

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



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETILCARBAMAZINA SOBRE
OS MECANISMOS REGULATÓRIOS DA INFLAMAÇÃO
HEPÁTICA INDUZIDA PELO ALCOOLISMO**

GABRIEL BARROS RODRIGUES

RECIFE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETILCARBAMAZINA SOBRE
OS MECANISMOS REGULATÓRIOS DA INFLAMAÇÃO
HEPÁTICA INDUZIDA PELO ALCOOLISMO

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Aluno: Gabriel Barros Rodrigues

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rodrigues, Gabriel Barros

Avaliação dos efeitos da dietilcarbazona sobre os mecanismos regulatórios da inflamação hepática induzida pelo alcoolismo/ Recife: O Autor, 2014.

94 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Christina Alves Peixoto

Dissertação (mestrado) ĩ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Fígado- doenças 2. Farmacologia I. Peixoto, Christina Alves (orientadora) II. Título**

616.362

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 234

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETILCARBAMAZINA SOBRE OS MECANISMOS REGULATÓRIOS DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELO ALCOOLISMO

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de
Pernambuco

Apresentada no dia 29/09/2014, no Centro de Centro de Pesquisas AggeuMagalhães –
CPqAM/FIOCRUZ, às 14:00h.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Karla Patrícia de Sousa Barbosa
Faculdade Estácio do Recife

Dra. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dra. Christina Alves Peixoto
Laboratório de Ultraestrutura – CPqAM/FIOCRUZ
(Orientadora)



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

À Deus

Aos meus pais **Antonio** e **Anete**, por sempre confiarem em mim,
nunca duvidarem da minha capacidade e
não medirem esforços pelo meu sucesso.

À minha irmã **Germana**, por sua paciência e eterna palavra de incentivo
e carinho em todas as horas.

À **Ingrid**, por se tornar o amor da minha vida,
sendo a companhia de todas as horas
e ter papel fundamental na conclusão
deste trabalho.

Agradeço primeiramente a DEUS, que tornou todo este
trabalho possível e direcionou todas as coisas da maneira
mais perfeita possível, que só Ele sabe fazer.

Agradeço a minha família por todo amor e carinho
a mim concedidos, pois só vocês sabem o quanto foram
importantes para mim em todos os momentos da minha vida
e em especial nestes últimos meses.

Agradeço a minha namorada Ingrid pela sua compreensão
e inestimável apoio, não só durante este trabalho, como
também pelas diversas coisas pelas quais passamos. Sem você,
nada disso teria sido possível.

Agradeço a minha orientadora Christina pela confiança depositada,
como também por todo suporte e auxílio oferecidos.

Agradeço as minhas colegas de trabalho
pelas risadas, experiências compartilhadas,
paciência e todos os bons momentos dessa caminhada.

Por fim, agradeço aos meus amigos, por entenderem e perdoarem
minha ausência, pelo incentivo e companhia que sempre
me foram gratos.

RESUMO

A doença hepática alcoólica (DHA) é um termo coletivo para uma série de alterações patológicas que acometem o fígado, que variam de esteatose e esteatohepatite à cirrose e carcinoma hepatocelular. Adietilcarbamazina é um fármaco utilizado no tratamento da filariose linfática desde 1947, que apresenta propriedades anti-inflamatórias devido a sua interferência no metabolismo do ácido araquidônico. O objetivo do trabalho foi analisar a ação da DEC sobre a inflamação hepática induzida pelo alcoolismo, através de análises histológicas, parâmetros bioquímicos, avaliação da expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios por meio de imunohistoquímica, imunofluorescência e western blot e avaliação do estresse oxidativo por ensaio imunoenzimático. Sessenta e dois camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram divididos nos seguintes grupos: 1) controle, 2) DEC 50 mg/kg , 3) álcool, 4) álcool + DEC 50 mg/kg , 5) álcool + Celecoxibe 50mg/kg 6) álcool + PDTC 100mg/kg e 7) álcool + PDTC 100mg/kg + DEC 50mg/kg. A análise histológica do grupo alcoólico revelou diversas alterações, como infiltrado inflamatório, esteatose, regiões de necrose e elevada concentração de fibras colágenas. Além disso, este grupo apresentou elevada expressão de todos marcadores inflamatórios, elevação do perfil lipídico e marcador de dano hepático na avaliação bioquímica e redução da atividade da enzima glutathione redutase. O tratamento com a DEC foi capaz de reduzir as alterações histológicas e o conteúdo de colágeno, como redução dos marcadores pró-inflamatório e aumento dos anti-inflamatórios. A DEC também foi capaz de melhorar os parâmetros bioquímicos e aumentar a atividade da glutathione redutase. Estes resultados sugerem o papel benéfico da DEC durante a patogênese da DHA, configurando-se como possível alternativa terapêutica no tratamento de hepatopatias.

Palavras-chave: Dietilcarbamazina, doença hepática alcoólica, inflamação, fígado.

ABSTRACT

Alcoholic liver disease (DHA) is a collective term for a number of pathological changes that affect the liver ranging from steatosis and steatohepatitis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The diethylcarbamazine is a drug used in the treatment of filariasis since 1947, which has anti-inflammatory properties due to its interference with the metabolism of arachidonic acid. The objective of this work was to analyze the effect of DEC on hepatic inflammation induced by alcoholism, through histological analysis, biochemical parameters, evaluation of the expression of proinflammatory and anti-inflammatory mediators by immunohistochemistry, immunofluorescence and western blot analysis and evaluation of oxidative stress by immunoenzymatic assay. Sixty-two male C57BL/6 mice were divided into the following groups: 1) control, 2) DEC 50 mg/kg, 3) alcohol, 4) alcohol + DEC 50 mg/kg, 5) alcohol + Celecoxib 50 mg/kg 6) alcohol + PDTC 100 mg/kg and 7) alcohol + PDTC 100 mg/kg + DEC 50 mg/kg. Histological analysis of the alcoholic group revealed several changes such as inflammatory infiltrate, steatosis, necrosis areas and high concentration of collagen fibers. Furthermore, this group showed high expression of all inflammatory markers, elevated lipid profile and liver damage marker in the biochemical assessment and reduction of glutathione reductase activity. Treatment with DEC was able to reduce the histological changes and collagen content, as well as reduction of pro-inflammatory markers and an increase of anti-inflammatory markers. DEC was also able to improve the biochemical parameters and increase glutathione reductase activity. These results suggest a beneficial role for DEC during the pathogenesis of DHA, configuring itself as a possible alternative treatment of liver diseases.

Keywords: Diethylcarbamazine, alcoholic liver disease, inflammation, liver.

Figura 1. Desenho esquemático do fígado. A – anatomia macroscópica do fígado. B – lóbulos hepáticos. C – Parte de um lóbulo hepático em maior aumento.....	19
Figura 2. Fotomicrografia do fígado. A- veia central (centrolobular). B – tríade portal.....	20
Figura 3. Espectro de alterações da DHA.....	21
Figura 4. A patogênese da inflamação hepática induzida pelo álcool e o papel do sistema imune são complexos.....	22
Figura 5. A - Representação esquemática do metabolismo de primeira passagem do etanol pelo fígado. B - Locais de absorção do álcool no corpo (regiões escuras na imagem).....	24
Figura 6. Vias oxidativas do metabolismo do etanol no fígado.....	25
Figura 7. Via de ativação do NF-kB.....	26
Figura 8. Citrato de dietilcarbamazina.....	33
Figura 9. Estrutura do Celecoxibe.....	34
Figura 10. Estrutura do PDTC.....	35

REVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroides
ALD	Álcool Desidrogenase
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína Quinase Ativada Por AMP
AST	AspartatoAminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
ALDH	Aldeído Desidrogenase Mitocondrial
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DEC	Dietilcarbamazina
DHA	Doença Hepática Alcoólica
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HSC	Células Estreladas Hepáticas
IFN- γ	Interferongamma
IL-1 β	Interleucina 1beta
IL-17	Interleucina 17
I κ B	Inibidor do Fator Nuclear kappa B alfa
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzível
LH	Hormônio Luteinizante

LPS	Lipopolissacarídeo
MFB	Miofibroblastos
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDTC	Ácido PirrolidinaDitiocarbamato de Amônio
PGE ₂	Prostaglandina E2
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Objetivo Geral.....	15
1.1.2 Objetivos Específicos.....	15
1.2 Justificativa.....	16

CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 Função e Estrutura Hepática.....	18
1.2 Doença Hepática Alcoólica.....	20
1.3 Etanol.....	23
1.3.1 Aspectos Gerais.....	23
1.3.2 Metabolismo.....	24
1.4 NF-κB.....	25
1.5 Citocinas.....	27
1.5.1 TNF-α.....	27
1.5.2 IL-1β.....	28
1.5.3 IL-10.....	28
1.5.4 IL-17.....	29
1.5.5 IFN-γ.....	29
1.5.6 TGF-β.....	30
1.6 Enzimas.....	30
1.6.1 AMPK.....	30
1.6.2 COX-2.....	31
1.6.3 iNOS.....	32
1.7 Dietilcarbamazina.....	32
1.8 Celecoxibe.....	34
1.9 Ácido PirrolidinaDitiocarbamato de Amônio.....	35
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

CAPÍTULO II



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Alcohol.....	47
CONCLUSOES.....	90
ANEXO.....	91
Prêmios.....	92

O alcoolismo constitui um grave problema de saúde pública. Segundo o último levantamento da Organização Mundial de Saúde, o consumo de álcool é o terceiro maior fator de risco no mundo para doenças, sendo o geral 5,1% da carga global de doenças e lesões atribuídas ao álcool (WHO, 2014). No Brasil, os dados mais recentes em levantamento domiciliar realizado nas 108 maiores cidades do país, apontam que 12,3% das pessoas entre 12 e 65 anos são dependentes de álcool e que 74,6% dos entrevistados já consumiram álcool na vida (VARGAS & SOARES, 2013).

