, 2009).

A fome, que afeta uma em cada cinco pessoas nos países subdesenvolvidos, é um profundo impedimento ao avanço individual e social (EVANS, 2004).

No Brasil, a pobreza afeta mais de um quarto da população – em torno de 44 milhões de pessoas (FAO, 2003). Segundo a FAO, 16.7 milhões de pessoas estão subnutridas no Brasil atualmente. Em nove estados do Nordeste do país, quase metade de todas as famílias vive com aproximadamente um dólar americano por dia. Embora as porcentagens de crianças com desnutrição grave estejam diminuindo na maioria das regiões, a má nutrição atinge uma quantidade crescente de crianças de 0 a 5 anos de idade.

Desnutrição energético-protéica caracteriza-se por um menor aporte de nutrientes às células em relação às necessidades destas. Afeta fundamentalmente as faixas mais susceptíveis à desnutrição: infância, velhice, gravidez e lactação (ELIA, 2000).

A desnutrição protéico-energética não adaptada é perigosa não apenas porque a perda de proteína ininterrupta pode se tornar prejudicial à vida, por comprometer os músculos do coração e o sistema respiratório, mas também porque compromete o sistema nervoso e o imunológico. Limitando a defesa do indivíduo, ela o torna suscetível a um ciclo vicioso de infecções, diarreia, mais perda de nutrientes, infecções oportunistas e morte (RIELLA, 2001; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

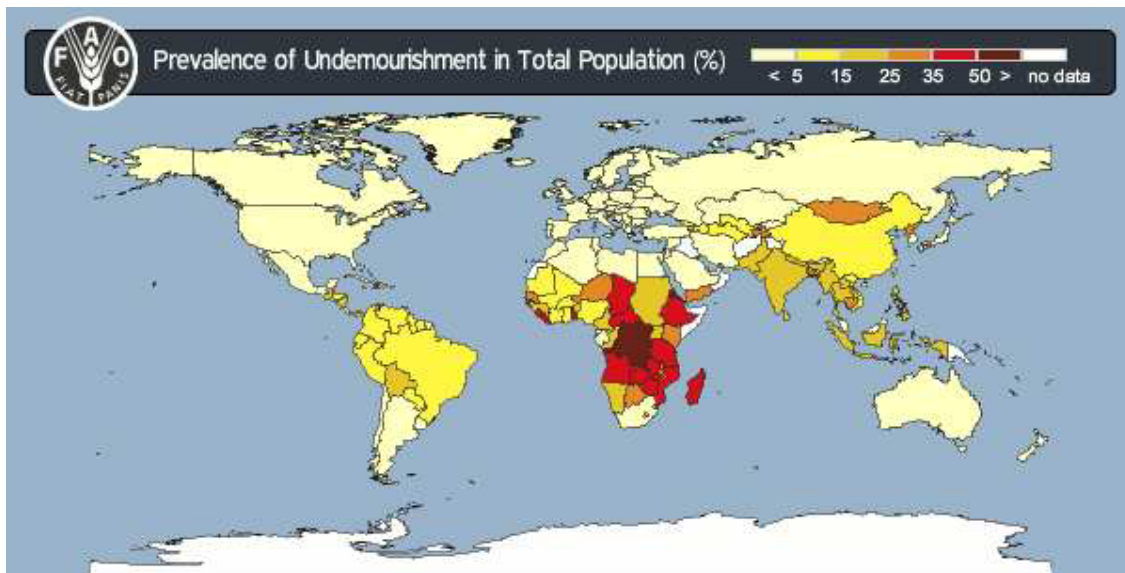


Figura 8: Prevalência de subnutrição na população mundial (FAO, 2009).

Quando existe um fornecimento energético adequado, mas com carência protéica, denomina-se kwashiorkor; se há um déficit global de proteínas e energia, trata-se de marasmo ou desnutrição energético-protéica (PEM- Protein-Energy Malnutrition), sendo esta a forma mais freqüente de desnutrição encontrada (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998).

A desnutrição protéico-energética pode manifestar-se de forma aguda ou crônica. A forma aguda, caracterizada por perdas agudas, resulta em composição corporal alterada enquanto na forma crônica predomina a atrofia, com redução linear no crescimento. Em bebês e crianças mais velhas, as formas agudas e crônicas podem ser diferenciadas através das proporções peso-altura e peso-idade, respectivamente. Categorias de doenças podem ser distinguidas dentro de cada tipo de PEM através de comparação com valores de referência (WOODWARD, 1998).

A desnutrição pode ser classificada em primária ou secundária. A desnutrição primária é aquela em que a falta de nutrientes necessários ao funcionamento normal do organismo decorre da ingestão deficiente de alimentos. Essa forma primária de desnutrição resulta de: 1)

causas sócio-econômicas (pobreza, analfabetismo, deficiência de produção de alimentos, monocultura, tabus alimentares, etc.); 2) doenças físicas ou psíquicas (anorexia nervosa, bulimia), que dificultam a ingestão de alimentos.

A desnutrição secundária representa uma anormalidade de utilização dos nutrientes ingeridos. Pode ser acarretada por: 1) digestão insuficiente de nutrientes causada por insuficiência hepática, pancreática, gástrica ou intestinal; 2) deficiência de absorção por alterações da mucosa gástrica ou intestinal; 3) utilização inadequada de alimentos como no diabetes e erros congênitos do metabolismo; 4) aumento do metabolismo com aumento da utilização dos nutrientes no hipertireoidismo; 5) aumento da excreção de nutrientes como por exemplo a proteína nas lesões renais; 6) e destruição da microbiota intestinal por antibióticos (BRASILEIRO-FILHO; 2006).

Experiências em animais submetidos à restrição alimentar, demonstraram alterações permanentes na capacidade de aprender. Crianças, desnutridas durante a vida intrauterina, apresentam desempenho baixo nos testes de inteligência e menor capacidade de aprendizado, sendo mais acentuado quanto mais precoce for a desnutrição. Isto parece ser devido à interferência no desenvolvimento orgânico adequado do indivíduo, afetando o número de células cerebrais que são formadas durante a vida fetal (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

Com a persistência das condições adversas nos seus variados graus, vão se instalando mecanismos fisiopatológicos, determinando adaptações metabólicas de diferentes intensidades, desencadeadas e mantidas por controles hormonais (CARRAZZA, 1991; WOODWARD, 1998).

Com uma restrição energética prolongada, para sobreviver, o organismo lança mão de: glicogenólise, gliconeogênese e lipólise. A musculatura esquelética, maior compartimento corporal de proteínas, e o tecido adiposo, principal reserva energética, são consumidos por conta da manutenção da homeostase (MARCONDES, 1976; CARRAZZA, 1991).

O déficit nutricional protéico incluem a remoção de aminoácidos essenciais dos tecidos para que o fígado possa manter a homeostase, sendo que a quantidade de albumina sintetizada pelo fígado de ratos desnutridos é significativamente menor do que a dos alimentados com dieta normal (KIRDCH *et al.*, 1968; TOVAR *et al.*, 1998). Na presença de subnutrição, as proteínas intestinais e hepáticas são as que mais sofrem.

De maneira resumida, os principais sistemas bioquímicos envolvidos na manutenção da homeostase protéica e aminoacídica no organismo, são: 1) a captação e transporte de aminoácidos; 2) oxidação e catabolismo dos aminoácidos; 3) síntese protéica e 4) degradação protéica. Aparentemente, a primeira resposta do organismo a uma menor ingestão protéica

e/ou de aminoácidos essenciais é uma redução acentuada da massa protéica corpórea que mesmo em processos carenciais agudos é acompanhada de redução da taxa de oxidação de aminoácidos. De forma simultânea e, progressivamente em maior intensidade, também ocorre um declínio na taxa de síntese protéica corpórea. Além de menor síntese, que ocorre no fígado, este órgão também diminui sua taxa de liberação para periferia de proteína sintetizada, como por exemplo, a albumina (DUTRA DE OLIVEIRA e MARCHINI, 1984; YOUNG e MARCHINI, 1990).

Estudos em ratos submetidos às dietas com restrição calórica mostraram que o organismo lança mão indiscriminadamente do catabolismo das proteínas miofibrilares musculares, mantendo níveis séricos normais de aminoácidos necessários para funções vitais (ALMEIDA et al., 2002).

Joshi e colaboradores (2003) observaram que o peso do fígado de ratos desnutridos era menor do que o encontrado no grupo controle, no entanto, o depósito de lipídeos no fígado de animais alimentados com dieta de restrição protéica foi maior do que observado em animais do grupo controle. Esses dados sugerem que existem alterações na composição do fígado desses ratos. Esta observação assume importância visto que em humanos, a restrição protéica resulta em “fígado gorduroso”, como descrito em crianças com desnutrição tipo kwashiorkor.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. F. M.; MARZOCHI, M. C.; SABROZA, P. C.; BRAGA, M. C.; PADILHA, T.; SILVA, M. C. M.; SILVA, M. R. F.; SCHINDLER, H. C.; MACIEL, M. A.; SOUZA, W.; & FURTADO, A. F.; Bancroftian filariasis in two urban areas of Recife, Brazil: pre-control observations on infection and disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 89: 373-377, 1995.
- ALEYNIK, S.I.; LEO, M.A.; ALEYNIK, M.K.; LIEBER, C.S. Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. **Alcohol, Clinical and Experimental research**, 22: 192-196, 1998.
- ALMEIDA, S. S.; DUNTAS, L. H.; DYE, L.; NUNES, M. L.; PRASAD, C.; ROCHA, J. B.; WAINWRIGHT, P.; ZAIA, C. T.; GUEDES, R. C. Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. **Nutr Neurosci**, 5: 311-320, 2002.
- ARTEEL, G.; MARSANO, L.; MENDES, C.; BENTLEY, F.; MCCLAIN, C. Advances in Alcoholic Liver Disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 17(4): 625-647, 2003.
- ASHAK, K.G.; ZIMMERMAN, H.J. Alcoholic liver disease: pathologic, pathogenic and clinical aspects. **Alcohol, Clinical and Experimental Research**, 15: 45-66, 1999.
- BABU, B.V., NAYAK, N.A. Treatment costs and work time loss due to episodic adenolymphangitis in lymphatic filariasis patients in rural communities of Orissa, India. **Tropical Medicine and International Health**, 8:1102-1109, 2003.
- BANDI, C; TREES, A.J; BRATTING, N.W., *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of fiarial diseases. **Veterinary Parasitology**, 98: 215-238, 2001.
- BATISTA FILHO, M. & RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Caderno de Saúde Pública**, 19:S181-S191, 2003.

BECKER, U.; DEIS, A.; SORENSEN, T.I. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. **Hepatology**, 23: 1025-1029, 1996.

BERTELLI, M.S.; CONCI, F.M. **Álcool e Fígado**. 1 Ed, Caxias do Sul: EDUCS, P. 219, 1997.

BIRD, M.M. The effects of diethylcarbamazine on the morphology and ultrastucture of foetal mouse cerebellar neurons in culture. **Journal of Electron Microscopy**, 49:669-674, 2000.

BONFIM, C.; LESSA, F.; OLIVEIRA, C.; EVANGELISTA, MJ.; ESPÍRITO SANTO, M.; MEIRELES, E.; PEREIRA, C.J.; MEDEIROS, Z. Situação da filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife: estudo em uma área endêmica no Município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 19:1497-1505, 2003.

BRAGA, M.C., **Filariose Bancroftiana: contribuições ao aprimoramento das ações de vigilância e controle em áreas urbanas**. 128f. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador 2002.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Patologia** in: Bogliolo. 7 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1472 p, 2006.

BUCK, A.A. Filarial Infections. In: STRICKLAND, G. T. **Hunter's Tropical Medicine**. 7. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 711-749, 1991.

CARLINI, E. A. et al. **I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil – 2001**. São Paulo: CEBRID – Unifesp, 2002.

CARVALHO, F. D. ; BASTOS, M. L. ; FERREIRA, M. A. Hepatotxicidade do paracetamol. **Arquivos do Instituto Nacional de Saúde**, 19: 15-25, 1993.

CARRAZZA, F.R. & MARCONDES, E. **Nutrição clínica em pediatria**. São Paulo: Savier, 320p, 1991.

CHAWLA, R.K. ; EASTIN, C.E. ; WATSON, W.H. ; LEE, E.Y.; BAGBY, G.J. ; MCCLAIN, C.J. S-adenosylmethionine deficiency and tumor necrosis factor alfa in endotoxin- induced hepatic injury. En: Mato JM, Caballero A, editors. Methionine metabolism: molecular mechanism and clinical implication. **Madrid: CSIC**, p. 263-270,1996.

CLANCY, R.M, ABRAMSON, S.B: Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proc Soc Exp Biol Med**, **210**:93-10, 1995.

CORMACK, D.H. **Fundamentos de Histologia**. 2 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 371, 2003.

DREYER, G; MEDEIROS, Z. Filariose linfática: ainda um desafio. **Ciência Hoje**, 12 : 6-7, 1990.

DREYER, G., NORÕES, J., ROCHA, A., ADDISS, D. Detection of living adult *Wuchereria bancrofti* in a patient with tropical pulmonary eosinophilia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 29:1005-1008, 1996.

DREYER, G., NORÕES, J. Dietilcarbamazina no tratamento da filariose bancroftiana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 30: 229- 240, 1997.

DREYER, G. ; COELHO, G. Filariose linfática : doença potencialmente eliminável. **Cad Saude Pública**, 13 : 537-543, 1997.

DUPONT, I.; LUCAS, D.; CLOT, P.; MÉNEZ, C.; ALBANO, E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. **Journal of Hepatology**, 28: 564-571, 1988.

DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. & MARCHINI, J.S. Clinical and subclinical nutritional deficiencies. **Int J Vitamin Nutr Res** **26**: 59-65, 1984.

ELIA M. Guidelines for the detection and management of malnutrition. **British Association for Parenteral and Enteral Nutrition**, p. 55, 2000.

EVANS, G.W. The environment of childhood poverty. **American Psychologist**, 59 (2): 77-92, 2004.

FLORENCIO, M.S.; PEIXOTO, C.A. The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Parasitology**, 126: 551-554 2003.

FLORENCIO, M.S.; SARAIVA, K.L.A.; PEIXOTO, C. The effects of diethylcarbamazine on ultrastructure of lung cells *in vivo*. **Tissue Cell**, 37:241-6, 2005.

FONTES, G. ; BRAUN, R.F. ; FRAIHA-NET, H. ; VIEIRA, J.B.F. ; PADILHA, S.S ; ROCHA, R.C. *et. al.* Filariose linfática em Belém, estado do Pará do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Rev Soc Bras Med**, 38 :131-136, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Brazil : the hunger of the missed meal. Rome, 2003. Interview with Andrew MacMillan. Disponível em : <<http://www.fao.org/english/newsroom/news/2003/13320-en.html>>. Acesso em : 25 janeiro 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of Food Insecurity in the World**. Rome, 2009. Disponível em : <<http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf>>. Acesso em : 25 janeiro 2010.

FRANCO, O.; LIMA, D.M.S. Alguns aspectos das atividades contra a filariose bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 19:73-89,1967.

FREEDMAN, O.D.; PLIER, A.D.; ALMEIDA B.A.; OLIVEIRA, AL.; MIRANDA, J.; BRAGA, C. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. **Tropical Medicine and International Health**, 6:37-41, 2001.

FUJIMAKI, Y.; SHIMADA,S.; KIMURA, E.; AOKI, Y. DEC-inhibited development of third-stage *Brugia pahangi* in vitro. **Parasitology Research**, 74:299-300, 1988.

FUJIMAKI, Y.; EHARA, M.; KIMURA, E.; SHIMADA, M. AOKY, Y. Diethylcarbamazine, antifilarial drug, inhibits microtubule polymerisation and disrupts preformed micotubules.

Biochemical Pharmacology, 39:851-856, 1990.

GALDURÓZ, J.C.F. & CAETANO, R. Epidemiologia do uso de álcool no Brasil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 26:3-6, 2004.

GALLY, A.; PRICE, D.; CRABB, D. High-level expression of rat class I alcohol dehydrogenase is sufficient for ethanol-induced fat accumulation in trnasduced HeLa cells.

Hepatology, 29: 1164-1170, 1999.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 3ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; p.576, 2007.

GRADY, C.A.; ROCHARS, M.B.; DIRENY, A.N.; ORELUS, J.N.; WENDT J.; RADDAY, J. *et al.* Endopoints for Lymphatic Filariasis Programms. **Emerg Infect Dis**, 13: 608-610, 2007.

GÜLER, A.H.; SAPAN, N.; SALANTUR, E. Effects of cortisol and growth hormone on the metabolism of liver and bone in children with malnutrition. **The Turk Journal of Pediatrics** 34: 21-24, 1992.

GÜLER, A.H.; SAPAN, N.; EDIZ, B.; GENÇ, Z.; OZKAN, K. Effect of copper on liver and bone metabolism in malnutrition. **The Turk Journal of Pediatrics** 36: 205-213, 1994.

GUYTON, A.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.1264, 2006.

HAWKING, F.; SEWELL, P.; THURSTON, J.P. The mode of action of hetrazan on filarial worms. **British Journal of Pharmacology** 5:217-238, 1950.

HEWITT, R.I. S.; KUSHNER, H.W.; STEWART, E.; WHITE, W.S.; WALLACE, Y. Experimental chemotherapy of filariasis III. Effect of 1-diethylcarbamazine-4-

methylnpiperazine hydrochloride against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 32:1341-1329, 1947.

HILL, D.B.; MARSANO, L.S.; MCCLAIN, C.J. Increased plasma interleukin-6 in alcoholic hepatitis. **J Clin Lab Med**, 119:547-552, 1992.

HOLFORD, N.H.G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. **Clinical Pharmacokinetics**, 13: 273-292, 1987.

JERRELLS, T.R. Role of activated CD8⁺ T cells in the initiation and continuation of hepatic damage. **Alcohol**, 27:47-52, 2002.

JOSHI, S.; GAROLE, V.; DAWARE, M. GIRIGOSAVI, S.; RAO, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in wistar rats. **Metabolism**, 52(1): 13-18, 2003.

JUNQUEIRA L.C. ; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.524, 2008.

KIRDCH, R.; FRITH, I.; BLACK, E.; HOFFENBERG, R. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. **Nature**, 217: 578-179, 1968.

KOREN, G.; NULMAN, I. Teratogenic drugs and chemicals in humans. In **Koren G. Ed. Maternal-Fetal Toxicology**. Marcel Dekker, New York, 33-48. 1994.

LANDS, W.E.M. Cellular signals in alcohol-induced liver injury: a review. **Alcohol Clin Exp Res**, 19:928-938, 1995.

LASO, F.J; MADRUGA, J.I.; GIRÓN, J.A.; LÓPEZ, A.; CIUDAD, J.; SAN MIGUEL, J.F.; et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not ethanol consumption. **Hepatology**, 25:1096-1100, 1997.

LASO, F.; PASTOR, I.; ORFAOC, A. Sistema inmune y enfermedad hepática por alcohol. **Med Clin (Barc)**, 125(7): 263-269, 2005.

LEE, K.S.; LEE, S.J.; PARK, H.J.; CHUNG, J.P.; HAN, K.H.; CHON, C.Y.; LEE, S.I.; MOON, Y.N. Oxidative Stress Effect on the Activation of Hepatic Stellate Cells. **Yonsei Med. J.**, 42: 1-8, 2001.

LEWIS, J.H. Drug-induced liver disease. **The medical clinics of North America**, 84: 1275-1311, 2000.

LIEBER, C.S. Metabolism and metabolic effects of alcohol. **Seminars in Hematology**, vol. 17, n. 2, 1980.

LIEBER, C.S. Biochemical and molecular basis of alcohol induced injury to liver and other tissues. **New England Journal of Medicine**, 319: 1639-1650, 1988.

LIEBER, C.S. Medical and nutritional complications of alcoholism: mechanisms and management. **New York: Plenum Press**, 579, 1992.

LIEBER, C.S. Ethanol Metabolism, Cirrhosis and Alcoholism. **Clinical Acta**, 257: 59-84, 1997.

LIU, Y.K. Phagocytic Capacity of Research in Alcoholics. **J. Reticulo Endothel Soc**, 25:605-13, 1979.

LIU, M.; WANG L.; LI E.; ENHORNING G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea pigs. **Clin Exp Allergy**, 26:270-275, 1996.

LIU, M.; WANG L.; LI E.; ENHORNING G. Dysfunction of guinea-pig pulmonary surfactant and type II pneumocytes after repetitive challenge with aerosolized ovalbumin. **Clin Exp Allergy**, 27:802-807, 1997.

MACIEL, M.A.V.; MARZOCHI, K.B.F.; SILVA, E.C.; ROCHA, A.; FURTADO, A.F. Estudo comparativo de áreas endêmicas de filariose bancroftiana na região metropolitana do Recife, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Suppl 10, 2: 301-309, 2002.

MAHAN, K.L.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause's food, nutrition & diet therapy**. 10 ed.W.B. Saunders, Philadelphia, 1194p, 2005.

MAIZELS, R. M.; DENHAM, D. A. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. **Parasitology**, 105: 849-860, 1992.

MARCONDES, E. **Desnutrição**. São Paulo; Sarvier, 1976.

MATTOS, D.; MOTA, S.; DREYER, G. Aspects of social realities of children and adolescents seen at reference service for bancroftian filariasis in Recife, state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 41, 29-35, 2008.

MCCULLOUGH, AJ. Malnutrition in liver disease. **Liver Transplant**. 6:85-96, 2000.

MCGREGOR, R.R. Alcohol and immune defense. **JAMA**, 256:1474-9, 1986;

MEAGER, E. A.; BARRY, O.P.; BURKE, A.; LUCEY, M.R.; LAWSON, J.A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G.A. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. **Journal of Clinical Medicine**, 133: 451-460, 1999.

MEDEIROS, Z.; GOMES, J.; BÉLIZ, F.; COUTINHO, A. DREYER, G. Screening of army soldiers for *Wuchereria bancrofti* infection in metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiologic surveillance. **Trop Med Int Health**, 4:499-505, 1999.

MINCIS, M. **Gastroenterologia e Hepatologia : diagnóstico e tratamento**. Lemos Editorial, 3ed., São Paulo: 1031p., 2002.

MIRANDA, J. ; MACIEL, A. ; SOUZA, R.M.C. ; FURTADO, A. F. ; MALAGUENO, E. Perfil protéico e reconhecimento antigênico de extratos de larvas infectantes (L3) de *Wuchereria bancrofti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(1):27-32, 2005.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, L. KEMPER, T.; GALLER, J.R.; Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, 17 (1): 91-128, 1993.

NELSON, S.; KOLLS, J.K. Alcohol, host defense and society. **Nat Rev Immunol**, 2:205-9, 2002.

NEUMAN, M.G.; BRENNER, D.A.; REHERMANN, B.; TAIEB, J.; CHOLLET-MARTIN, S.; COHARD, M.; et al. Mechanisms of alcoholic liver disease: cytokines. **Alcohol Clin Exp Res**, 25:251-253, 2001.

NEUMAN, M.G.; KATZ, G.G.; MALKIEWICZ, I.M.; MATHURIN, P.; TSUKAMOTO, H.; ADACHI, M.; et al. Alcohol liver injury and apoptosis. **Alcohol Clin Exp Res**. 28:117-28, 2002.

NORÕES, J.; DREYER, G.; SANTOS, A.; MENDES, V.G.; MEDEIROS, Z.; ADDISS, D. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 91: 78-81, 1997.

OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 403p., 1998.

OTTENSEN, E.A. Immunopathology of lymphatic filariasis in man. **Springer Semin Immunopathol**, 2:373-385, 1980.

OTTENSEN, E.A. The action of diethylcarbamazine on adult worms of the lymphatic - dwelling filariae *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, and *Brugia timori* in man. **Geneva**, World Health Organization, 1984.

OTTENSEN, E.A.,. Efficacy of diethylcarbamazine in eradicating infection with lymphatic-dwelling filarial in humans. **Reviews of Infections Diseases**, v. 7, p. 341-356, 1985.

OTTENSEN, E.A. Infection and disease in lymphatic filariasis: an immunological perspective. **Parasitology**, 104: 571-9, 1992.

PALENCIA, G.; TEIXEIRA, F.; ORTIZ, A.; PEREZ, R.; RIOS, C.; SOTELO, J. Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: A study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of large human groups. **J. Stud. Alcohol**, 55:113 - 120, 1994.

PEIXOTO, C.A. et al. The effects of diethylcarbamazine on the ultrastructure of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* *in vivo* e *in vitro*. **Parasitology Research**, 92 : 513-517, 2004.

QUETO, T. ; XAVIER, P. ; GARDEL, M. A. ; LUCA, B. ; BARRADAS, M. ; MASID, D. ; SILVA, P. M. ; PEIXOTO, C. A.; VASCONCELOS, Z. M. ; DIAS,E. P. ; GASPAR, M. I. Inducible Nitric Oxide Synthase/CD95L-dependent Suppression of Pulmonary and Bone Marrow Eosinophilia by Diethylcarbamazine. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 181: 429–437, 2010.

RIELLA, M.C. Insuficiência renal aguda. In: MAGNONI, D., CUKIER, C. **Perguntas e respostas em nutrição clínica**. São Paulo: Roca, 193-203, 2001.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 7ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1448p, 2005.

ROMAN, J.; COLELL, A.; BLASCO, C.; CABALLERÍA, J.; PARÉS, A.; RODÉS, J.; et al. Differential role of ethanol and acetaldehyde in the induction of oxidative stress in HEP G2 cells: effect on transcription factors AP-1 and NF-kappa B. **Hepatology**, 30:1473-480, 1999.

SALAZAR-MALLÉN, M. Treatment of intractable asthma with diethylcarbamazine citrate. **Annals of Allergy**,23: 534-537, 1971.

SANO H, HLA T, MAIER JAM, CROFFORD LJ, CASE JP, MACIAG T, WILDER RL: *In vivo* cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. **J Clin Invest**, 89:97-108, 1992.

SARAIVA, K.L.A.; JUNIOR-SILVA, V.A.; DIAS, E.S.F.; PEIXOTO, C.A. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reproductive Toxicology**, 22: 754-759, 2006.

SELKIRK, M. E. et al. Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites. **Parasitology**, 92, Suppl:15-38, 1986.

- SONG, K.; COLEMAN, R.A.; ALBER, C.; BALLAS, Z.K.; WALDSCHMIDT, T.J.; MORTARI, F.; et al. Th1 cytokine response of CD57+ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. **Alcohol**, 24:155-67, 2001.
- SRINIVAS, H.V.; ANTANI, J. Diethylcarbamazine in bronchial asthma. **Annals of Allergy**, 29: 418-421, 1971.
- STEVENS, A.; LOWE, J.S. **Patologia**, 2 ed., São Paulo: Editora Manole, p. 655, 2002.
- SUBRAHMANYAM, D. Antifilarials and their mode of action. Filariasis, **Ciba Symposium**, 127: 246—264, 1987.
- TANIKAWA, K. **Aspectos Ultraestructurales del Hígado y de las Enfermedades Hepáticas**. 2 ed, Barcelona: Cientifico- Medica, 4-201, 1971.
- TAYLOR, M., A New Insight into the Patogénesis of Filarial Disease. **Currente Molecular Medicine**, 2: 299-302, 2002.
- TERPSTRA, A. H. M. Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. **Journal of Nutrition**, 131: 2067-2068, 2001.
- TILG, H.; DIEHL, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med**, 343:1467-76, 2000.
- THIRUVENGADAM, K.V. et al. Diethylcarbamazine citrate in bronchial asthma. *Journal of the Indian Medical Association*, 63: 278-281, 1974.
- TOVAR, A.R.; SANTOS, A.; HALHALI, A.; BOURGES, H.; TORRES, N. Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats. **J.Nutr**, 128: 1631-1635, 1998.

YOUNG, V.R. & MARCHINI, J.S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic response to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. **Am J Clin Nutr**, 51: 270-289, 1990.

WARTMAN, W.B. Lesions of the lymphatic system in early filariasis. **Am J. Trop Med Hyg**, 24: 299-313, 1944.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Expert Committee on Filariasis, 5th, Geneva, 1992. Lymphatic filariasis: the disease and its control: **report. Geneva**, (WHO - Technical Reports Series, 821), 1992.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease. Report of a consultative meeting held at the Universiti Sains Malaysia (Penang Malaysia); 1994.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Lymphatic filariasis endemic countries and territories - Mapping status, 2006a. Disponível em:
<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_MappingProgress.png>
Acessado em: 20 de setembro de 2009.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Global Programme to eliminate lymphatic filariasis: Progress report on mass drug administration in 2005. **Weekly Epidemiological Record**; 22: 221-232; 2006b.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Weekly Epidemiological Record**; 82:361-80; 2007.

WHO (World Health Organization). The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. **Weekly Epidemiological Record**; 84: 437–444, 2009.

WOODWARD, B. Protein, calories, and immune defenses. **Nutr. Rev.**, 56:84-92, 1998.

CAPÍTULO I

**EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC) SOBRE HEPATÓCITOS DE
CAMUNDONGOS C57BL/6J SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA.**

Artigo a ser submetido à revista : **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**

EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA (DEC) SOBRE HEPATÓCITOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6J SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA.

EFFECTS OF DIETHYLCARBAMAZINE (DEC) ON HEPATOCYTES OF C57BL/6J MICE SUBMITTED PROTEIN MALNUTRITION

¹Sura Wanessa Santos Rocha, ²Ana Célia Oliveira dos Santos, ¹Bruna dos Santos Silva, ¹Dilênia Cipriano Torres de Oliveira, ¹Edlene Lima Ribeiro, ¹Karla Patricia Sousa Barbosa, ¹Fabiana Gomes de Oliveira, ^{1,3*}Christina Alves Peixoto.

¹Laboratório de Ultraestrutura, Depto. Entomologia – Centro de pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil, ²Laboratório de Bioquímica, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, Brazil. ³Laboratório Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste - MCT, Pernambuco, Brazil.