A doença hepática alcoólica (DHA) é marcada por alterações patológicas do fígado que variam de esteatose e esteatohepatite à cirrose e em alguns casos ao carcinoma hepatocelular. A patogênese do consumo agudo e crônico do álcool é multifatorial com diversas consequências em diferentes tecidos e tipos celulares. A ingestão do álcool leva a níveis elevados de endotoxinas (especialmente LPS) no sangue e no fígado, o que conduz à ativação de células imunitárias que produzem mediadores inflamatórios (citocinas). A produção anormal de citocinas é uma característica importante da doença hepática alcoólica. Elevadas concentrações séricas de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 foram relatadas em pacientes alcoólicos e correlacionadas com a lesão do fígado e dos resultados clínicos (BRUHA et al., 2012).

A fibrose progressiva é crucial para a DHA crônica, que pode resultar eventualmente em cirrose, insuficiência hepática e complicações clínicas associadas. Em resposta ao acetaldeído, peróxidos lipídicos, ROS e endotoxinas, as células de Kupffer e outras células inflamatórias tornam-se ativadas para secretar numerosos fatores de crescimento e citocinas, incluindo TNF- α , fator de crescimento derivado de plaquetas e o TGF- β , sendo estes estímulos essenciais para a proliferação e função secretora de células estreladas hepáticas (HSC) e miofibroblastos (MFB). HSCs/MFBs ativados, aumentam significativamente a produção de matriz fibrosa, especialmente colágenos, e regulam negativamente a sua degradação (ORMAN et al., 2013; SVEGLIATI-BARONI et al., 2005).

Uma das vias do metabolismo do etanol no fígado (a via da CYP2E1) é mais induzida com o consumo crônico de álcool, e esta via gera espécies reativas de oxigênio (WATSON et al., 2013). A geração excessiva destas espécies reativas de oxigênio,

desempenha um papel importante no dano celular celular induzida por estes radicais livres,tem papel crítico na inflamação induzida pelo álcool. No fígado, células de Kupffer produzem ROS em resposta à exposição crônica ao álcool, contribuindo para os efeitos danosos do etanol (AMBADE & MANDREKAR, 2012).

Dessa forma, a condição inflamatória está intimamente ligada à progressão da doença hepática alcoólica, sendo a terapia farmacológica atual limitada e ineficaz para os casos mais avançados como a hepatite alcoólica e a cirrose. Dentre os esquemas terapêuticos utilizados, o mais difundido é o uso de corticosteroides visando diminuir a produção de citocinas inflamatórias por meio da regulação da transcrição. No entanto, pacientes que fazem uso de corticoides, tornam-se mais susceptíveis a infecções, resultado da supressão imune exercida pelo fármaco (GAO & BATALLER, 2011).

A dietilcarbamazina (DEC) é um derivado da piperazina, utilizada eficazmente há mais de 50 anos no tratamento da filariose linfática. Além disso, ela também apresenta propriedades anti-inflamatórias, em parte devido a alterações no metabolismo do ácido araquidônico (NORÕES *et al.*, 1997).

Alguns estudos clínicos relataram que a DEC reduziu os sintomas da asma brônquica devido aos seus efeitos anti-inflamatórios (MAIZELS & DENHAM, 1992; THIRUVENGADAM *et al.*, 1974). Além disso, estudos recentes do nosso laboratório mostraram a ação anti-inflamatória da DEC em modelos de inflamação pulmonar e hepático (RIBEIRO *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2012).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi investigar a ação anti-inflamatória da dietilcarbamazina em um modelo de lesão hepática crônica induzida pelo álcool.

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar o mecanismo de ação da DEC sobre o processo inflamatório hepático induzido pelo alcoolismo em camundongos machos C57BL/6 através de avaliações morfológicas, bioquímicas e moleculares.

1.1.2 Objetivos Específicos

1-Analisar o efeito do tratamento *in vivo* da DEC sobre a inflamação hepática induzida pelo alcoolismo através da microscopia óptica (histopatologia), bem como avaliar o conteúdo de fibras colágenas (Sirius red);

2-Examinar por meio de provas bioquímicas o funcionamento hepático (aspartatoaminotransferase - AST) e o perfil lipídico (colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade - HDL);

3-Characterizar através de imunohistoquímica e western blot a ação da DEC sobre a expressão dos marcadores inflamatórios:fator de necrose tumoral alfa(TNF- α),interleucina 1 beta(IL-1 β), interleucina 17 (IL-17), ciclooxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico-sintase induzível(iNOS) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), bem como do fator nuclear kappa B(NF-kB) e sua proteína inibitória o inibidor do fator nuclear kappa B alfa(IkB- α);

4-Avaliar por western blot e imunofluorescência a ação da DEC sobre o fator nuclear kappa B (NF-kB) e sua proteína inibitória o inibidor do fator nuclear kappa B alfa (IkB- α);

5-Analisar o papel da DEC sobre o estresse oxidativo através das concentrações da glutathionaredutase por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA);

6-Characterizar os efeitos da DEC na recuperação tecidual, através de western blot e imunohistoquímica, avaliando os seguintes marcadores anti-inflamatórios: proteína quinase ativada por AMP (AMPK), e sua forma ativa fosforilada p-AMPK e a Interleucina-10 (IL-10).

Apesar do profundo impacto econômico e de saúde da DHA, pouco progresso tem sido obtido no tratamento de pacientes com esta condição clínica grave. Não existem ferramentas modernas de diagnóstico para avaliar a susceptibilidade individual para o desenvolvimento da DHA, e a sua patogênese em seres humanos não é completamente compreendida. Como consequência, nenhum novo fármaco para DHA foi desenvolvido com êxito desde os anos 1970, momento em que o uso de corticosteroides foi proposto para o tratamento da hepatite alcoólica grave (GAO & BATALLER, 2011). O pobre progresso terapêutico no domínio da DHA tem, em parte, resultado da falta de modelos experimentais da DHA avançada e da dificuldade de realização de ensaios clínicos em doentes com desejo compulsivo.

A dificuldade no tratamento reside principalmente nos estágios avançados da DHA, pacientes com cirrose alcoólica, por exemplo, compõem uma parte significativa dos pacientes indicados para transplante de fígado (30% -50%)(WILLENBRI, 2009).

A Dietilcarbamazina é um medicamento amplamente utilizado na terapêutica da filariose e apresenta excelente tolerabilidade com poucos efeitos colaterais. Além disso, a DEC apresenta baixo custo em comparação ao de terapias atuais como o uso de monoclonais anti-TNF- α (etanercept, infliximab, etc) ou glicocorticoides, com efeitos colaterais graves, como o aumento de infecções e mortalidade associada a esses fármacos.

Dessa forma, devido aos resultados recentes obtidos em nosso laboratório em modelos agudos e crônicos de inflamação com a DEC, o presente trabalho visa contribuir na busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento dos estágios mais avançados das hepatopatias, especialmente a DHA.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Capítulo I

1.1 Função e Estrutura Hepática

O fígado, pesando cerca de 1,5 kg, é o segundo maior órgão do corpo (o maior é a pele). Situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, está subdividido em quatro lobos - direito, esquerdo, quadrado e caudado - dos quais os dois primeiros constituem a quase totalidade (Figura 1A). É um órgão multifuncional e dentre suas principais funções destacam-se a síntese e a secreção protéica, a secreção biliar, a regulação dos níveis glicêmicos e a metabolização de drogas e carboidratos (GARTNER & HIATT, 2007).

A célula hepática, ou hepatócito é o componente estrutural básico do fígado, correspondendo a 80% da população celular. Estas células epiteliais estão agrupadas em placas interconectadas, os lóbulos hepáticos (Figura 1B). Em certos animais (p. ex., porcos), os lóbulos são separados entre si por uma camada de tecido conjuntivo, o que não ocorre em humanos, nos quais os lóbulos estão em contato ao longo de grande parte de seu comprimento, tornando difícil o estabelecimento de limites exatos entre lóbulos diferentes. Em algumas regiões da periferia dos lóbulos existe tecido conjuntivo contendo ductos biliares, pequenos ramos da artéria hepática e ramos da veia porta (formando a tríade portal) (Figura 1C e 2B), além de nervos e vasos linfáticos. Estas regiões, os espaços porta, estão presentes nos vértices dos lóbulos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Os hepatócitos estão radialmente dispostos no lóbulo hepático formando fileiras, os cordões hepáticos, arranjados da periferia do lóbulo para o seu centro, em torno de uma veia central, a veia centro-lobular (ou sublobular) (Figura 2A), anastomosando-se livremente. Entre os cordões de hepatócitos encontram-se capilares, os sinusóides hepáticos (Figura 1C). Capilares sinusóides são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O fígado é envolvido pelo peritônio, que forma um epitélio pavimentoso simples cobrindo a cápsula de tecido conjuntivo denso não modelado (cápsula de Glisson) do órgão. A cápsula de Glisson se torna mais espessa no hilo, por onde a veia porta e a

o e por onde saem os ductos hepáticos direito e esquerdo (GARTNER & HIATT, 2007).

O suprimento de sangue para o fígado deriva de duas fontes: da veia porta e da artéria hepática; a primeira fornece aproximadamente 75% do fluxo total de 1.500mL/min, sangue pouco oxigenado e rico em nutrientes proveniente das vísceras abdominais. O restante, deriva da artéria hepática, que fornece sangue rico em oxigênio. Os pequenos ramos da vênula portal terminal e da arteríola hepática terminal, entram nos ácinos da tríade portal e então fluem através dos sinusóides entre placas de hepatócitos (BEERS & BERKOW, 2001).

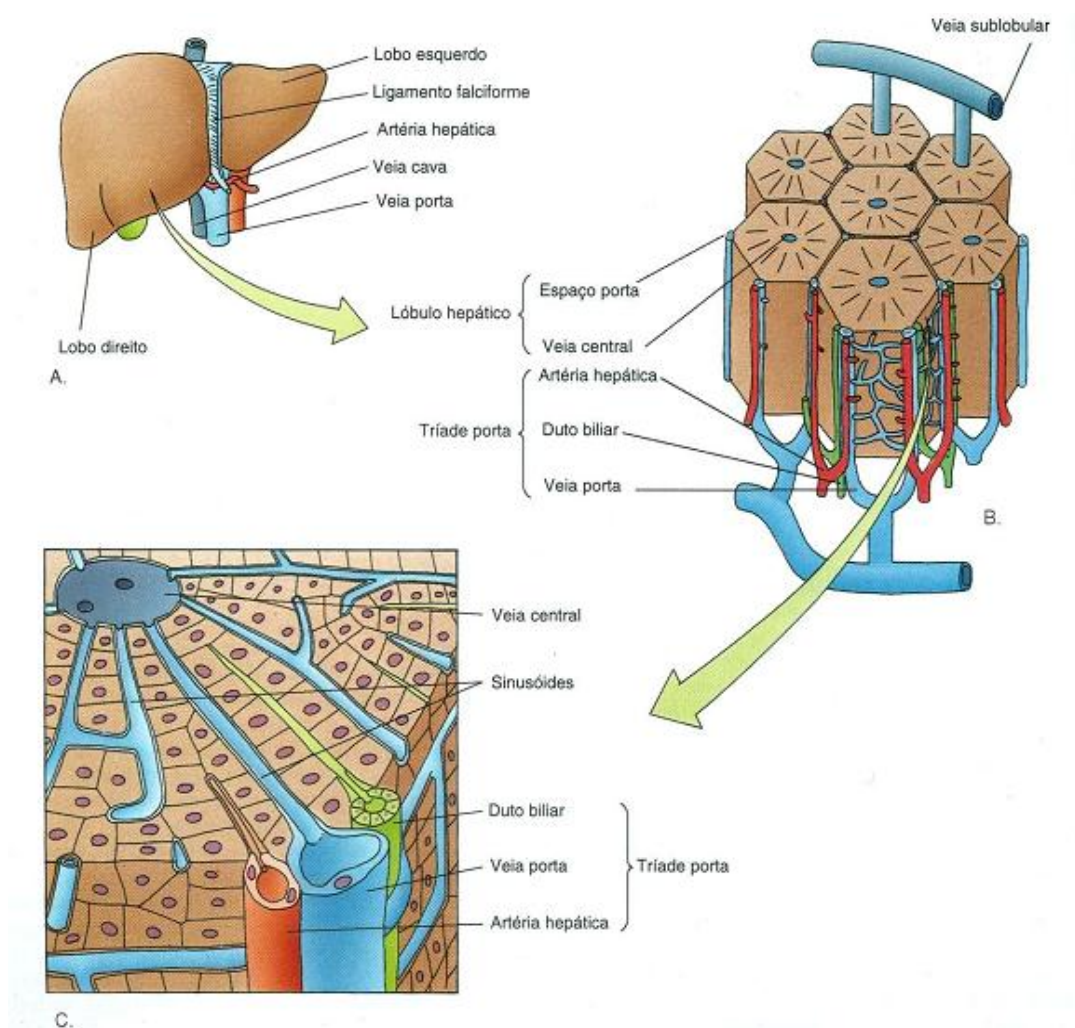


Figura 1. Desenho esquemático do fígado. A – anatomia macroscópica do fígado. B – lóbulos hepáticos. C – Parte de um lóbulo hepático em maior aumento (GARTNER & HIATT, 2007).

A troca de nutrientes ocorre através dos espaços de Disse, que separam os hepatócitos do revestimento sinusoidal poroso. O fluxo sinusoidal se mistura nas

coalescem e finalmente formam a veia hepática, o sangue eferente para a veia cava inferior. O fígado também é drenado por um suprimento rico de vasos linfáticos. É comum ocorrer interferência no suprimento sanguíneo hepático na cirrose e em outras doenças crônicas que se manifestam geralmente por hipertensão portal (BEERS & BERKOW, 2001).

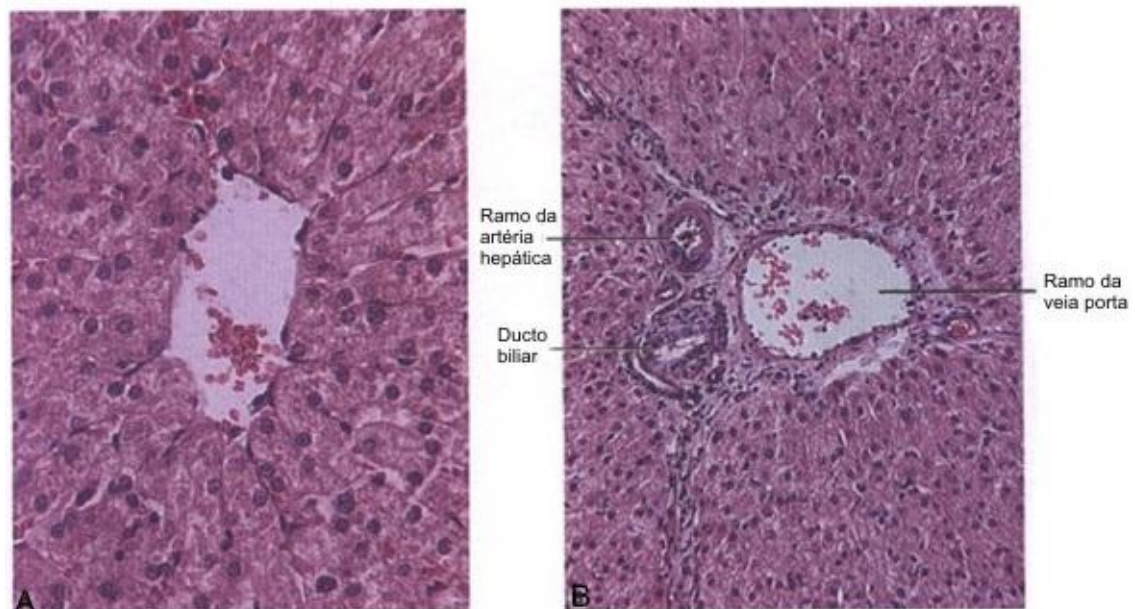


Figura 2. Fotomicrografia do fígado. A- veia central (centrolobular). B – tríade portal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

1.2 Doença Hepática Alcoólica

A doença hepática alcoólica (DHA) representa um espectro de sintomas clínicos e alterações morfológicas que variam de fígado gorduroso, inflamação hepática e necrose (hepatite alcoólica) à fibrose progressiva (cirrose alcoólica) (Figura 3). Além disso, a manutenção do consumo excessivo de álcool favorece a progressão de outras doenças hepáticas, tais como hepatite crônica relacionada a vírus, além do risco aumentado de desenvolver carcinoma hepatocelular (O'SHEA et al., 2010).