*Endereço para Correspondência: Christina Alves Peixoto, Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil. Fax: 55-81-21012500, Fone: 55-81-21012551. E-mail: peixoto.christina@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz em Recife, Brasil (CPqAM / FIOCRUZ).

RESUMO

A Dietilcarbamazina é o filaricida amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana, entretanto, seu potencial farmacológico ainda encontra-se pouco explorado. A desnutrição protéica apresenta alta incidência em várias populações de países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, e algumas destas afetadas pela filariose linfática. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito da DEC em hepatócitos de camundongos desnutridos. Os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais: grupo controle (C, DEC25 e DEC50) e grupo desnutrido (DC, DD25 e DD50). Após a indução da desnutrição, os animais foram submetidos ao tratamento com DEC nas concentrações de 25 e 50mg/kg por 12 dias. Foram realizadas análises bioquímicas e fragmentos hepáticos foram processados para microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão. Em relação as dosagens bioquímicas, foi observado uma redução significativa dos níveis séricos de albumina do grupo DC em relação ao controle, sendo esta uma característica de desnutrição. Entretanto, houve um retorno aos níveis basais nos grupos DD25 e DD50. Os grupos DC, DD25 e DD50 apresentaram aumento significativo dos níveis de fosfatase alcalina em relação ao controle (C). Nas análises histológicas do grupo controle desnutrido (CD), observou-se a presença marcante de esteatose hepática. Após o tratamento com a DEC, os grupos DD25 e DD50 apresentaram redução da esteatose. A análise ultraestrutural confirmou a redução dessas gotículas lipídicas nos animais desnutridos tratados com DEC, bem como a

preservação de suas organelas. Dessa forma, a DEC torna-se um fármaco de potencial hepatoprotetor para o tratamento das lesões ocasionadas pela desnutrição.

Palavras-chaves: Dietilcarbamazina, desnutrição, efeito protetor.

INTRODUÇÃO

Dietilcarbamazina (DEC) é o filaricida mais amplamente utilizado no tratamento da filariose bancroftiana, e que induz um rápido desaparecimento das microfilárias da circulação sangüínea (1). A DEC é um derivado da piperazina sintetizada como 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina e preparada na forma de cloridrato, citrato ou fosfato (2).

Maizels e Denhan (3) apresentaram uma hipótese para explicar o mecanismo microfilaricida *in vivo* da DEC. A interpretação mais consistente para o mecanismo da DEC, é a de que ela altera o metabolismo do ácido araquidônico na microfilária e nas células endoteliais do hospedeiro. Essas modificações levariam a uma vasoconstricção amplificando a adesão endotelial, propiciando a imobilização do parasito circulante, aumentando a aderência e a atividade citotóxica das plaquetas e granulócitos do hospedeiro. Esses eventos poderiam representar a ativação do sistema imune inato não específico, independentemente da resposta imune adaptativa antígeno-específico.

A DEC possui papel terapêutico como uma droga anti-inflamatória para condições asmáticas (4, 5, 6). De acordo com o trabalho de Florêncio, Saraiva e Peixoto (7), após 12 dias de tratamento com DEC os pneumócitos do tipo II apresentaram um grande número de vesículas maduras levando a uma ativação do metabolismo de surfactante pulmonar com uma posterior ativação de macrófagos alveolares, que poderiam ser explicadas por uma maior atividade endocítica dessas células, as quais são responsáveis pela fagocitose do surfactante

secretado pelos pneumócitos do tipo II. O aumento da síntese e secreção de surfactante promoveria uma diminuição da tensão superficial dos alvéolos, reduzindo os esforços musculares decorrentes dos movimentos respiratórios. Tais resultados poderiam explicar o alívio dos sintomas da asma após o tratamento com DEC como previamente observado por Liu *et al.* (8).

De acordo com Queto *et al.* (9), a DEC tem importante ação no bloqueio da inflamação eosinofílica pulmonar em camundongos sensibilizados com ovalbumina. A DEC bloqueia a hiperreatividade pulmonar, a geração de citocinas envolvidas na produção, ativação e migração de eosinófilos e a eosinofilopoiese *in vivo* e *in vitro* através de mecanismos da óxido nítrico sintase induzível via iNOS/CD95.

A desnutrição é um dos problemas nutricionais mais preocupantes nos países em desenvolvimento. Segundo dados da Food and Agriculture Organization (FAO), há 1,02 bilhões de pessoas desnutridas no mundo (10). A fome, que afeta uma em cada cinco pessoas nos países subdesenvolvidos, é um profundo impedimento ao avanço individual e social (11).

As reações ao déficit nutricional protéico incluem a remoção de aminoácidos essenciais dos tecidos para que o fígado possa manter a homeostase, sendo que a quantidade de albumina sintetizada pelo fígado de ratos desnutridos é significativamente menor do que a dos alimentados com dieta normal (12, 13).

Alterações metabólicas e morfológicas em diversos órgãos, resultantes dessas situações já são bastante conhecidas pela comunidade científica e pela população em geral. Como estas situações estão presentes e são significativas, o estudo de suas repercussões no funcionamento hepático acrescido ao efeito da DEC é de grande importância, diante da grande utilização deste filaricida.

Sendo assim, faz-se necessário esclarecer se existem alterações metabólicas e histopatológicas importantes em diversos tipos celulares do indivíduo sob tratamento, que

pode se apresentar desnutrido. O presente trabalho verificou a ação da DEC através de análises morfológicas (histológicas e ultraestruturais) e bioquímicas sobre hepatócitos de camundongos desnutridos para possíveis analogias com casos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 48 camundongos machos da linhagem C57BL/6J de 30 dias de idade, pesando entre 15-16 gramas, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL (FIOCRUZ - Rio de Janeiro) e mantidos no Biotério Central do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-FIOCRUZ). Os camundongos foram aclimatados a 22°C, iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes estabelecendo um fotoperíodo de doze horas claro e doze horas escuro e alimentados com dieta purificada fornecida pela Empresa Pragsoluções®, São Paulo. Os animais foram pesados diariamente.

Soluções de DEC

As soluções foram compostas por água destilada e o pó de DEC (Farmanguinhos, BR) nas seguintes concentrações: 25 mg/kg e 50 mg/kg, sendo padronizadas diariamente de acordo com o peso dos animais.

Para análise dos efeitos do tratamento com DEC foram realizadas administrações diárias da solução de DEC por gavagem (cânula estomacal), em volume total de 200µl, por 12 dias. Os animais dos grupos controle também receberam 200µl de água destilada pela mesma via de administração (14).

As doses de tratamento foram ajustadas com base nos clássicos estudos metabólicos, o que indica que a taxa metabólica total de um camundongo de 30g é aproximadamente sete

vezes a taxa metabólica total de um humano de 70 kg (15). Assim, no presente estudo, a dose máxima de DEC (50mg/kg) utilizada foi cerca de sete vezes a dose terapêutica de filariose linfática recomendada pela OMS, que é de 6 mg / kg por 12 dias.

Dietas e modelo de desnutrição

Os animais foram submetidos a dois tratamentos nutricionais com dieta padrão com ingredientes purificados (Pragsoluções®, São Paulo) contendo 20% de proteína e uma dieta de restrição protéica para indução da desnutrição contendo 4% de proteína caseína (16), sua composição está mostrada na tabela 1. Após aproximadamente 30 dias de administração da dieta de restrição, quando os animais do grupo desnutrido alcançaram aproximadamente 20% de perda de peso, em relação ao grupo controle (C) (16), foram administradas as soluções de DEC.

Desenho Experimental

Os grupos experimentais e controle foram compostos por 08 animais cada, alocados em gaiolas de acrílico recebendo água e dieta *ad libitum*.

O estudo foi dividido em duas etapas experimentais que estão divididos em:

Experimento 1 – Tratamento com Solução de DEC 25mg/kg e 50mg/kg

Os grupos foram compostos por animais com 60 dias de vida.

Grupo 1 (C): Administração de água destilada.

Grupo 2 (D25): Administração de solução de DEC 25mg/kg.

Grupo 3 (D50): Administração de solução de DEC 50mg/kg.

Experimento 2 - Dieta e Tratamento com DEC

Os grupos experimentais e controle foram compostos por animais que iniciaram o tratamento com a dieta de restrição com 30 dias de idade e o tratamento com a DEC aos 60 dias de idade.

Grupo 4 (DC): Administração de água destilada e dieta de restrição.

Grupo 5 (DD25): Administração de solução de DEC 25mg/kg e dieta de restrição.

Grupo 6 (DD50): Administração de solução de DEC 50mg/kg e dieta de restrição.

Microscopia Óptica

Os fragmentos hepáticos foram fixados em solução de formalina a 10%. Após 24 horas de imersão, o tecido foi submetido à desidratação em soluções de concentração crescente de etanol, dois banhos de tolueno e incluído em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram desparafinados em tolueno e re-hidratados em soluções de concentração decrescente de etanol. Terminado o processamento, as lâminas de cada fragmento hepático foram coradas pela técnica de Hematoxilina – Eosina (H.E.) e foram montadas com Entellan, em seguida foram analisadas ao microscópio de luz (Axiocam 2.0 - Carl Zeiss) com o auxílio de um patologista.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS e fixados por duas horas numa solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2. Lavados três vezes em tampão cacodilato 0,1M e pós-fixados, durante uma hora, numa solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 5mM CaCl₂ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2. Novamente, foram lavados no mesmo tampão, contrastados em bloco com acetato de uranila a 2% e desidratados em série crescente de acetona. Para finalizar o processamento as amostras serão infiltradas e emblocadas em resina Epon 812

(Sigma Company, St Louis, MO). O material foi cortado em ultramicrotomo e as grades forma coradas com citrato de chumbo e acetato de uranila 5% em água.

Análises Bioquímicas

Foram colhidas amostras de sangue venoso e após a formação do coágulo, foram centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos. Desta forma, o soro foi separado e utilizado para análise da função hepática através da dosagem das enzimas AST, ALT e Fosfatase Alcalina, das Bilirrubinas Total, Direta e Indireta, do Colesterol, dos Triglicerídeos e da Albumina pelo método espectrofotométrico no aparelho Hitachi 912 – Roche.

Considerações Éticas

O presente trabalho tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), cujo Protocolo P. 0169-03.

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para as comparações estatísticas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para medidas paramétricas, associada aos testes de Dunnett e o teste Tukey utilizado como teste a posteriori. Valores de probabilidade menor que 0,05 foram considerados significantes. O programa utilizado foi GraphPad Prism versão 5.

RESULTADOS

Peso corpóreo

Os animais mantidos com ração hipoprotéica apresentaram significativa redução do peso corpóreo (CD) ($18,46 \pm 0,2099^*$) quando comparado com o animais do grupo controle (C) ($24,03 \pm 0,7583$). Os animais desnutridos tratados com DEC DD25 ($18,47 \pm 0,8049^*$) e DD50 ($19,03 \pm 0,7158^*$) também apresentaram diminuição significativa do peso corporal (Tabela 2).

Alterações Metabólicas

Os níveis de fosfatase alcalina dos grupos desnutridos CD ($198,5 \pm 39,69$), DD25 ($174,8 \pm 38,29$) e DD50 ($165,5 \pm 40,43$), foram estatisticamente significativos, comparado com o grupo controle C ($104,2 \pm 5,786$) (Figura 1). No entanto, os grupos tratados com DEC D25 ($128,5 \pm 15,10$) e D50 ($126,5 \pm 18,27$) apresentaram níveis séricos de fosfatase alcalina estatisticamente menores em relação ao grupo CD ($198,5 \pm 39,69$). Os níveis séricos de ALT e bilirrubina não apresentaram valores significantivos entre os grupos acima citados.

Em relação aos níveis de albumina sérica, apenas o grupo controle desnutrido CD ($2,520 \pm 0,4147$) apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo controle C ($3,267 \pm 0,4274$) (Figura 2). Os grupos DD25 e DD50 apresentaram níveis semelhantes ao grupo controle (C)

Alterações Histológicas

A análise histológica dos fragmentos hepáticos do grupo controle (C) mostrou tecido bem preservado, de aspecto padrão. Nenhuma alteração histológica foi observada nos hepatócitos dos animais deste grupo (Figura 3 A). Após o tratamento por 12 dias com DEC (D25 e D50), foi possível observar a presença de alguns focos de degeneração hidrópica no parênquima hepático, os vasos sanguíneos apresentaram padrão típico (Figura 3 B-C).

Nos cortes histológicos dos grupos de camundongos desnutridos (CD, DD25, DD50), a alteração histológica mais marcante foi a presença de várias gotículas lipídicas dispersas no citoplasma dos hepatócitos, caracterizando um processo de esteatose hepática (Figura 3 D, E, F). Além da esteatose, a degeneração hidrópica foi observada entre os grupos CD, DD25 e DD50 (Figura 3 D, E, F).

Alterações Ultraestruturais

A análise ultraestrutural dos hepatócitos do grupo controle apresentou padrão morfológico característico com retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias (Figura 4 A). Os hepatócitos do grupo tratado por 12 dias com 25mg/kg e 50mg/kg de DEC (D25 e D50) apresentaram uma proliferação das membranas do retículo endoplasmático rugoso, no entanto suas características apresentam-se semelhantes ao grupo controle (Figura 4 B e C).

Em relação aos desnutridos, o grupo controle (CD) mostrou grandes gotículas lipídicas, sendo a esteatose um processo compatível com a desnutrição. Poucos retículos endoplasmáticos e peroxissomos foram visualizados e evidente degradação citoplasmática focal (Figura 4 D). Os animais desnutridos tratados com 25mg/kg e 50mg/kg DEC (DD25 e DD50), mostraram semelhanças com o grupo controle desnutrido (CD), com poucas inclusões lipídicas dispersas no citoplasma, e redução dos danos ocasionados pela desnutrição protéica (Figura 4 E e F).

DISCUSSÃO

Modificações na dieta e no estado nutricional podem influenciar alterações metabólicas, neurológicas, e induzir a resposta inflamatória devido à maior predisposição a

agentes infecciosos (17, 18, 19). Neste estudo avaliamos as alterações bioquímicas, histopatológicas e ultraestruturais em células hepáticas de camundongos desnutridos e submetidos ao tratamento com DEC.

Os animais alimentados com ração hipoprotéica consumiram menor quantidade de proteínas, em relação aos controles, proporcionando uma redução significativa do peso corporal. A restrição protéica utilizada neste estudo causou uma redução de mais de 20% de perda de peso, em relação aos grupos controles, estando em consonância com dados da literatura e indicando a adequação do modelo proposto (16, 17).

Em relação aos níveis séricos de fosfatase alcalina (FA), Metwalli et al (20) observaram alguns aspectos sobre a FA do fígado de camundongos submetidos à desnutrição protéico-energética e verificaram aumento da síntese protéica desta enzima nesses animais desnutridos. Outro trabalho mostrou que elevações da FA são anormalidades comuns em testes bioquímicos de caninos desnutridos (21). De forma semelhante, Osborne et al. (22) administrando dietas com restrição de proteínas a camundongos, observou aumento da FA. Com base nestes dados, a deficiência de proteína deve ser considerada como causa leve ou moderada de dano hepatobiliar. Corroborando com esses estudos, nossos resultados evidenciaram o aumento significativo da fosfatase alcalina nos animais dos grupos denutridos CD, DD25 e DD50 em relação ao grupo controle (C). No entanto, deve ser ressaltado que a exposição à DEC não alterou significativamente os níveis séricos de FA entre os grupos desnutridos.

A hipoalbuminemia está relacionada à falta de aminoácidos para a síntese de albumina ou a uma menor capacidade de síntese desta proteína. Foi observado que apenas o grupo controle desnutrido apresentou diminuição significativa da albumina em relação ao grupo C. Indicando que neste tipo de desnutrição pode haver um decréscimo da transcrição do gene da albumina expresso pelo fígado (23, 24). No entanto, animais desnutridos e tratados com DEC

(DD25 e DD50), não apresentaram diminuição significativa da albumina sérica em relação ao grupo controle.

A análise histológica do grupo controle desnutrido (CD) apresentou como resultado um acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, caracterizando um processo de esteatose. Joshi e colaboradores (26) observaram que o depósito de lipídeos no fígado de animais alimentados com dieta de restrição protéica foi maior do que observado em animais do grupo controle. Isso ocorre, devido a uma redução da síntese de lipoproteínas responsáveis pelo transporte de triglicerídeos e colesterol endógeno e a retirada destes do tecido hepático (27). Dessa forma, o principal indício causador de esteatose hepática nos animais estudados foi possivelmente à diminuição de proteínas carreadoras e consequente acúmulo de triglicérides e colesterol nos hepatócitos. Porém, as análises dos grupos DD25 e DD50, apresentaram redução do acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos quando comparados com o grupo desnutrido (CD). Estes resultados estão de acordo com Gonzales et al., (28), que relataram redução de triglicerídio hepático em ratos que tiveram um processo inflamatório agudo induzido por CCl₄. Esses autores sugeriram que a DEC atua nos produtos do metabolismo do ácido araquidônico durante o desenvolvimento de lesão hepática (28).

A análise ultraestrutural do fígado dos animais desnutridos do grupo CD, confirmou a presença de grandes gotículas lipídicas dispersas no citoplasma. Além disso, foram observados retículo endoplasmático reduzidos e poucos peroxissomos, além de degradação citoplasmática focal. De acordo com Brooks et al, (29), após analisarem ultraestruturalmente o tecido hepático de crianças com desnutrição protéica-energética, estes autores observaram além de várias gotículas lipídicas, edema mitocondrial, escassez de glicogênio, redução de retículo endoplasmático e peroxissomos e alterações citoplasmáticas. A diminuição de peroxissomos pode interromper a beta-oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e acentuar o acúmulo de lipídios. Além disso, uma redução na concentração de catalase reduz a desintoxicação dos radicais livres. Como a concentração de outros anti-oxidantes,

nomeadamente glutatona, também é reduzido, os danos dos radicais livres pode ocorrer, levando a peroxidação lipídica das membranas, dano mitocondrial e influxo de água e eletrólitos para a célula (30). Neste trabalho, após o tratamento com a DEC os animais desnutridos do grupo DD25 e DD50 apresentaram uma redução evidente dos danos hepáticos gerados pela restrição protéica. Possivelmente a DEC atuou como um agente hepatoprotetor, reduzindo os níveis de radicais livres e consequentemente diminuindo a peroxidação lipídica.

Outras investigações estão em andamento em nosso laboratório para verificar os mecanismos de ação da DEC sobre células hepáticas de camundongos submetidos à restrição protéica. Assim, poderemos confirmar o efeito benéfico da DEC frente as lesões causadas pela desnutrição protéica.

REFERÊNCIAS

- [1] Freedman, O.D.; Plier, A.D.; Almeida B.A.; Oliveira, Al.; Miranda, J.; Braga, C. Effect of aggressive prolonged diethylcarbamazine therapy on circulating antigen levels in bancroftian filariasis. *Trop Med Int Health*, 2001; 6:37-41.
- [2] Dreyer, G., Norões, J. Dietilcarbamazina no tratamento da filariose bancroftiana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997; 30: 229- 240.
- [3] Maizels, R.M.; Denham, D.A. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology*, 1992; 105: 849-860.
- [4] Salazar-Mallén, M. Treatment of intractable asthma with diethylcarbamazine citrate. *Annals of Allergy*, 1971; 23: 534-537.
- [5] Srinivas, H.V.; Antani, J. Diethylcarbamazine in bronchial asthma. *Annals of Allerg*, 1971; 29: 418-421.

- [6] Thiruvengadam, K.V. et al. Diethylcarbamazine citrate in bronchial asthma. *Journal of the Indian Medical Association*, 1974; 63: 278-281.
- [7] Florêncio, M.S.; Saraiva, K.L.A.; Peixoto, C. The effects of diethylcarbamazine on ultrastructure of lung cells in vivo. *Tissue Cell*, 2005; 37:241-6.
- [8] Liu, M.; Wang L.; Li E.; Enhorning G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea pigs. *Clin Exp Allergy*, 1996; 26:270-275.
- [9] Queto, T. ; Xavier, P. ; Gardel, M. A. ; Luca, B. ; Barradas, M. ; Masid, D. ; Silva, P. M. ; Peixoto, C. A. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase/CD95L-dependent Suppression of Pulmonary and Bone Marrow Eosinophilia by Diethylcarbamazine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2010; 181: 429–437.
- [10] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The State of Food Insecurity in the World. Rome, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i0680e/i0680e.pdf>>. Acesso em: 25 janeiro 2010.
- [11] Evans, G.W. The environment of childhood poverty. *American Psychologist*, 2004; 59 (2): 77-92.
- [12] Kirdch, R.; Frith, I.; Black, E.; Hoffenberg, R. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. *Nature*, 1968; 217: 578-179.
- [13] Tovar, A.R.; Santos, A.; Halhali, A.; Bourges, H.; Torres, N. Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats. *J.Nutr*, 1998; 128: 1631-1635.
- [14] Saraiva, K.L.A.; Junior-Silva, V.A.; Dias, E.S.F.; Peixoto, C.A. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reproductive Toxicology*, 2006; 22: 754-759.
- [15] Terpstra, A. H. M. Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. *Journal of Nutrition*, 2001; 131: 2067-2068.

- [16] Fock, R.A. ; Vinolo, M.A.R. ; Crisma, A.R. ; Nakajima, K. ; Rogero, M.M. ; Boreli, P. Protein-Energy malnutrition modifiles the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in murine model. *J. Nutr Sci Vitaminol*, 2008; 54, 371-377.
- [17] Borelli, P., Mariano, M., Borojevic, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr. Res*, 1995; 15: 1477-1485.
- [18] Vituri, C. L., Borelli, P., Alvarez-Silva, M., Tretin, A. Z. Alteration of the bone marrow in extracellular matrix in mice undernourished. *Baz. J. Med. Biol. Res*, 2001; 33: 889-895.
- [19] Xavier, J. G.; Favero, M. E.; Vinolo, M. A.; Rogero, M. M.; Dagli, M. L.; Aranachavez, V. E.; Borojevic, R.; Borelli, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol.*, 2007; 22:651-660.
- [20] Metwalli, O.M.; Galal, O.M.; Salem, S.I. Some aspects on liver enzymes in protein-energy malnutrition. *Z. Ernährungswiss*, 1978; 17: 206-209.
- [21] Davehport, D.J., Mostarda, R.A., Richardsoh, D.C., Gross, K.L., Greenej, K.L., Blair, K. Protein-deficient diet alters serum alkaline phosphatase, bile acids, proteins and urea nitrogen in dogs. *J. Nutr*, 1994; 124: 2677S-2679S.
- [22] Osborne, C. A., Polzin, D. J., Abdullahi, S. U., Leininger, J. R., Clin ton, C. W., Griffith, D. P. Struvite urolithiasis in animals and man: Formation, detection, and dissolution. *Adv. Vet. Sci.* 1985; 29: 1-101.
- [23] Ogawa, A.; Yano, M.; Tsujinaka, T.; Ebisui, C.; Morimoto, T; Kishibuchi, M; Morita, J.F.S. et al. Gene expression of albumina and liver-specific nuclear transcription factores in liver of protein-deprived rats. *J. Nutr* 1997, 127: 1328-32.
- [24] Marten, N.W.; Sladek, F.M.; Straus, D.S. Effect of dietary protein restriction on liver transcription factores. *Biochem J.*, 1996; 317: 361-70.

- [25] McGarry, H.L.; Plant, L.D. and Taylor, M.J. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria Journal*, 2005; 4:4.
- [26] Joshi, S.; Garole, V.; Daware, M. Girigosavi, S.; Rao, S. Maternal protein restriction before pregnancy affects vital organs of offspring in wistar rats. *Metabolism*, 2003; 52(1): 13-18.
- [27] Castro, G.S.F; Mialich,M.S.; Anjos,E.M.; Almeida,L.P.; Arroyo,P.F.; Portar,G.V.; Jordao Jr, A.A. Caracterização da esteatose hepática não alcoólica induzida por dieta hipoprotéica em ratos. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2009; 42(1): 48-53.
- [28] González R, Ancheta O, Márquez M, Rodríguez S. Hepatoprotective effects of diethylcarbamazine in acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1994; 15(6):495-497.
- [29] Brooks SE, Goldon MH, Taylor E. Hepatic ultrastructure in children with protein-energy malnutrition. *West Indian Med J*. 1992; 41(4):139-45.
- [30] Brooks SE, Doherty JF, Golden MH. Peroxisomes and the hepatic pathology of childhood malnutrition. *West Indian Med J*. 1994; 43(1):15-7.
- [31] Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr*, 1993; 123(11):1939-1951.

Tabela 1: Composições das dietas experimentais

Ingredientes	Dieta Controle*	Dieta Restrição*
	(g/kg dieta)	(g/kg dieta)
Caseína (>85% ptn)	200	40
Sacarose	100	100
Fibra	10	10
Óleo de milho	80	80
Misturas minerais**	40	40
Misturas de vitaminas**	10	10
DL- metionina	1,5	1,5
Bitartrato de colina	2,5	2,5
Amido de milho	556,5	716,5

* Dieta isocalórica fornecendo 1716.3 kJ/100g (410.6kcal/100g).

** Mistura vitamínica e salínica preparada de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (31).

Tabela 2- Peso corporal dos camundongos C57BL/6J submetidos ao tratamento com a DEC, desnutridos e alcoolizados.

Parâmetro	C	D25	D50	CD	DD25	DD50
Peso	24,03 ±	23,65 ±	24,49 ±	18,46 ±	18,47 ±	19,03 ±
Corporal	0,7583	0,7722	0,7513	0,2099*	0,1423*	0,1265*

Os dados que estão expressos são as médias com os desvios padrões.

* Representa valor estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle (ANOVA $p < 0,05$).

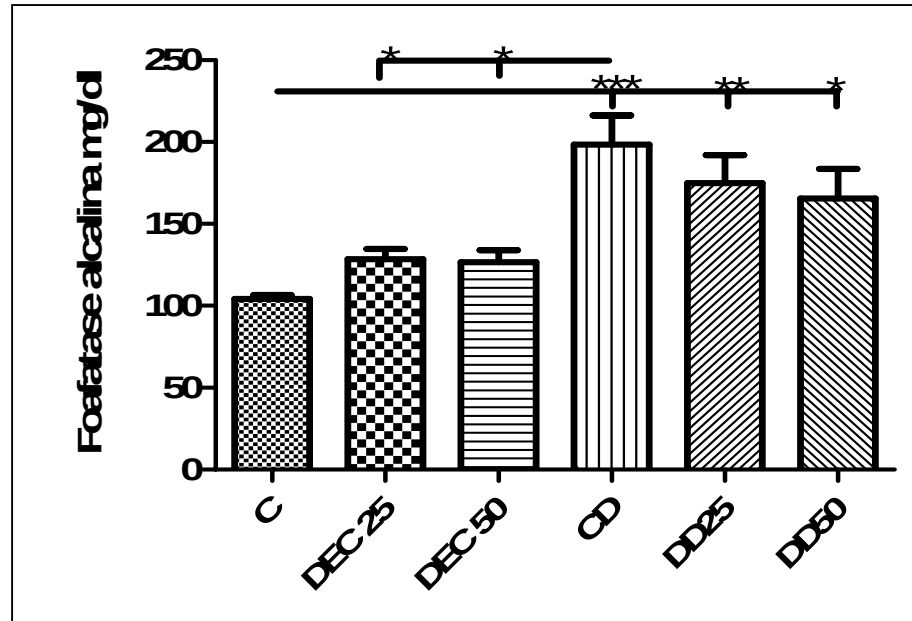


Figura 1- Enzima fosfatase alcalina (FA mg/dl). Diferença significativa dos grupos desnutridos (CD, DD25, DD50) em relação ao grupo controle (C) que recebeu apenas água, bem como os animais D25 e D50 em relação ao grupo CD (* $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,01$).

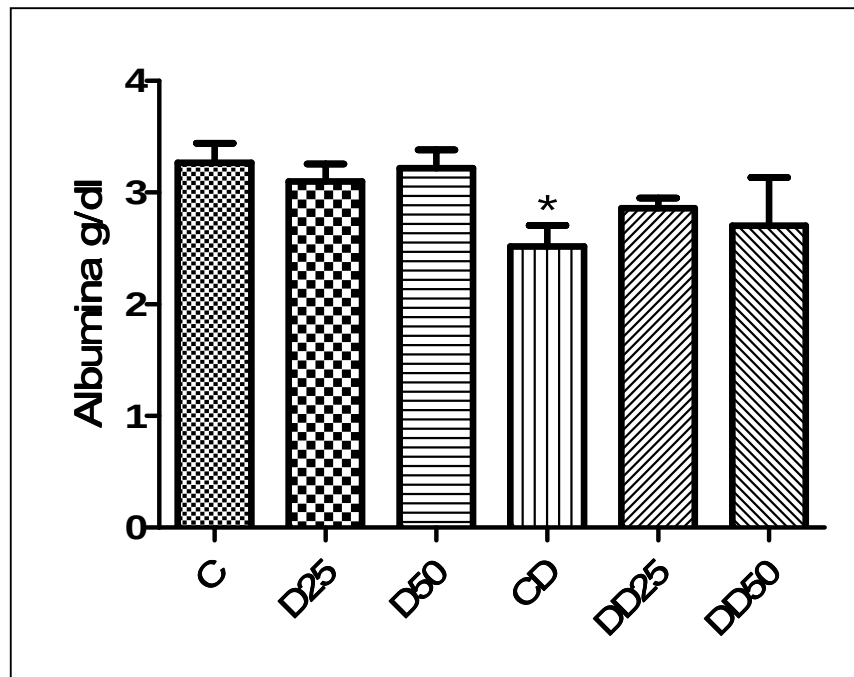


Figura 2- Dosagem bioquímica da Albumina sérica (g/dl). Diminuição significativa do grupo controle desnutrido (CD) em relação ao grupo controle (C) que recebeu apenas água (* $P < 0,05$).