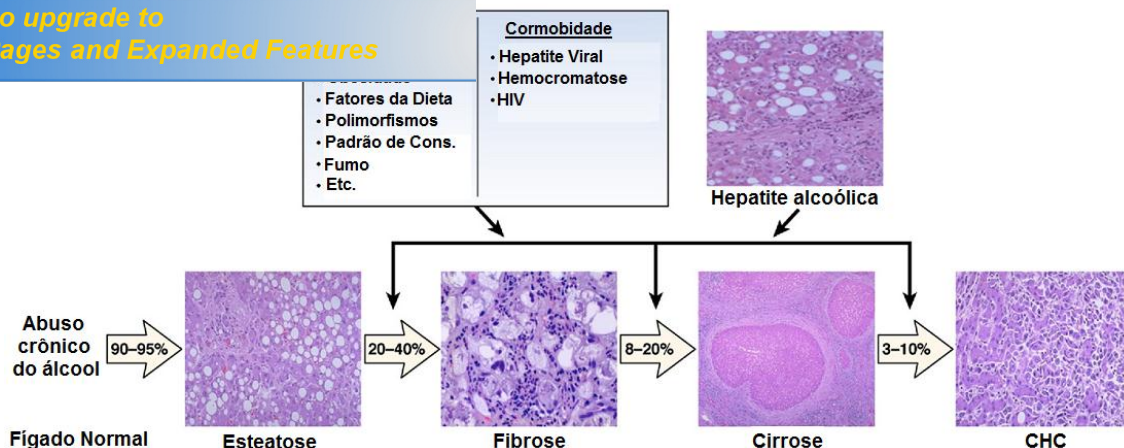


Figura 3. Espectro de alterações da DHA (GAO & BATALLER, 2011).

A dependência do álcool, por si só nem sempre é um pré-requisito para o desenvolvimento da DHA. Pois, além da quantidade consumida de álcool, fatores genéticos e ambientais provavelmente também desempenham papel crucial no desenvolvimento da DHA (GRAMENZI et al., 2006).

Embora uma relação dose-efeito entre a ingestão de álcool e a lesão hepática induzida pelo álcool tenha sido relatada, não há nenhuma quantidade definida de consumo de álcool que pode certamente prever o desenvolvimento de DHA. Na verdade, a maioria dos consumidores pesados de longo prazo, desenvolvem fígado gorduroso (cerca de 90%), porém apenas 10-35% desenvolvem hepatite e apenas 8-20% irão avançar para a cirrose. Estudos preconizam que o consumo diário de álcool de cerca de 40-80 g/dia para homens e 20-40 g/dia para mulher por 10-12 anos levará a quase 100% de chance desenvolvimento das formas mais graves da DHA (BRUHA et al., 2012; GAO, 2013).

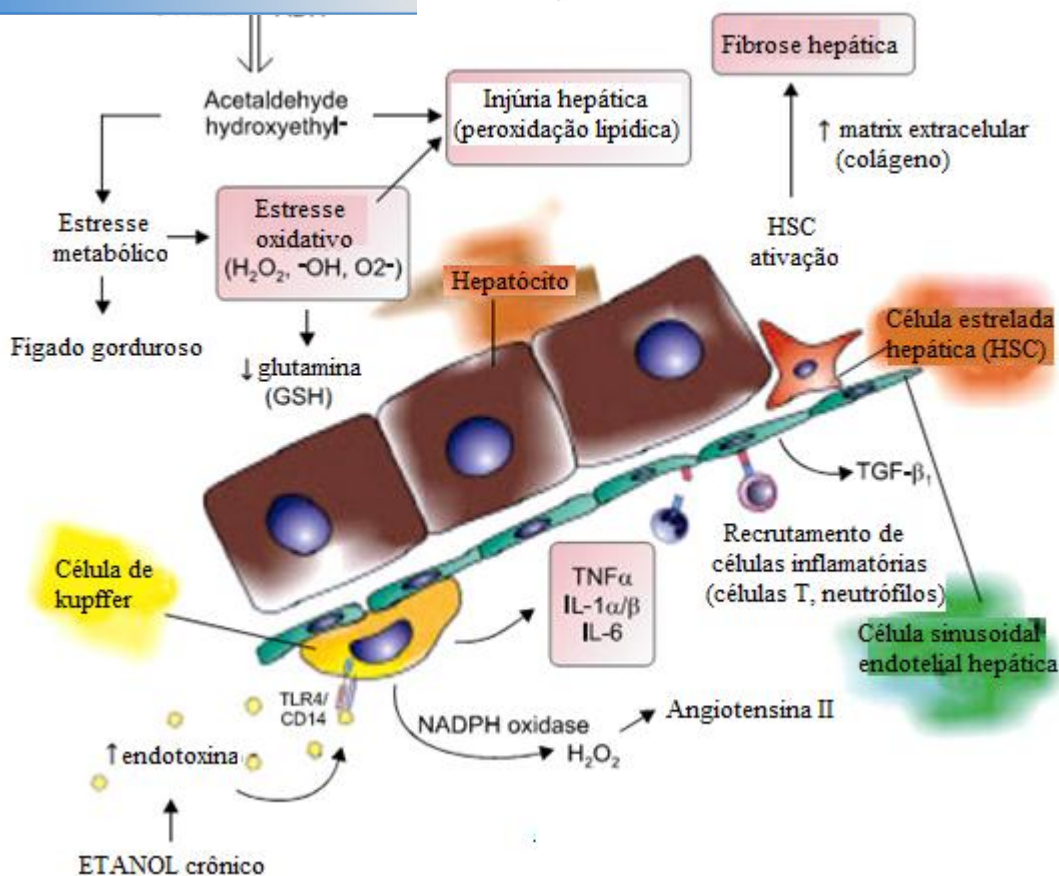


Figura 4. A patogênese da inflamação hepática induzida pelo álcool e o papel do sistema imune inato são complexos (CHAE, 2009).

Dentre os mecanismos associados à lesão hepática induzida pelo álcool, dados experimentais e humanos sugerem um papel principal para a citocromo P450 2E1 (CYP2E1), uma enzima que pode ser induzida 10-20 vezes pelo consumo crônico de álcool (WATSON et al., 2013). A CYP2E1 metaboliza o etanol a acetaldeído, uma molécula altamente tóxica e mutagênica, e aumenta o estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxidos de lipídeos (WU & CEDERBAUM, 2009).

A indução da CYP2E1 está associada ao acúmulo de gordura (LU *et al.*, 2008), inflamação e fibrose (LIEBER, 2004) e lesões ao DNA (WANG *et al.*, 2009). Além disso, o consumo excessivo de álcool pode conduzir a um aumento portal-sistêmico da absorção de endotoxinas a partir de bactérias intestinais que contribuem para inflamação-necrose e progressão da fibrose através de vários mecanismos moleculares,

alpha (TNF- α) e do complexo CD14/receptor toll-oxidase (ALTAMIRANO & BATALLER, 2011).

Além disso, a ingestão de álcool aumenta a permeabilidade intestinal para uma variedade de substâncias que incluem endotoxinas bacterianas, tais com o lipopolissacarídeo (LPS). Este LPS 'sensibiliza' as células de Kupffer através da ligação com o receptor CD14. Esta ligação ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B) que, por sua vez, leva a transcrição exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Tais fatores irão contribuir para à inflamação, apoptose e fibrose, com a consequente progressão da doença (ORMAN et al., 2013).

1.3 Etanol

1.3.1 Aspectos Gerais

O etanol (CH₃CH₂OH), também chamado álcool etílico e, na linguagem corrente, simplesmente álcool, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução a acetaldeído (SOLOMONS & FRYHLE, 2012).

Após administração oral, o etanol é rapidamente absorvido para corrente sanguínea a partir do estômago e intestino delgado. Níveis sanguíneos máximos ocorrem 30-90min após sua ingestão quando o estômago está vazio. Atrasos no esvaziamento gástrico (devido à presença de alimentos) atrasam a absorção do etanol, uma vez que a absorção ocorre mais rapidamente a partir do intestino delgado do que a partir do estômago (Figura 5 B). Uma vez absorvido, o álcool é transportado para o fígado através da veia portal. Uma porção do álcool ingerido é metabolizada durante a sua passagem inicial através do fígado, o restante do álcool ingerido deixa o fígado, entra na circulação sistêmica, e é distribuída ao longo dos tecidos do corpo (Figura 5 A) (CRABB et al., 2007; ZAKHARI, 2006; WEATHERMON & CRABB, 1999).