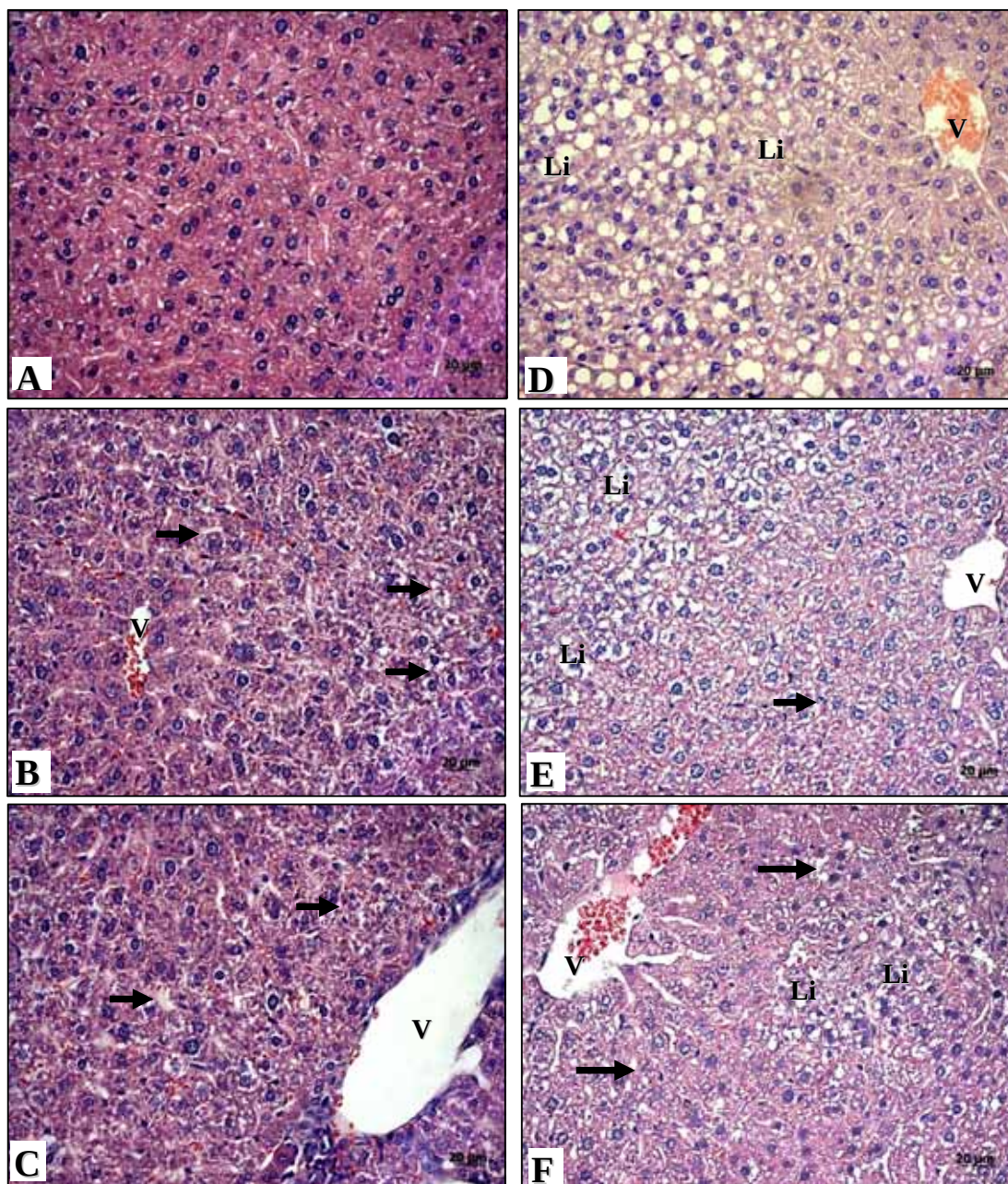


Figura 3: Micrografia dos hepatócitos. A- Grupo controle (C), mostrando a morfologia típica; B- Grupo tratado com DEC 25mg/kg (D25); C- Grupo tratado com 50mg/kg de DEC (D50). D- Grupo controle desnutrido (CD); E- Grupo desnutrido e tratado com DEC 25mg/kg (DD25); F- Grupo desnutrido e tratado com 50mg/kg de DEC (DD50). Vaso sanguíneo (V), gotículas de lipídios (Li), degeneração hidrópica (seta). Coloração H.E.; Barra= 20µm.

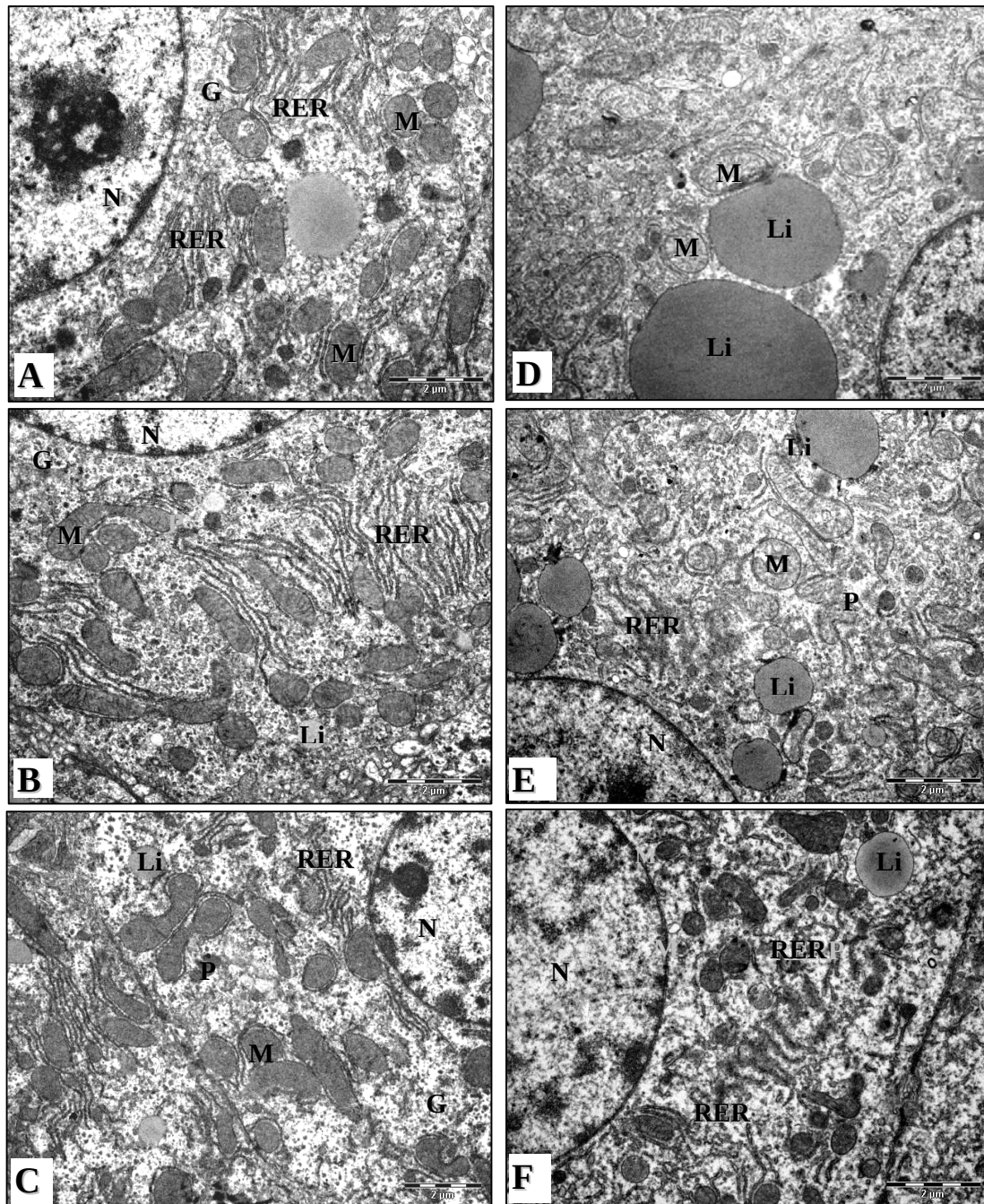


Figura 4: Ultramicrografias dos grupos controles e desnutridos tratados com DEC. A- hepatócitos do grupo controle (C). B- Grupo tratado com 25mg/kg de DEC (D25). C- Grupo tratado com 50mg/kg de DEC (D50). D- Grupo controle desnutrido (CD), mostrando grandes inclusões lipídicas. E- Grupo desnutrido e tratado com 25mg/kg DEC (DD25). F- Grupo desnutrido e tratado com DEC 50mg/kg (DD50). Mitocôndria (M), glicogênio (G),

retículo endoplasmático rugoso (RER), gotículas lipídicas (Li), peroxissomos (P). Barra = 2µm.

CAPÍTULO II

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF DIETHYLCARBAMAZINE IN HEPATIC
CELLS OF ALCOHOLIC C57BL/6J MICE**

Artigo a ser submetido à revista : **Journal of Hepatology**

**ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF DIETHYLCARBAMAZINE IN HEPATIC
CELLS OF ALCOHOLIC C57BL/6J MICE**

¹Sura Wanessa Santos Rocha, ¹Bruna dos Santos Silva, ¹Dilênia Cipriano Torres de Oliveira,
²Ana Célia Oliveira dos Santos, ^{1,3*}Christina Alves Peixoto.

¹Laboratório de Ultraestrutura, Centro de pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil, ²Laboratório de Bioquímica, Universidade de Pernambuco, Pernambuco, Brazil. ³Laboratório Microscopia e Microanálise, Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste - MCT, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence address: Christina Alves Peixoto, Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil.

Fax: 55-81-21012500, Phone: 55-81-21012551.

E-mail: peixoto.christina@gmail.com

ABSTRACT

Pharmacological studies showed that DEC interferes with the arachidonic acid metabolism, acting as an anti-inflammatory drug. There are substantial information that DEC blocks a number of steps in both cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase pathways. The present work analyzed the protective effect of diethylcarbamazine in hepatic cells of alcoholic mice. Forty-eight male C57BL/6 mice were separated in groups: control group (C, DEC25 e DEC50) and alcoholic group (CEtOH, EtOH25 e EtOH50). After the induction of alcoholism, mice were submitted 12 days of treatment with DEC solutions in concentrations of 25 and 50mg/kg orally. Biochemical analysis were performed and liver fragments were processed for light microscopy and transmission electron microscopy. The level of AST increased significantly in the control group subjected to alcohol (CEtOH) compared with the control group (C). We observed a significant reduction of serum AST and alcoholic groups DEC-treated EtOH25 and EtOH50 compared with the group that received no treatment CEtOH. The serum ALT, alkaline phosphatase and bilirubin avaliations showed no significant differences among the groups. Histological analysis of CEtOH group showed evident hepatocellular damage. However, in EtOH25 and EtOH50 groups, we observed a reduction of damage caused by the chronic ingestion of ethanol. Ultrastructural analysis of hepatocytes EtOH25 and EtOH50 group presented well-preserved organelles. Immunohistochemistry CEtOH group revealed expression of inflammatory markers IL-6, eNOS, CCR2, VCAM and ICAM, however the EtOH50 group showed no immunoreactivity for any of these markers. According to the present results, DEC is a potential drug for the treatment of chronic inflammation induced by alcoholism.

Keywords: Diethylcarbamazine, anti-inflammatory, alcoholism.

INTRODUCTION

Diethylcarbamazine is the filaricida most widely used in the treatment of lymphatic filariasis, since 1947 (1). Currently, there have been few studies conducted on the mechanism of action of this drug despite more than 50 years of use. Some studies performed on vertebrates show that this drug has several direct biochemical effects on different enzyme systems, including glycolysis, folate metabolism and activity of acetylcholinesterase (2). DEC also has anti-inflammatory properties, as a result of its interference with the metabolism of arachidonic acid, which includes lipoxygenases (LOX) and cyclooxygenases (COX) enzymes (3, 4). According Queto et al. (5), DEC has important roles in blocking the pulmonary eosinophilic inflammation in mice sensitized with ovalbumin. Besides, DEC effectively prevented the effects of subsequent airway resistance, Th1/Th2 cytokine production, pulmonary eosinophil accumulation and eosinophilopoiesis *in vivo* and *ex vivo*. DEC directly suppressed IL-5–dependent eosinophilopoiesis in naive bone marrow (5).

Chronic alcoholism is associated with numerous pathological processes that affect different organs, especially liver, pancreas, heart and brain (6). Other studies found that chronic consumption of alcohol activates the hepatic inflammatory response (7), peripheral blood monocytes, some subsets cytotoxic T lymphocyte (8, 9, 10) and Natural Killer cells (7). This study investigated the action of DEC on hepatocytes through morphological, biochemical and molecular assays on alcoholic male mice of strain C57BL/6J for possible analogies to human cases.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Forty-eight male C57BL/6 mice with 4-5 weeks old and weighting 15-16g were used in all experiments. Mice were examined for health status and acclimated to the laboratory environment at 23°C and 12h light: 12h dark photoperiod. The animals were housed in metal cages and fed a standard diet and water *ad libitum*. All experiments were carried out according to ethical guidelines (P.0169-03/CEUA-FIOCRUZ).

Diethylcarbamazine Solutions

The solutions were compound of distilled water and DEC (Farmanguinhos, BR) adjusted according to the body weight of each animal. The treated groups received 25mg/kg (D25) and 50mg/kg (D50) of DEC for twelve days, by gavage (200µl). The control group (C), composed by 08 animals, received just distilled water by the same administration via (11). Classical metabolic studies describes the total metabolic rate of a 30g mouse as 961 kJ per kg body weight, which is approximately seven times the total metabolic rate of a 70kg human, 138 kJ per kg (12). In the present work, the choice of using 50 mg/Kg as the maximum dose of DEC was based on lymphatic filariasis therapeutic dose regimens recommended by WHO is 6 mg/Kg for 12 days.

Ethanol administration

After a week of acclimation, C57BL/6 mice with 30 days were separated in three groups (n=8): 1) alcoholic group (CEtOH) that received ethanol; 2) alcoholic plus 25mg/kg of

DEC (EtOH25), 3) alcoholic plus 50mg/kg of DEC (EtOH50) respectively. Ethanol was provided as ethanol in the drinking water at 10% (volume/volume) for 2 days, 15% for 5 days, and 20% for 5 weeks (13). According Cook et al (13), changes described in the innate immune system are present after 3 weeks at 20% ethanol. The solutions were changed daily and the remaining liquid in the bottles was measured in graduated cylinder for analysis of the final volume and then discarded. After 5 weeks of alcoholism induction, mice were submitted to 12 days of treatment with DEC solutions in concentrations of 25 and 50mg/kg orally. The alcoholic group received only water for 12 days.

Optical Microscopy

Liver fragments were fixed in 10% formalin for 24 hours, processed and embedded in paraffin. Sections 4-5µm were cut, mounted on glass slides. Slices were stained with hematoxylin-eosin and evaluated with a inverted microscopy (Observer Z1, Zeiss MicroImaging GmbH) at a magnification of 400x, equipped with a camera (AxionCam MRm Zeiss) an coupled to the area of the 4.7.4 image analysis program (Zeiss).