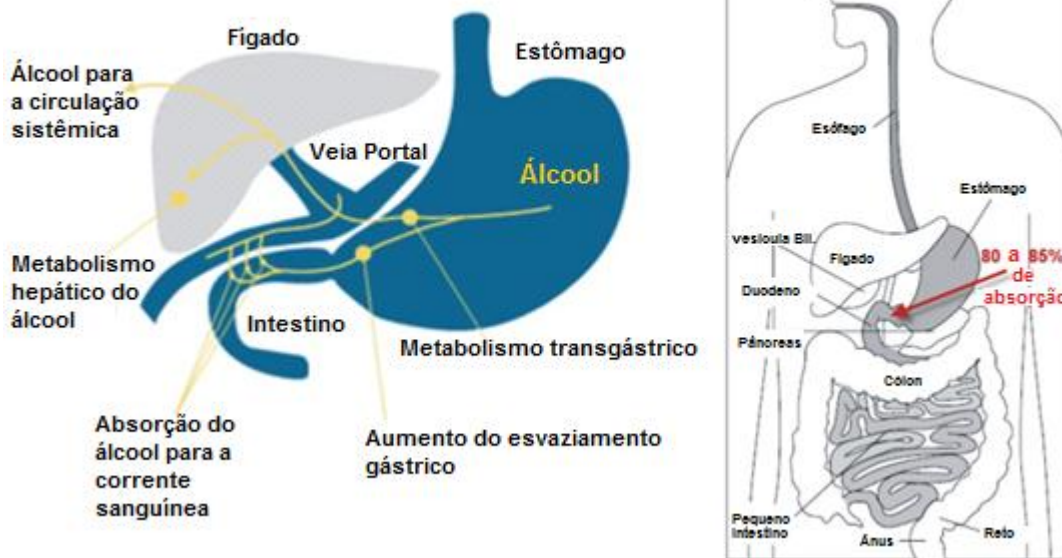


Figura 5. A - Representação esquemática do metabolismo de primeira passagem do etanol pelo fígado. B - Locais de absorção do álcool no corpo (regiões escuras na imagem) – (HEAD, 2011).

1.3.2 Metabolismo

O primeiro passo no metabolismo oxidativo do álcool é efetuado por enzimas-chave, incluindo a álcool desidrogenase (ADH), citocromo P450 2E1 (CYP2E1), e a catalase. A ADH é a principal enzima oxidante, tendo uma elevada afinidade pelo álcool e quebra o etanol no citoplasma. A CYP2E1 é utilizada por uma via diferente que é induzida pelo consumo crônico do álcool, e resulta na formação de acetaldeído nos peroxissomos. Uma terceira via do primeiro passo do metabolismo do etanol é mediada pela oxidação do etanol pela catalase nos microssomos (CEDERBAUM, 2013).

O segundo passo, que é principalmente realizado pela aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH), é metabolizar o acetaldeído para acetato. Além disso, o acetaldeído pode ser metabolizado pela CYP2E1 através de uma via dependente de NADPH (sistema microssomal de oxidação do etanol) (Figura 6) (CRABB et al., 2007). O acetato resultante é instável e espontaneamente se decompõe-se em água e CO₂. Falhas ou reduções nos mecanismos oxidativos do etanol, fazem com que o acetaldeído se acumule e exerça seus efeitos tóxicos. A natureza eletrofílica do acetaldeído permite que ele se ligue e forme adutos, isto é, produtos químicos de ligação covalente, com proteínas, lipídeos e DNA. Adutos são amplamente patogênicos, pois prejudicam as

promovem danos e mutação ao DNA (SETSHEDI et

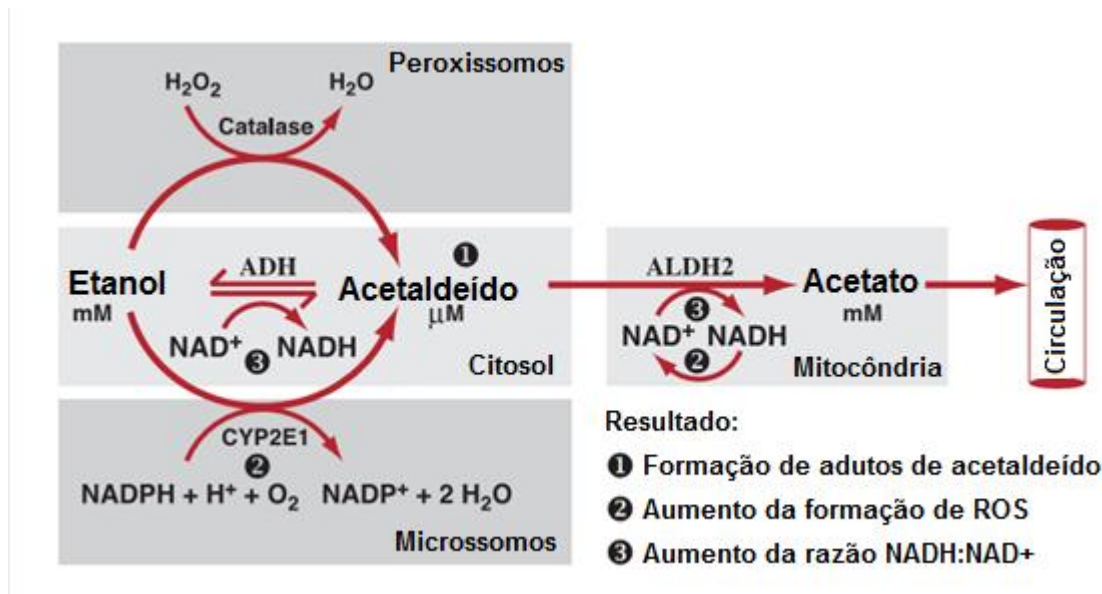


Figura 6. – Vias oxidativas do metabolismo do etanol no fígado (ZAKHARI, 2006).

O álcool e seu metabolismo causam alterações na capacidade do fígado em eliminar várias substâncias a partir do corpo. Assim, o metabolismo do álcool, afeta o estado redox do fígado e os níveis de glutathione, um antioxidante que impede que espécies reativas de oxigênio (ROS) danifiquem as células. O termo "estado redox" refere-se às concentrações de duas substâncias nas células: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e NAD⁺ reduzido (NADH), que são necessários para o funcionamento de várias enzimas. O metabolismo do álcool pela ADH resulta na conversão de NAD⁺ em NADH, aumentando assim os níveis de NADH do fígado. Níveis elevados de NADH, por sua vez, estimulam a geração de moléculas de gordura e interferem com a capacidade de outras enzimas hepáticas em quebrar moléculas de gordura e produzir glicose. Por meio destas alterações metabólicas, o metabolismo do álcool pode afetar substancialmente o metabolismo geral do corpo e seu funcionamento (CEDERBAUM, 2013; GAO & BATALLER, 2011; WEATHERMON & CRABB, 1999).

1.4 NF-kB

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) foi identificado por David Baltimore, em 1986 como um fator que no núcleo se liga ao promotor da cadeia

B (SEN & BALTIMORE, 1986). Sabe-se hoje, que o NF- κ B está presente no citoplasma de todas as células de mamíferos (AHN & AGGARWAL, 2005).

Os cinco membros da família do NF- κ B em mamíferos: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-B1), e p52/p100 (NF-B2), existem em células não estimuladas como homo ou heterodímeros ligados às família de proteínas inibitórias kappa B (I κ Bs). As proteínas NF- κ B são caracterizadas pela presença conservada de uma porção N - terminal com cerca de 300 aminoácidos, o domínio de homologia Rel, que é responsável pela dimerização, interação com I κ Bs, e ligação ao DNA. A ligação às I κ Bs impede o complexo NF- κ B:I κ B de se translocar para o núcleo, mantendo assim o NF- κ B em um estado inativo (HAYDEN & GHOSH, 2012).

A ativação da cascata de sinalização do NF- κ B resulta na degradação completa da I κ B, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo, onde ele induz a transcrição. O NF- κ B ativado liga-se a sequências específicas de genes no DNA, designadas como elementos κ B, e regula a transcrição de mais de 400 genes envolvidos na imunorregulação, regulação do crescimento, inflamação, carcinogênese e apoptose (Figura 7) (DIAMANT & DIKSTEIN, 2013).

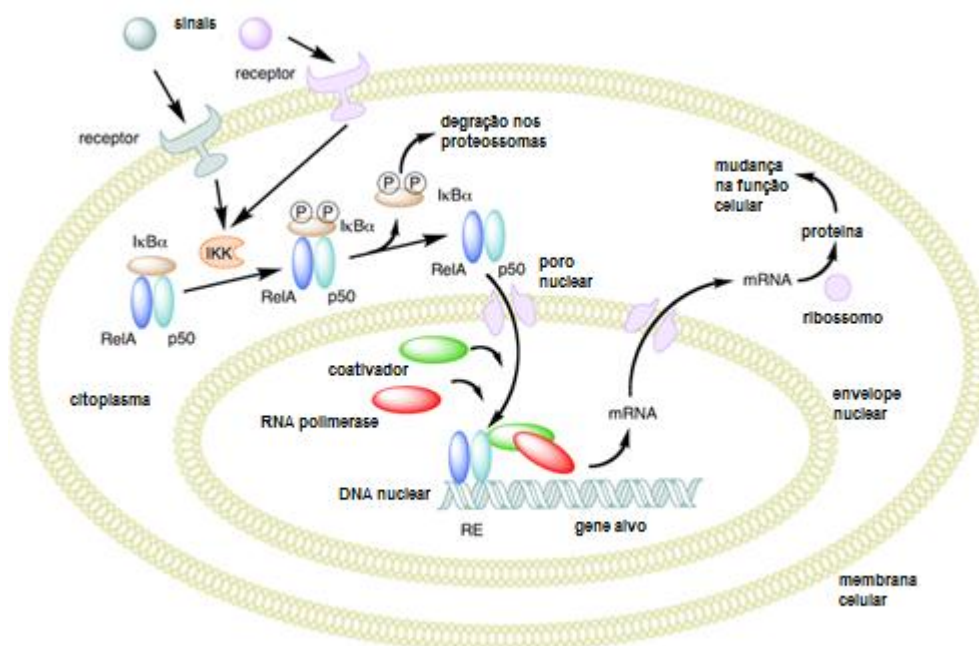


Figura 7. Via de ativação do NF- κ B (PRAJAPATI et al., 2010).

NF- κ B, desempenha papel crucial em um elaborado processo fundamental para a sobrevivência. Grande número de estímulos externos levam à ativação do NF- κ B e os genes cuja expressão é regulada por ele, tendo função relevante nas respostas imunológicas e ao estresse, e os processos de impacto tais como a apoptose, proliferação, desenvolvimento e diferenciação (OECKINGHAUS et al., 2011).

As infecções bacterianas e virais (por exemplo, através do reconhecimento de produtos microbianos por receptores tais como os receptores Toll-like), citocinas inflamatórias e ligação de antígenos a receptores, podem levar à ativação do NF- κ B, confirmando seu papel crucial nas respostas imune inata e adaptativa. Além disso, a ativação do NF- κ B pode ser induzida por estresse físico (UV ou irradiação- γ), fisiológico (isquemia e choque hiperosmótico), ou oxidativo (NAPETSCHNIG & WU, 2013).

Processos inflamatórios são controlados através da transcrição dependente do NF- κ B de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, fatores da cascata do complemento, e proteínas de fase aguda. A lista de genes alvo κ B-dependentes pode ainda ser estendida para reguladores da apoptose (antiapoptóticos membros da família Bcl e proteínas inibidoras da apoptose / IAPs) e proliferação (ciclina e fatores de crescimento), substanciando dessa forma seu papel no crescimento celular, proliferação e sobrevivência (LAWRENCE, 2009).

Dessa forma, a ativação aberrante do NF- κ B tem sido associada em algumas doenças tais como o câncer, doenças auto-imunes, neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, e outras. Além disso, desempenha papel crucial na progressão de doenças inflamatórias crônicas, onde dirige a produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e recrutamento de macrófagos e neutrófilos para os sítios inflamatórios (HOESEL & SCHMID, 2013).

1.5 Citocinas

1.5.1 TNF- α

alpha (TNF- α) é uma superfamília, composta de 19 membros, sem exceção, apresentam atividade pró-inflamatória (AGGARWAL et al., 2012).

O TNF- α é produzido por diversos tipos celulares, tais como mastócitos, linfócitos T e B e células endoteliais. No fígado, o TNF- α é produzido principalmente por células deKupffer, sendo um importante mediador em vários processos fisiológicos, tais como inflamação, proliferação celular e a apoptose (BRADLEY, 2008).

Com o consumo de crônico de álcool, as células deKupffer exibem maior sensibilidade à produção de TNF- α estimulada pela ativação do NF-kB (via LPS). Níveis séricos elevados de TNF- α têm sido relatados em pacientes com DHA e estão correlacionados à gravidade da doença (MANDREKAR & SZABO, 2009).

1.5.2 IL-1 β

A interleucina 1 (IL-1) é uma potente citocina pró-inflamatória, compondo uma família de 11 membros, onde a IL-1 β é a citocina mais estudada da família, desempenhando uma função na defesa do organismo contra infecções por microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus (DINARELLO, 2011).

Porém, além do seu papel fisiológico na proteção do organismo, a IL-1 β é conhecida por ter papel importante do desenvolvimento de doenças inflamatórias graves, como também em doenças comuns, como a gota, a diabetes de tipo II e o cancro (KRAUSE et al., 2012).

Em pacientes com DHA, os níveis de IL-1 β estão significativamente aumentados no fígado e no soro. A IL-1 β é produzida em resposta à ativação do NF-kB, desempenhando papel crítico no processo inflamatório induzido pelo álcool (PETRASEK et al., 2012).

1.5.3 IL-10

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que controla a produção de mediadores pró-inflamatórios e co-estimuladores críticos para o processo inflamatório (MU et al., 2005). A IL-10 é produzida por macrófagos, linfócitos e células

...ado a principal fonte de IL-10. A IL-10 reduz a produção de citocinas inflamatórias tais como o TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6, a partir de macrófagos ou monócitos ativados. Ademais, a IL-10 possui um efeito hepatoprotetor na proliferação e fibrose (ZHANG & WANG, 2006).

Camundongos *knockout* para IL-10 que receberam álcool apresentaram aumento da condição inflamatória hepática e sistêmica. Como também, a lesão do fígado induzida pelo LPS foi mais acentuada em comparação com camundongos selvagens (MILLER et al., 2011).

1.5.4 IL-17

A interleucina-17 é uma citocina descrita como um produto principalmente de células T, porém também expressas por eosinófilos, neutrófilos e monócitos. A IL-17 estimula células hepáticas não parenquimatosas a produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, semelhante ao TNF- α , porém em menor intensidade. Além disso, o IL-17 pode atuar com outras citocinas na ativação do NF- κ B (LAFDIL et al., 2010).

Tem sido demonstrado que pacientes com DHA apresentam níveis plasmáticos mais elevados de IL-17 em comparação com indivíduos saudáveis (LEMMERS et al., 2009).

1.5.5 IFN- γ

Os interferons são uma família de proteínas que influenciam uma ampla variedade de respostas biológicas, incluindo proteção contra infecções virais e bacterianas, efeitos anti-tumorais e regulação de células efetoras em ambas as respostas imune inata e adaptativa. Secretado principalmente por células T e células Natural Killer e, em menor grau, por outros tipos celulares tais como macrófagos, células dendríticas e células B, o IFN- γ modula a resposta imune (POLLARD et al., 2013).

No entanto, embora a sinalização do IFN- γ seja crítica para a geração de funções efetoras contra células tumorais e eliminação de microrganismos patogênicos, a sinalização tem de ser cuidadosamente regulada para evitar inflamação excessiva e doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LARKIN et al., 2013).

Dessa forma, a ativação de macrófagos pelo IFN- γ desempenha um papel fundamental na progressão da inflamação, pela indução de fatores inflamatórios, tais

óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) (MÜHL & LUSO, 2004). Além disso, o IFN- γ amplifica as respostas celulares induzidas por LPS (SCHRODER et al., 2004), sendo observado níveis circulantes elevados do IFN- γ em ratos que receberam álcool (MANDREKAR & SZABO, 2009).

1.5.6 TGF- β

O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é uma superfamília de fatores secretados composta por mais de 30 membros. A sinalização do TGF- β regula diversos processos celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose e a migração (WEISS & ATTISANO, 2013).

Além do seu papel fisiológico, o TGF- β é um regulador central de várias doenças hepáticas crônicas contribuindo para todas as fases de sua progressão. Níveis elevados de TGF- β aumentam a morte de hepatócitos e também estimulam as células estreladas hepáticas a se diferenciar em fibroblastos, resultando em uma resposta de cicatrização, pela produção de colágeno e deposição de matriz extracelular (Zhang, et al., 2014).

Ciucane e colaboradores (2010) demonstraram que a ativação do TGF- β pelo álcool promoveu esteatose e dano aos hepatócitos. Estudos comprovam o envolvimento da sinalização fibrogênica do TGF- β na lesão hepática induzida pelo álcool (GERJEVIC et al., 2012; SIEGMUND et al., 2005).

1.6 Enzimas

1.6.1 AMPK

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) é uma quinase de serina / treonina, que funciona como um sensor central do estado energético da célula (HARDIE, 2011). O AMPK é ativado pela exaustão de adenosina trifosfato (ATP), o que provoca um aumento da razão AMP (adenosina monofosfato) / ATP. Uma vez ativado, o AMPK ativa vias catabólicas para produzir ATP, enquanto, simultaneamente, encerra processos anabólicos consumidores de energia (LEE & KIM, 2013).