Electron transmission microscopy

The fragments of liver were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 0.1M cacodylated buffer. After fixation, the samples were washed twice in the same buffer, and then they were post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide, 2 mM CaCl₂ and 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in acetone, and embedded in Epon 812 resin (Sigma Company, St Louis, MO). Polymerization was done at 60°C for 2 days. Ultrathin sections were collected on 300-mesh copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Morgani FEI transmission electron microscope.

Immunohistochemical assays

After fixation, the liver fragments were embedded in paraffin. Sections (5 μ m in thickness) were cut and adhered to slides treated with 3-amino-propyl-trietoxi-silane (APES [Sigma, USA]). Briefly, sections were deparaffinized with xylene and rehydrated in graded ethanol (100 to 70%). To increase epitope exposure, the sections were heated for 30 minutes in a sodium citrate buffer (0.01 M, pH 6.0). To minimize endogenous peroxidase activity, the slides were treated with 0.3% (v/v) H₂O₂ in water for five minutes. The sections were washed with 0.01M PBS (pH 7.2) and then blocked with 1% BSA, 0.2% Tween 20 in PBS for 1h at room temperature. The sections were incubated for 12 hours at 4°C with monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (eBioscience, San Diego, CA), monoclonal antibody against intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) (eBioscience, San Diego, CA), polyclonal antibody against endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Polyclonal Rabbit Anti-eNOS/NOS Type III – BD Transduction Laboratories) and anti-mouse against interleukin 6 (IL-6) (eBioscience, San Diego, CA) the optimal concentration used was 1:100 for this antibodies. For the polyclonal antibody against chemokine receptor 2 (CCR2) (ABCAM, Cambridge, UK) the optimal concentration used was 1:300. The antigen-antibody reaction was visualized with avidin-biotin peroxidase (Dako Universal LSAB[®] + Kit, Peroxidase) using 3,3-diaminobenzidine as the chromogen. The slides were counterstained in hematoxylin. Positive staining resulted in a brown reaction product. Negative controls were treated as above, but with omission of the first antibody.

Biochemical determinations

Serum was evaluated for the lipid profile (cholesterol, HDL, LDL, VLDL and triglyceride) and hepatic damage test (ALT, AST, alkaline phosphatase and bilirubin). Serum concentrations were measured by spectrophotometer method in Integra 400 – Roche. Data were compared by Tukey test.

Statistical analysis

Data were expressed with mean $\pm$ standard deviation. Differences between control and treated groups were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Dunnett and Tukey's were used *post hoc* tests. Probability values less than 0.05 were significant. Software used was GraphPad Prism version 5.

RESULTS

Ethanol consumption

Among the data analyzed, no significant difference in ethanol consumption between the alcoholic group CEtOH (179.4 ± 7.522) and DEC-treated EtOH25 (182.2 ± 6.761) and EtOH50 (181.2 ± 6.631) was observed throughout the experiment (data not shown).

Metabolic changes

No significant difference in lipid profile (total cholesterol, LDL, HDL and triglycerides) was observed between groups exposed to ethanol (CEtOH) and groups exposed to ethanol plus DEC-treatment (EtOH25 and EtOH50), when compared to the control group (Table 1).

Regarding the liver enzymes, there was no significant difference in serum AST in DEC-treated groups: D25 (110.1 ± 29.42) and D50 (116.8 ± 31.8) compared to control C (80

11 $\pm$ 31.35). However, the level of AST increased significantly in the alcoholic group (CEtOH) (169.8 $\pm$ 58.92) compared with the control group (C) (80.11 $\pm$ 31.35) (Table 2). We observed a significant reduction of serum AST in the alcoholics groups DEC-treated EtOH25 (99.18 $\pm$ 40.71) and EtOH50 (102.6 $\pm$ 13.34) when compared to the alcoholic group that received no treatment (CEtOH) (Table 2). EtOH50 and EtOH25 presented AST serum levels similar to the control group (C).

The serum ALT, alkaline phosphatase and bilirubin avaliations showed no significant differences among the groups.

Histological changes

Histological analysis of liver fragments of the control group (C) showed well preserved tissue, composed of radially arranged cords of hepatocytes hepatic lobules (Figure 2 A). After 12 days DEC treatment (D25 and D50), we observed the presence of few hydropic degeneration foci in the liver parenchyma (Figure 2 B and C).

In histological sections of the group that received treatment with ethanol (CEtOH), the most evident histological alteration was the presence of macro-and microvesicular lipid droplets in the cytoplasm of hepatocytes, which characterizes the process of steatosis (Figure 2 D). Furthermore, multiple foci of inflammatory infiltrates we observed including macrophages next to the endothelium of the vessel. Some cells were in the process of necrosis (Figure 2 D).

The group that received ethanol and was treated for 12 days with 25mg/kg of DEC (EtOH25) presented a reduced number of lipid droplets (Fig. 2 E). Similarly, the ethanol plus 50mg/kg DEC-treated group (EtOH50) showed small droplets of lipids were observed. In addition, important decrease in inflammatory infiltrates was detected (Figure 2 F).

Ultrastructural changes

The ultrastructural analysis of hepatocytes of the control group showed typical morphological pattern as rough endoplasmic reticulum, mitochondria, glycogen granules, a clear nucleus presenting and prominent nucleoli (Figure 3). The hepatocytes of the DEC-treated group for 12 days with 25mg/kg and 50mg/kg (D25 and D50) showed a proliferation of membranes of rough endoplasmic reticulum (Figure 3 B and C).

The ultrastructural analysis of the ethanol control group (CEtOH) revealed chronic cell injury characterized by the presence of several lipids droplets as well as an amorphous accumulation of glycogen in the cytoplasm (Figure 3 D). The hepatocytes of the groups EtOH25 and EtOH50 presented typical morphology, with well-preserved organelles (Figure 3 E and F), similar to the control group (C) (Figure 3 A).

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical expression of IL-6 in the alcoholic group (CEtOH), was located in the cytoplasm of Kupffer cells, as well as in some endothelial cells and hepatocytes membrane (Figure 4 A). However, the group subjected to ethanol plus 50mg/kg DEC had no specific staining for this cytokine (Figure 4 B).

Immunoreactivity was observed for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells of blood vessels and macrophages of the CEtOH group (Figure 4 C). However, the group EtOH50 showed a reduced immunoreactivity for this enzyme (Figure 4 D).

Regarding the chemokine receptor ligand 2 (CCR2), we observed immunostaining in the cytoplasm of Kupffer cells of the CEtOH group (Figure 4 E), which is a characteristic of

acute or chronic inflammatory response. The group EtOH50 show no labeling for CCR2 (Figure 4 F).

By analyzing the expression of VCAM-1, which is a key determinant for recruitment of leukocytes to the site of inflammation, there was a immunostaining in endothelial cells of hepatic sinusoids and of others blood vessels in the group submitted only to ethanol (CEtOH) (Figure 4 G). However, a weak immunolocalization was observed in animals subjected to ethanol plus 50 mg/kg DEC- treated (EtOH50) (Figure 4 H).

Regarding the immunohistochemical expression of ICAM-1 in hepatic cells of the CEtOH group, there was a large amount of immunoreactive Kupffer cells and endothelial cells (Figure 4 I). The expression of these molecules has been attributed the work of facilitating the transmigration of leukocytes across the vascular endothelium in inflammatory processes. The alcoholic group plus 50mg/kg DEC-treated (EtOH50) did not show any labeling for ICAM-1 (Figure 4 J).

DISCUSSION

Animal models of ethanol abuse have also been reported to show increased susceptibility to inflammation, and both human beings and animals chronically exposed to excess ethanol have a range of immunologic alterations (14, 15). These alterations include increases in T-cell activation in both human alcoholics (16, 17, 18) and mice consuming ethanol chronically (15), which through T cell receptor for antigen (TCR) induce a rapid inflammatory response (15, 19).

Two weeks of ethanol administration to a mouse is only equivalent to a little over 1 year for a human, so it seems desirable to explore protocols that are equivalent to several

years of heavy drinking in the human (14). In the present study, we have used time of 5 weeks at an ethanol level, which is at near tolerated by mice on a chronic basis.

The chronic consume alcohol is associated with the overproduction of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-1, IL-8 and IL-6 (20, 21). These cytokines play a vital pathological role in the development of alcoholic liver disease (ALD), as demonstrated commonly in animal models, and mediates monocyte/Kupffer cell activation, elevated vascular permeability, necrosis and/or apoptosis of hepatocytes, over expression of adhesion molecules on endothelial cells, and the activation and chemoattraction of neutrophils and mononuclear cells (22, 23). Individuals that chronically consume alcohol present lipid deposits increased in hepatocytes and inflammatory responses (24). In the present work, lipid accumulation we observed by both histology, ultrastructure in the ethanol group (CEtOH). However, a reduction of lipid droplets and inflammatory infiltrates was observed in treated DEC (EtOH25 and EtOH50) groups. Moreover, DEC-treated groups showed reduced morphological damage.

DEC has a number of direct biochemical effects on a wide range of different enzyme systems, including glycolysis, folate metabolism and acetylcholinesterase activity (2). Pharmacological studies also have pointed out that DEC has an important antiinflammatory role since it interferes with arachidonic acid metabolism (3,4).

Liver injury after ethanol treatment is a common phenomenon, and the obvious indicator of liver injury is the leakage of cellular enzymes into plasma (25). The increase in serum enzymes levels associated with ALT and AST has been observed in ethanol-treated rats, which show enhanced permeability, injury and necrosis of hepatocytes (26).

Gonzales et al., (27) showed that rats with acute inflammation induced by CCl₄ had a reduction of liver damage after DEC treatment at 25 and 50mg/kg concentrations. Besides, well- preserved organelles and membrane system of hepatocytes were observed, showing that

the DEC had protective effect (27). According to Gonzales et al., (27), DEC treatment also promoted reduction of ALT levels and triglycerides in the liver of induced acute inflammation by CCl₄ in rats. These authors suggested that DEC acts on products of arachidonic acid metabolism during development of liver injury (28). Corroborating to these data, the results of the present study showed an increase of serum AST in group CEtOH which is characteristic of abusive consumption of ethanol. However, the groups that received alcohol and DEC treatment (EtOH25 and EtOH50), had a significant reduction in levels of AST in serum, suggesting that DEC present a hepatoprotective effect on liver, since the AST is a marker of liver damage.

Excessive intake of ethanol leads to reduction of the immunological defense mechanisms, evidenced as granulocitopoiesis, chemotaxis, phagocytosis and cytotoxicity (29, 30). Alcohol is known to alter cytokine levels in a variety of tissues, including plasma, lung, liver, and brain (31).

CEtOH group presented marked immunoexpression of inflammatory mediators IL-6, eNOS, CCR2, ICAM-1 and VCAM-1. According to our results, treatment with DEC, in turn, acted by decreasing the expression of proinflammatory cytokines in endothelial cells of sinusoids and blood vessels, hepatocytes and Kupffer cells of intoxicated (EtOH50) mice.

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine involved in many aspects of the systemic inflammatory response (32). Hepatocytes, Kupffer cells (33) and liver myofibroblasts (34) are capable of releasing IL-6. Our results showed expression of IL-6 in Kupffer cells, endothelial cells and hepatocytes of the group that received ethanol (CEtOH). DEC treatment, in turn, reduced expression of this cytokine, acting as anti-inflammatory effect.

DEC is an inhibitor of leukotriene synthesis by blocking the enzyme 5-lipoxygenase (3, 4, 35, 36). It has also been demonstrated that DEC inhibits platelet aggregation, and thus

carries a possible effect on the pathway of cyclooxygenase (COX) (3). The COX pathway has similarities with the nitric oxide (NO) pathway, since both have constitutive and inducible isoforms of their enzymes and are key regulators of inflammatory responses (37, 38).

According to Connelly et al., (38) NO acts as a regulator of gene expression eNOS in macrophages, playing a central role in regulating the activation of pro-inflammatory cells and protein expression in response to LPS in murine. The results of this study indicate an increased expression of eNOS in endothelial cells and Kupffer cells of animals subjected to the toxic effects of ethanol (CEtOH). In turn, treatment with DEC reduced significantly the immunoreactivity of this enzyme.

Chemokines and chemokine receptors play a central role in regulating cell migration to the site of inflammation (39). The C2 chemokine receptor (CCR2) mainly expressed on surface of monocytes and Kupffer cells, is a functional receptor for MCP-1, MCP-2 and MCP-3 and functions to recruit these cells to the site inflammation (40, 41). The recruitment and migration of Kupffer cells and stellate cells are critical events for the development of liver inflammation and fibrosis (42, 43). The CEtOH group showed increased expression of CCR2-induced inflammation. DEC, in turn, exerted an inhibitory effect on expression of this receptor, thus modulating the inflammatory activity caused by chronic ingestion of ethanol.

Several conditions can activate endothelial cells inducing the expression of adhesion molecules (AM) on the surface of these cells (44). The vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) are minimally expressed in the no activated endothelium, but elevated in inflammatory processes (45, 46). Alcoholic beverages and cirrhosis are associated with high regulation of ICAM-1 and VCAM-1 in vessels and sinusoidal endothelium (47, 48). The elevated immune expression of the ICAM-1 and VCAM-1 in the CEtOH group confirmed that the abuse of alcohol intake increases the levels of these cytokines in endothelial cells and macrophages. As for the other inflammatory

markers studied, DEC inhibited the expression of these adhesion molecules in EtOH50 mice group.

Recent studies have emphasized the importance of treatment with DEC in pulmonary eosinophilia, reducing infiltration and cytokine levels, and migration of eosinophils (5). These studies facilitate the understanding of possible mechanisms of action of DEC, since this drug has immunomodulatory effects, cytoprotective and anti-inflammatory.

Therefore, the beneficial effect of administration of DEC evidenced by the decrease of lipids in liver and serum AST, as well as the reduction of immunoreactivity of inflammatory cytokines and chemokines, could be used as potential drug for the of chronic inflammation induced alcoholism. Further investigations to confirm the anti-inflammatory role of DEC in the pathogenesis of alcoholism are underway in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil (CPqAM/FIOCRUZ).

REFERENCES

- [1]. Hewitt, R.I. S.; Kushner, H.W.; Stewart, E.; White, W.S.; Wallace, Y. Experimental chemotherapy of filariasis III. Effect of 1-diethylcarbamazine-4-methylpiperazine hydrochloride against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, (1947) 32:1341-1329.
- [2]. Subrahmanyam, D. Antifilarials and their mode of action. *Filariasis*, Ciba Symposium, (1987), 127: 246—264.
- [3]. Maizels, R. M.; Denham, D. A. Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitology*, (1992), 105: 849-860.
- [4]. McGarry, H.L.; Plant, L.D. and Taylor, M.J. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria Journal*, (2005), 4:4.
- [5]. Queto, T. ; Xavier, P. ; Gardel, M. A. ; Luca, B. ; Barradas, M. ; Masid, D. ; Silva, P. M. ; Peixoto, C. A.; Vasconcelos, Z. M. ; Dias, E. P. ; Gaspar, M. I. Inducible Nitric Oxide Synthase/CD95L-dependent Suppression of Pulmonary and Bone Marrow Eosinophilia by Diethylcarbamazine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2010), 181: 429–437.
- [6]. Palencia, G.; Teixeira, F.; Ortiz, A.; Perez, R.; Rios, C.; Sotelo, J. Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: A study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of large human groups. *J. Stud. Alcohol*, (1994), 55:113 - 120.
- [7]. Tilg, H.; Diehl, A.M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, (2000), 343:1467-76.
- [8]. Laso, F.J; Madruga, J.I.; Girón, J.A.; López, A.; Ciudad, J.; San Miguel, J.F.; et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not ethanol consumption. *Hepatology*, (1997), 25:1096-1100.

- [9]. Song, K.; Coleman, R.A.; Alber, C.; Ballas, Z.K.; Waldschmidt, T.J.; Mortari, F.; et al. Th1 cytokine response of CD57⁺ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol*, (2001), 24:155-67.
- [10]. Jerrells, T.R. Role of activated CD8⁺ T cells in the initiation and continuation of hepatic damage. *Alcohol*, (2002), 27:47-52.
- [11]. Saraiva, K.L.A.; Junior-Silva, V.A.; Dias, E.S.F.; Peixoto, C.A. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reproductive Toxicology*, (2006), 22: 754-759.
- [12]. Terpstra, A. H. M. Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. *Journal of Nutrition*, (2001), 131: 2067-2068.
- [13]. Cook, R.T.; Zhua, X.; Coleman, R.A.; Ballas, Z.K.; Waldschmidt, T.J.; Raya, N.B.; Labrecque, D.R.; Cook, B.L. T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol*, (2004), 33: 175–181.
- [14] Cook, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system—a review. *Alcohol Clin Exp Res*, (1998), 22: 1927–1942.
- [15] Song, K., Coleman, R. A., Zhu, X., Alber, C., Ballas, Z. K., Waldschmidt, T. J., & Cook, R. T. Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*, (2002), 72: 1109–1116.
- [16] Cook, R. T., Garvey, M. J., Booth, B. M., Goeken, J. A., Stewart, B., & Noel, M. Activated CD-8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol*, (1991), 11: 246–253.
- [17] Cook, R. T., Waldschmidt, T. J., Ballas, Z. K., Cook, B. L., Booth, B. M., Stewart, B. C., & Garvey, M. J. Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leukocyte common antigen, and beta-integrin. *Alcohol Clin Exp Res*, (1994), 18: 71–80.

- [18] Cook, R. T., Ballas, Z. K., Waldschmidt, T. J., Vandersteen, D., LaBrecque, D. R., & Cook, B. L. Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, (1995), 19: 555–563.
- [19] Song, K., Coleman, R. A., Alber, C., Ballas, Z. K., Waldschmidt, T. J., Mortari, F., LaBrecque, D. R., Cook, R. T. TH1 cytokine response of the CD57⁺ T-cell subsets in healthy controls and patients with alcoholic liver disease. *Alcohol*, (2001), 24: 155–167.
- [20] McClain, C.J.; Cohen, D.A. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. (1989), 9: 349–51.
- [21] Hill, D.B.; Marsano, L.S.; McClain, C.J. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology*. (1993), 18: 576–80.
- [22] Mathurin, P.; Ganne-Carrié, N.; Poinard, T.; Trinchet, J.C. Pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of alcoholic hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol*. (1998), 22: 311–9.
- [23] Thurman, R.G. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin *Am J Physiol*. (1998), 275: 605–11.
- [24]. Kozawa, S. et al. Effect of chronic ethanol administration on disposition of ethanol and its metabolites in rat. *Alcohol*. (2007), 41: 87-93.
- [25] Baldi, E.; Burra, P.; Plebani, M.; Salvagnini, M. Serum malondialdehyde and mitochondrial aspartate aminotransferase activity as markers of chronic alcohol intake and alcoholic liver disease. *Ital J Gastroenterol*. (1993), 25: 429–32.
- [26] Goldberg, D.M.; Watts, C. Serum enzyme changes as evidence of liver reaction to oral alcohol. *Gastroenterology*. (1965), 49:256–61.
- [27]. González R, Ancheta O, Márquez M, Rodríguez S. Hepatoprotective effects of diethylcarbamazine in acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, (1994), 15(6):495-7.

- [28]. Castro, L.; Coelho, L. Gastroenterologia. Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro: (2004), Vol 2. Cap.105.
- [29]. Dani, R. Gastroenterologia Essencial. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: (2001), 2 Ed. Cap.63.
- [30]. Crews, F.T.; Bechara, R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo, G; Wheeler, M; Zou, J. Cytokines and alcohol. Alcohol Clin Exp Res (2006) 30:720–730
- [31]. Panesar, N., Tolman, K., B.S., Mazuski, J.E. Endotoxin Stimulates Hepatocyte Interleukin-6 Production. Journal of Surgical Research, (1999), 85, 251–258.
- [32]. Callery, M. P., Kamei, T., and Flye, M. W. Endotoxin stimulates interleukin-6 production by human Kupffer cells. Circ. Shock, (1992), 37: 185.
- [33]. Tiggeleman, A. M. B. C., Boers, W., Linthorst, C., Brand, H. S., Sala, M., and Chamuleau, R. A. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1b and TNFa. J. Hepatology, (1995), 23: 295.
- [34]. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB: Arachidonic acid metabolism. Ann Rev Biochem, (1986), 55:69-102.
- [35]. Bach MK, Brashler JR: Inhibition of the leukotriene synthetase of rat basophil leukemia cells by diethylcarbamazine, and synergism between diethylcarbamazine and piriprost, a 5-lipoxygenase inhibitor. Biochem Pharmacol, (1986), 31:2129-2132.
- [36]. Sano H, Hla T, Maier JM, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL: In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. J Clin Invest, (1992), 89:97-108.
- [37]. Clancy, R.M, Abramson, S.B: Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. Proc Soc Exp Biol Med, (1995), 210:93-10.

- [38]. Connelly, L.; Jacobs, A.J., Palacios-Callender, M., Moncada, S., and Hobbs, A.J. Macrophage Endothelial Nitric-oxide Synthase Autoregulates Cellular Activation and Pro-inflammatory Protein Expression. *The Journal Of Biological Chemistry*, (2003), 78: 18, pp. 26480–26487.
- [39]. Bachmann MF, Kopf M, Marsland BJ. Chemokines: more than just road signs. *Nature Rev Immunol*, (2006), 6:159-164.
- [40]. Feterowski C, Mack M, Weighardt H, Bartsch B, Kaiser-Moore S, Holzmann B. CC chemokine receptor 2 regulates leukocyte recruitment and IL-10 production during acute polymicrobial sepsis. *Eur J Immunol*, (2004), 34:3664-3673.
- [41]. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*, (2006), 116:115-124.
- [42]. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.*, (2005), 115:209-218.
- [43]. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, (2008), 134:1655-1669.
- [44]. E. Sacanella & R. Estruch. The effect of alcohol consumption on endothelial adhesion molecule expression. *Addiction Biology*, (2003) 8, 371 – 378.
- [45]. Bevilacqua MP. Endothelial-leucocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*, (1993), 11:767 – 804.
- [46]. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, (1990), 346:425- 33.
- [47]. Fisher N, Afford S, Adams DH. Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepato-Gastroenterol*, (1996), 43:1113 – 16.
- [48]. Adams DH, Burra P, Hubscher SG, Elias E, Newman W. Endothelial activation and circulating vascular adhesion molecules in alcoholic liver disease. *Hepatology* (1994), 19:588 – 94.

FIGURE LEGENDS:

Table 1 – Values of lipid profile (total cholesterol, LDL, HDL and triglycerides). No significant difference was observed between groups exposed to ethanol (CEtOH) and groups alcoholic plus DEC-treatment (EtOH25 and EtOH50), when compared to the control group (C).

Table 2 - Values of serum enzyme aspartate aminotransferase (AST U/L), alanine aminotransferase (ALT U/L), alkaline phosphatase (AP mg/dl) and bilirubin (B mg/dl). Significant increase in the ethanol control group (CEtOH) compared to the control group (C). Significant decrease in the values of AST EtOH25 and EtOH50 groups compared with the group CEtOH, achieving levels similar to the control group (C). The serum ALT, alkaline phosphatase and bilirubin evaluations showed no significant differences among the groups (* P <0.05, ** P <0.03).

Figure 1 - Micrograph of hepatocytes. A-Control group (C) showing typical morphology, B-Group treated with 25mg/kg DEC (D25), C-Group treated with 50mg/kg DEC (D50). D-Alcoholic control group (CEtOH) E – Alcoholic 25mg/kg DEC-treated group (EtOH25). F-Alcoholic 50mg/kg DEC-treated group (EtOH50). Blood vessel (V), hydropic degeneration (arrow), lipid droplets (Li), necrosis (asterisk), inflammatory infiltrates (star), macrophages (arrowhead), HE staining, Bar = 20µm.

Figure 2 – Ultrathin sections of hepatocytes. A- Control group (C). B- 25mg/kg DEC-treated group (D25). C- 50mg/kg DEC-treated group (D50). D –Hepatocytes of ethanol control group (CEtOH). E- Alcoholic plus 25mg/kg DEC-treated group (EtOH25) F- Alcoholic plus 50mg/kg DEC-treated group (EtOH50). Mitochondria (M), glycogen (G), nucleus (N), rough endoplasmic reticulum (RER), lipid droplets (Li), lysosomes (L). Bar = 2 μ m.

Figure 3 – Immunohistochemical analyses for IL-6, eNos, CCR2, VCAM-1 and ICAM-1. A, C, E, G and I – Alcoholic group (CEtOH). B,D,F,H and J – Alcoholic plus 50mg/kg DEC-treated group (EtOH50). Observe intense labeling for IL-6 (A), eNOS (C), CCR-2 (E), VCAM-1 (G) and ICAM-1 (I) present in the hepatocytes of the CEtOH group. Reduced staining after 50mg/kg DEC-treated group (EtOH50) for IL-6 (B), eNOS (D), CCR-2 (F), VCAM-1 (H) and ICAM-1 (J). Bar = 2 μ m.

Tabel 1

Parameter	C	D25	D50	CEtOH	EtOH25	EtOH50
Total						
Cholesterol	123,3±	126,4±	109,1±	90,79±	98,13 ±	96,32±
(mg/dl)	23,53	31,22	36,58	18,61	33,09	20,30
HDL	104,4 ±	107,6±	92,74±	67,13±	74,25±	74,00±
Cholesterol	13,5	24,86	27,43	15,25	22,75	18,40
(mg/dl)						
LDL	8,854 ±	4,905±	11,60 ±	8,750±	8,950 ±	10,65±
Cholesterol	8,132	5,025	13,25	6,654	5,939	6,362
(mg/dl)						
	78,83 ±	90,14±	60,00 ±	79,00±	84,25 ±	69,00±
Triglycerides	17,62	23,25	15,85	21,15	41,90	20,47
(mg/dl)						

* No significant difference in the values of lipid profile (total cholesterol, LDL, HDL and triglycerides) of the CEtOH, EtOH25 and EtOH50 groups compared to the control group (C).

Tabel 2

Parameter	C	D25	D50	CEtOH	EtOH25	EtOH50
AST (U/L)	80,11± 31,35	110,1 ± 29,42	133,9 ± 48,01	169,8± 58,92*	99,18± 40,71**	102,6± 13,34**
ALT (U/L)	26,10± 9,782	27,18 ± 7,133	47,40 ± 21,23	22,63 ± 5,938	16,96 ± 3,105	22,30 ± 3,755
AP (mg/dl)	104,2 ± 5,786	128,5 ± 15,10	126,5 ± 18,27	142,9 ± 59,35	109,0 ± 17,82	136,7 ± 14,33
Bilirubin (mg/dl)	0,1283± 0,028	0,1267± 0,068	0,1383± 0,053	0,1886± 0,021	0,1329 ± 0,048	0,1143 ± 0,041

* Significant increase in the values of AST CEtOH group compared to the control group (C).

** Significant decrease in the values of AST EtOH25 and EtOH50 groups compared with the group CEtOH. P<0.05. AST- alanine aminotransferase, ALT- alanine aminotransferase, AP- alkaline phosphatase.