Um papel importante da sinalização do AMPK é responder às exigências metabólicas ou ainda, estimular a produção de energia, incluindo o catabolismo de glicose e de lipídios ou inibindo vias que consomem energia, como a síntese de proteínas, ácidos graxos e colesterol. Atividade diminuída do AMPK pode induzir a

vidos. Dessa forma, a deficiência na sinalização do sistema de defesa do organismo contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica, incluindo a obesidade, a diabetes e as doenças cardiovasculares (STEINBERG&KEMP, 2009).

Há uma extensa literatura que descreve como a ativação do AMPK pode inibir a resposta inflamatória induzida por diferentes insultos estimulantes enquanto que um decréscimo na sua atividade está associado com o aumento da inflamação. Vários estudos têm demonstrado que a ativação do AMPK pelo AICAR (análogo sintético e indutor do AMPK) pode inibir, por exemplo, a doença inflamatória intestinal (BAI et al., 2010), a inflamação na fibrose cística (MYERBURG et al., 2010), e a inflamação pulmonar (HOOGENDIJK et al., 2013). Além disso, tem sido constatado, que o AMPK pode suprimir a ativação do NF- κ B e sua sinalização pró-inflamatória, como também a COX-2 (GUO et al., 2014; SALMINEN et al., 2011; YI et al., 2011).

1.6.2 COX-2

A ciclooxigenase é uma enzima que possui duas isoformas a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos, catalisando prostaglandinas que medeiam funções fisiológicas tais como a citoproteção da mucosa gástrica, a regulação do fluxo sanguíneo renal e a agregação de plaquetas (ZARGHI & ARFAEI, 2011).

A COX-2 é uma enzima citoplasmática que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Um de seus produtos principais, a prostaglandina E₂ (PGE₂) é um importante mediador inflamatório, participando de processos biológicos diversos, incluindo o desenvolvimento da dor, imunidade, angiogênese e câncer (STASINOPOULOS et al., 2013).

Presente em pequenas concentrações em condições basais na maioria dos tecidos normais, a COX-2 tem sua expressão é rapidamente induzida por estímulos, tais como as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), lipopolissacarídeos, fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos, FGF, o fator de crescimento derivado de plaquetas, PDGF), hormônios (hormônio luteinizante, LH) e fatores de transcrição (NF- κ B) resultando num aumento da síntese de prostaglandinas em tecidos inflamados e neoplásicos (LEE et al., 2011; ZARGHI & ARFAEI, 2011).

1.6.3 iNOS

produzido por três diferentes formas da óxido nítrico-
OS1), aeNOS (ou NOS3) e a iNOS (ou NOS2). As
duas primeiras isoformas são constitutivas e existem na forma de proteínas pré-formadas
que produzem uma pequena quantidade de NO após a elevação da concentração de
cálcio intracelular, enquanto que a terceira pode produzir uma grande quantidade de
NO. Devido à grande diferença na quantidade de NO produzido, tem sido geralmente
assumido que a nNOS e eNOS são críticas para fisiologia normal, enquanto que a iNOS
está associada com a lesão e o processo inflamatório (KOBAYASHI, 2010).

Expressa em diversos tipos celulares, tais como macrófagos, neutrófilos, células
endoteliais e epiteliais, a iNOS é ativada em processos inflamatórios em resposta ao LPS
e citocinas (TNF α e IFN- γ), como também por fatores de transcrição como o NF-kB,
Stat-1 e AP-1 (GUO et al., 2012).

O óxido nítrico produzido em elevadas concentrações pela iNOS é capaz de
promover danos ao DNA, levando à morte celular e efeitos tóxicos (HUGHES et al.,
2009). Além disso, o NO produzido pela iNOS parece ter papel preponderante em
determinados processos inflamatórios, como o estudo de McKime colaboradores (2003)
que observaram a ausência de inflamação em camundongos *knockout* para o gene da
iNOS em modelo de inflamação hepática induzida por álcool.

1.7 Dietilcarbamazina

A dietilcarbamazina (DEC) é um derivado da piperazina sintetizada como 1-
dietilcarbamil-4-metilpiperazina e preparada na forma de cloridrato, citrato ou fosfato
(Figura 8). A partir de 1950, foi distribuída como sal citratado por inúmeras companhias
farmacêuticas sob diferentes nomes, como Hetrazan, Banocide, Caricide, Carbilazine,
entre outros. 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).

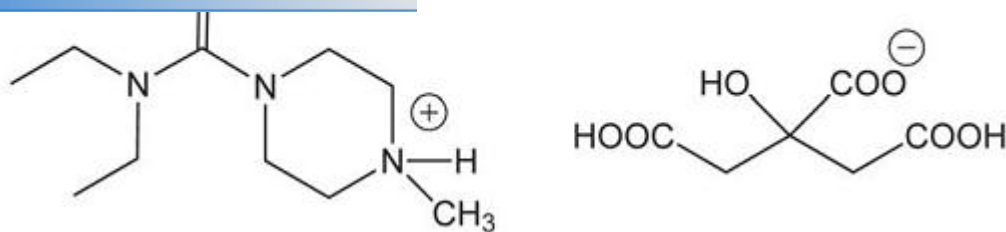


Figura 8. Citrato de dietilcarbamazina (WEAVER et al., 2011).

A DEC é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e atinge o pico da sua concentração plasmática entre uma e três horas após a ingestão e está quase ausente na urina, plasma e saliva de humanos após 24h da ingestão (ILONDU et al., 2000). Horii e Aoki (1997) descreveram o nível plasmático de DEC em ratos após a administração de 200mg/kg, registrando valores de 30µg/ml após 30-60 min da injeção, decrescendo rapidamente para 1,5 µg/ml após 4h e atingindo 0,1µg/ml após 8h do tratamento.

Devido a sua ação microfilaricida eficaz e macrofilaricida parcialmente eficaz (PEIXOTO & SILVA, 2014), a DEC é utilizada como tratamento padrão para filariose linfática desde meados de 1940. Sendo o regime de tratamento recomendado consistindo de um curso de 12 dias de tratamento com DEC (OTTESEN et al., 2008).

Apesar de mais de 50 anos de uso, o seu mecanismo de ação exato ainda não está claro (MCGARRY et al., 2005). No entanto, sabe-se que ela interfere no metabolismo do ácido araquidônico, o que lhe confere propriedades anti-inflamatórias devido sua interferência com as vias da ciclooxygenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (PEIXOTO & SILVA, 2014).

Recentemente, estudos realizados em colaboração com o nosso laboratório demonstraram 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 e o acúmulo de eosinófilos, bem como a eosinofiloiose *in vivo* e *in vitro* através de mecanismos iNOS/CD95 (QUETO et al., 2010).

Além disso, resultados obtidos em nosso laboratório, indicam que a DEC atua reduzindo os níveis de mediadores inflamatórios em modelo de inflamação pulmonar

ém de atuar como um fármaco hepatoprotetor, indongos desnutridos (ROCHA et al., 2012).

1.8 Celecoxibe

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são amplamente utilizados para o tratamento sintomático de doenças inflamatórias agudas e crônicas e dor. Os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos e também efeitos antitumorais baseiam-se na inibição das enzimas ciclooxigenase (COX), que convertem o ácido araquidônico a prostaglandinas (POUNTOS & GIANNOUDIS, 2011).

Essa classe heterogênea de fármacos inclui a aspirina e vários outros agentes inibidores da ciclooxigenase (COX), seletivos ou não. Os AINEs não seletivos são os mais antigos, e designados como tradicionais ou convencionais. Os AINEs seletivos para a COX-2 são designados COXIBEs (BATLOUNI, 2009).

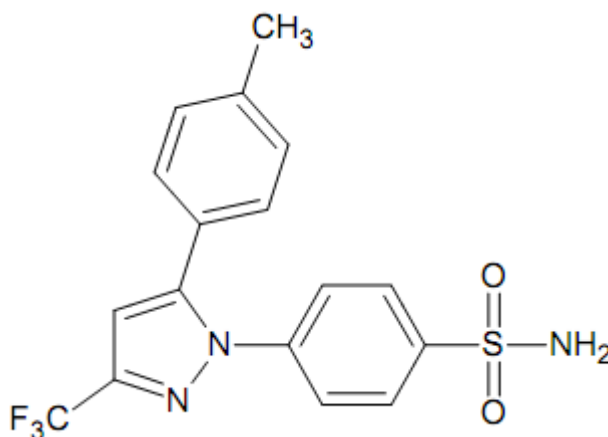


Figura 9. Estrutura do Celecoxibe(KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013).