Figure 2

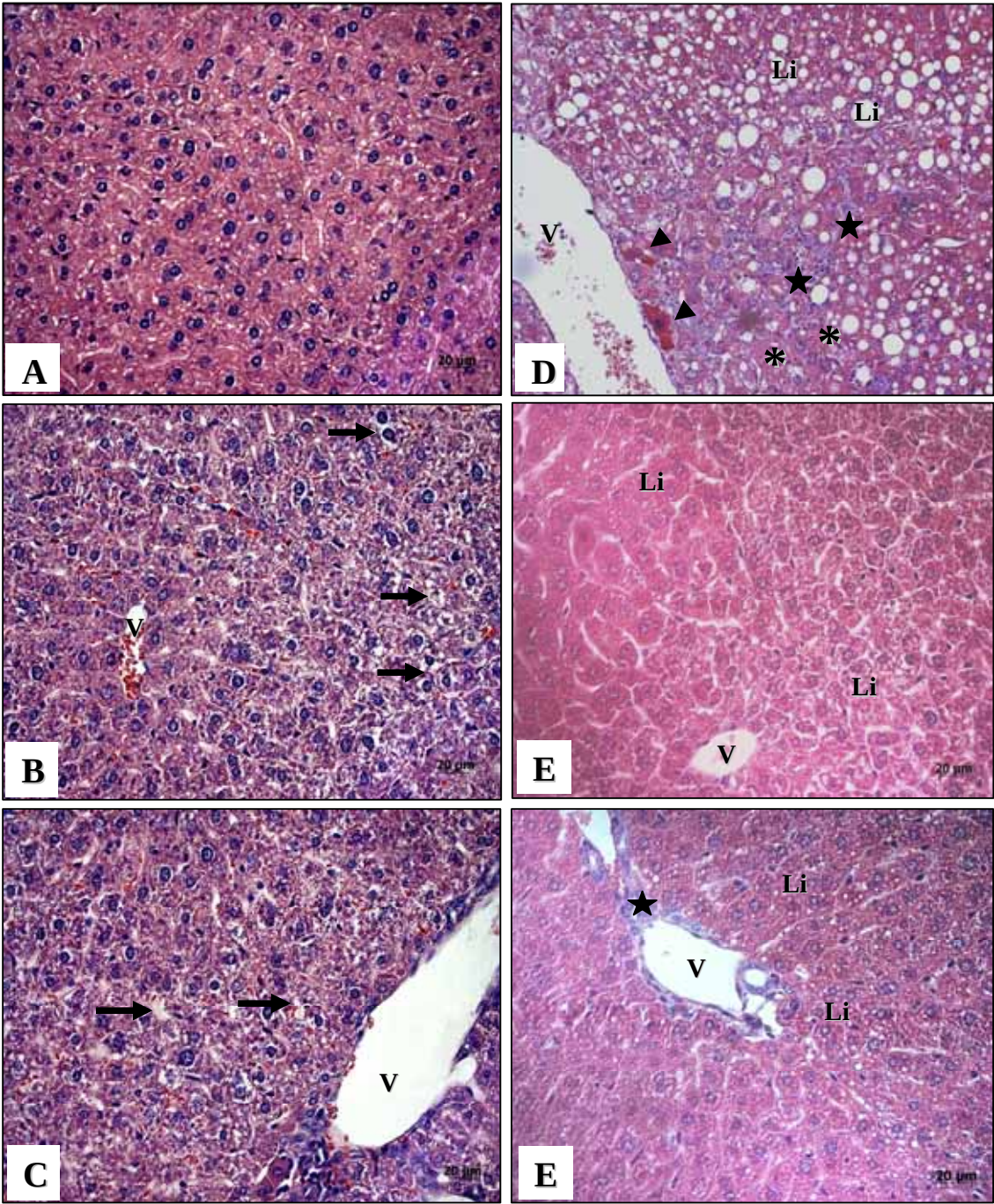


Figure 3

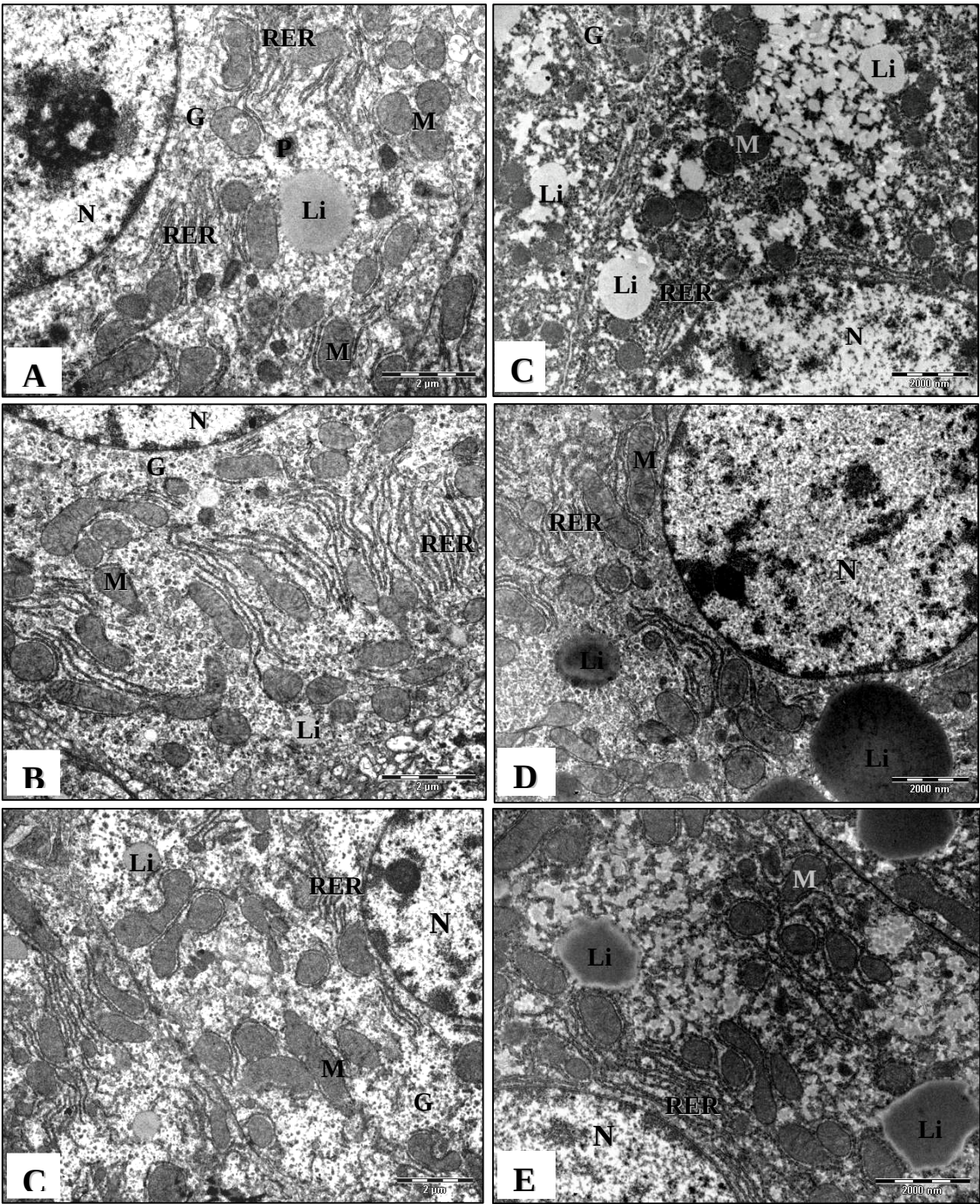
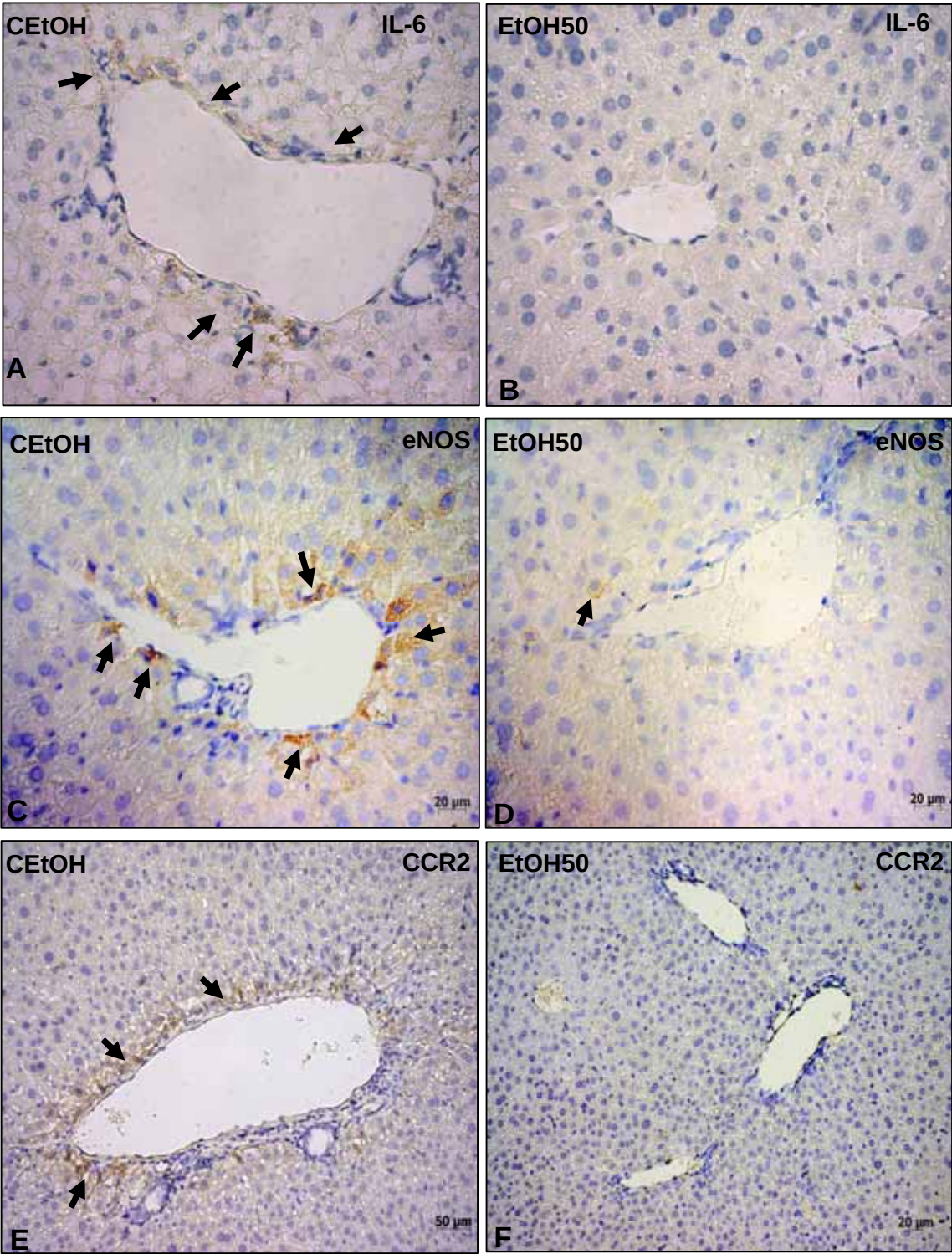
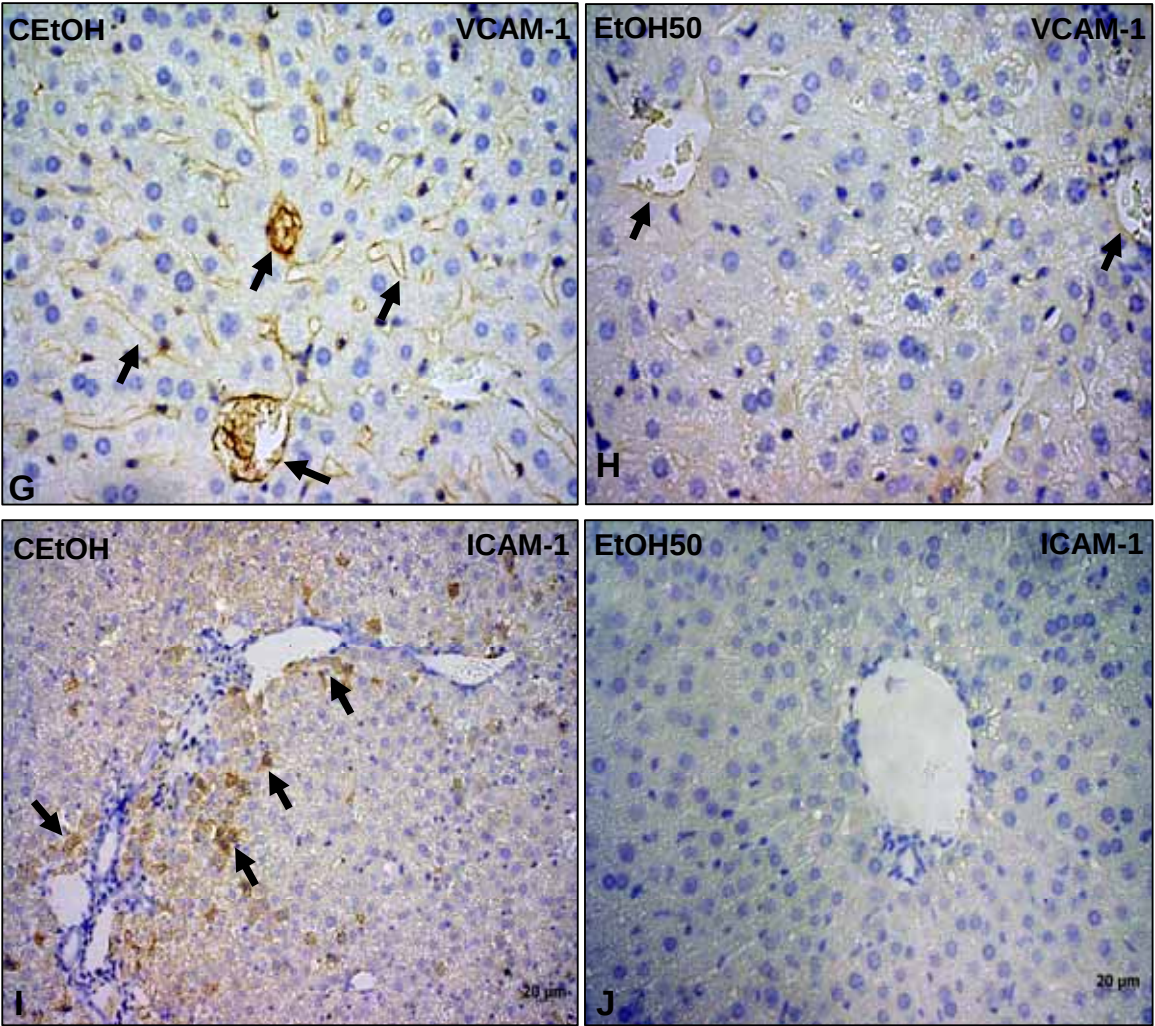


Figure 4





6 CONCLUSÕES

- A análise histológica de hepatócitos dos grupos controles tratados com DEC revelou células com aspecto morfológico padrão, apresentando citoplasma com poucas degenerações hidrópicas caracterizando um processo de desorganização a nível de canais iônicos de sódio e potássio. Os animais dos grupos desnutridos e tratados com DEC revelaram hepatócitos com aspecto preservado frente aos danos provocados pela desnutrição protéica. Da mesma forma, os animais dos grupos alcoólicos e tratados com DEC também mostraram redução de gotículas lipídicas e infiltrados inflamatórios ocasionados pela ingestão crônica de etanol.
- Através da microscopia eletrônica de transmissão, após o tratamento com DEC, foram observadas organelas com padrão morfológico característico. Em relação aos animais desnutridos tratados com DEC foram confirmadas organelas preservadas e reduções de inclusões lipídicas dispersas no citoplasma, caracterizando uma redução dos danos causados pela desnutrição. Semelhantemente, os grupos alcoólicos que receberam DEC mostraram padrão morfológico característico com organelas bem preservadas e diminuição das lesões geradas pelo etanol.
- Não foram observadas alterações significativas no perfil lipídico dos animais tratados com DEC. No entanto, houve um aumento significativo de fosfatase alcalina nos grupos desnutridos e tratados com DEC, apesar dos grupos controles tratados com DEC apresentarem valores estatisticamente menores de FA em relação ao grupo controle desnutrido. Os níveis séricos de albumina do grupo controle desnutrido foi significativamente menor em relação ao grupo controle. Esta diminuição de albumina está relacionada ao déficit de proteína ingerida. Em relação aos grupos etílicos houve aumento significativo de AST apenas no grupo controle etílico, no entanto os grupos etílicos tratados com DEC houve uma redução significativa desta enzima. Portanto, a DEC apresenta um efeito protetor diminuindo os níveis desse marcador de dano hepático.
- O presente estudo mostra a ação da DEC sobre o processo inflamatório, onde houve uma redução bastante evidente da marcação das citocinas IL-6, eNOS, CCR2, VCAM e ICAM nos animais alcoólicos tratados com DEC. Possivelmente a DEC pode estar atuando como

antiinflamatório por estar diminuindo a imunoexpressão desses marcadores inflamatórios. Assim, a DEC poderia ser utilizada como um potencial fármaco para o tratamento farmacológico da inflamação crônica induzida pelo alcoolismo.

- Outras investigações estão em andamento em nosso laboratório para verificar os mecanismos de ação da DEC sobre células hepáticas e assim, confirmar o efeito benéfico da DEC frente as lesões causadas pela desnutrição protéica e o alcoolismo.

ANEXO

Anexo - Parecer do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº P.0169-03, intitulado “Análise Ultraestrutural de células de mamíferos após tratamento com dietilcarbamazina” sob a responsabilidade da **Dra. Christina Alves Peixoto - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Campus UFPE - Pernambuco**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em reunião de 19/12/05. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 03 de janeiro de 2010.

Rio de Janeiro, 03 de janeiro de 2006.


Dr. Hugo Caire C. Faria Neto
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