Pertencente a classe dos AINES, o celecoxibe foi o primeiro inibidor seletivo da ciclooxigenase 2 lançado no mundo e também no Brasil (1999). Além de anti-inflamatório, possui ações analgésica e antipirética. Mais recentemente, o celecoxibe tem sido associado na redução de alguns tumores (BIENIEK et al., 2014; CHU et al., 2014; LIU et al., 2014). Como todos os AINEs, seu mecanismo de ação é realizado em relação à biossíntese de prostaglandinas (PGs) tanto *in vivo* como *in vitro*, porém sua característica distintiva é a atividade bloqueadora ou inibitória seletiva sobre a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), sem afetar a ciclooxigenase-1 (COX-1) (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013).

de Amônio

O ácido pirrolidinaditiocarbamato de amônio (PDTC) é um sal cristalino branco, com o ponto de fusão de 144-155 °C, de baixa toxicidade, e solúvel em água (18,9 g/100 ml a 20 °C) (LIAO et al., 2011).

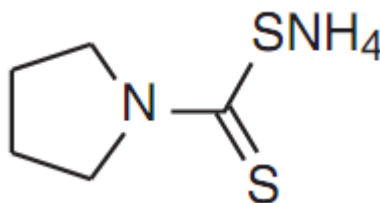


Figura 10. Estrutura do PDTC (LIAO et al., 2011).

Os ditiocarbamatos são compostos quelantes de metais, além de potentes antioxidantes (FUJIHARA et al., 2007; SONG et al., 2011). O PDTC tem sido amplamente utilizado como potente inibidor do NF-κB. O mecanismo exato pelo qual o PDTC exerce esse efeito, ainda não está claro. As hipóteses mais aceitas é que o PDTC poderia impedir diretamente a degradação da subunidade IκB ou ainda, poderia atuar através das suas propriedades antioxidantes, inibindo o conhecido efeito estimulante do estresse oxidativo sobre o NF-κB (ZHAI et al., 2012).

Hagar (2009) observou a redução de marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo induzido pelo LPS em fígado de ratos. Assim, a inibição específica do NF-κB, além dos efeitos de antioxidantes dos ditiocarbamatos, sugere que estes agentes possam oferecer benefícios terapêuticos em condições inflamatórias agudas e crônicas em que a ativação do NF-κB, desempenha um papel importante (CUZZOCREA et al., 2002).

ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 10 Suppl 2, p. S2, 2008.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Review article Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily : 25 years later , a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651–665, 2012.

AHN, K. S.; AGGARWAL, B. B. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1056, p. 218–33, 2005.

AMBADE, A.; MANDREKAR, P. Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. **International journal of hepatology**, v. 2012, p. 853175, 2012.

AYALASOMAYAJULA, S. P.; KOMPELLA, U. B. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model. **European journal of pharmacology**, v. 458, n. 3, p. 283–9, 2003.

BAI, A.; YONG, M.; MA, A. G.; et al. Novel Anti-Inflammatory Action of 5-Aminoimidazole-4- carboxamide Ribonucleoside with Protective Effect in Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute and Chronic Colitis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 333, n. 3, p. 717–725, 2010.

BATLOUNI, M. Review Article Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs : Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 522–529, 2009.

BEERS, M.H.; BERKOW, R. **Manual Merck: Diagnóstico e Tratamento** 17. Edição Centenária. 17. ed., São Paulo: Roca; p. 478, 2001.

BIENIEK, J.; CHILDRESS, C.; SWATSKI, M. D.; et al. COX-2 inhibitors arrest prostate cancer cell cycle progression by down-regulation of kinetochore/centromere proteins. **Prostate**, v. 74, n. 10, p. 999-1011, 2014.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, p. 149–160, 2008.

BRUHA, R.; DVORAK, K.; PETRTYL, J. Alcoholic liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 3, 2012.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J.-C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. **The FEBS journal**, v. 277, n. 1, p. 2–21, 2010.

- J. Expression of cyclooxygenase - 2 and its
tly liver disease. **Journal of Nanjing Medical
University**, v. 22, n. 2, p. 111–116, 2008.
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 4, p. 667–685, 2013.
- CHU, T. H.; CHAN, H. H.; KUO, H. M.; et al. Celecoxib suppresses hepatoma stemness and progression by up-regulating PTEN. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1475-90, 2014.
- CIUCLAN, L.; EHNERT, S.; ILKAVETS, I.; et al. TGF-beta enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. **Journal of hepatology**, v. 52, n. 3, p. 407–16, 2010.
- COOK, R. T.; ZHU, X.; COLEMAN, R. A.; et al. T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. **Alcohol**, v. 33, n. 3, p. 175–81, 2004.
- CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 01, p. 49–63, 2007.
- CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 2, p. 496–510, 2002.
- DHILLON, S. S.; MASTROPAOLO, L. A.; MURCHIE, R.; et al. Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. **Clinical and translational gastroenterology**, v. 5, n. November 2013, p. e46, 2014.
- DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional Control by NF-κB: Elongation in Focus. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, n. 9, p. 937-45, 2013.
- DINARELLO, C. A. Review article Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.
- DOOLEY, S.; TEN DIJKE, P. TGF-β in progression of liver disease. **Cell and Tissue research**, v. 347, n. 1, p. 245–56, 2012.
- DREYER, G.; NORÕES, J. Dietilcarbamazina no Tratamento da Filariose Bancroftiana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 229- 240, 1997.
- FUJIHARA, C. K.; ANTUNES, G. R.; MATTAR, A. L.; et al. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. **American journal of physiology, renal physiology**, v. 292, n. 1, p. F92–9, 2007.

GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1572–85, 2011.

GAO, B.; SEKI, E.; BRENNER, D. A.; et al. Innate immunity in alcoholic liver disease. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, n. 34, p. 516–525, 2011.

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

GERJEVIC, L. N.; LIU, N.; LU, S.; HARRISON-FINDIK, D. D. Alcohol Activates TGF-Beta but Inhibits BMP Receptor-Mediated Smad Signaling and Smad4 Binding to Hepcidin Promoter in the Liver. **International journal of hepatology**, v. 2012, p. 459278, 2012.

GRAMENZI, A; CAPUTO, F.; BISELLI, M.; et al. Review article: alcoholic liver disease--pathophysiological aspects and risk factors. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 24, n. 8, p. 1151–61, 2006.

GU, J.-W.; YOUNG, E.; BUSBY, B.; COVINGTON, J.; JOHNSON, J. W. Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 6, p. 514–21, 2009.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; HONG, K.; et al. AMPK inhibition blocks ROS-NFκB signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86881, 2014.

GUO, Z.; SHAO, L.; ZHENG, L.; et al. miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 15, p. 5826–31, 2012.

HAGAR, H. H. An insight into the possible protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and acute hepatic injury in rats. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 17, n. 4, p. 259–67, 2009. King Saud University.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase — an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes & Development**, p. 1895–1908, 2011.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 203–34, 2012.

HEAD, W. C. **Georgia DUI Alcohol Metabolism Rate (2011)**. Disponível em: <<http://www.absolutely-not-guilty.com/georgiaduialcoholmetabolismrate.html>>. Acesso: 30 julho 2014.

ER, R.; et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Chemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 4, p. 880–91, 2007.

HIROI, M.; SAKAEDA, Y.; YAMAGUCHI, H.; OHMORI, Y. Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription. **Mediators of inflammation**, v. 2013, p. 369693, 2013.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013. Molecular Cancer.

HOOGENDIJK, A. J.; PINHANÇOS, S. S.; VAN DER POLL, T.; WIELAND, C. W. AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) reduces lipoteichoic acid-induced lung inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 10, p. 7047–52, 2013.

HORII, Y.; AOKI, Y. Plasma levels of diethylcarbamazine and their effects on implanted microfilariae of *Brugia pahangi* in rats. **Journal of veterinary medical science**, v. 59, p. 961-963, 1997.

HUGHES, K. J.; MEARES, G. P.; CHAMBERS, K. T.; CORBETT, J. A. Repair of nitric oxide-damaged DNA in beta-cells requires JNK-dependent GADD45alpha expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27402–8, 2009.

ILONDU, N.; ORISAKWE, O. E.; OFOEFULE, S. I.; et al. Pharmacokinetics of diethylcarbamazine: Prediction by concentration in saliva. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 443-445, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.524, 2013.

KOBAYASHI, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 6, p. 1157–62, 2010.

KRAUSE, K.; METZ, M.; MAKRI, M.; ZUBERBIER, T.; MAURER, M. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 12, n. 5, p. 477–84, 2012.

KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G.; COŞKUN, İ.; AYDIN, S.; et al. Synthesis and characterization of celecoxib derivatives as possible anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer and anti-HCV agents. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3595–614, 2013.

LAFDIL, F.; MILLER, A. M.; KI, S. H.; GAO, B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. **Cellular & molecular immunology**, Jul. 2010.

LARKIN, J.; AHMED, C. M.; WILSON, T. D.; JOHNSON, H. M. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. December, p. 469, 2013.

for NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 74, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEE, S.; SHIN, S.; KIM, H.; et al. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 16, 2011.

LEE, Y.; KIM, E.-K. AMP-activated protein kinase as a key molecular link between metabolism and clockwork. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 7, p. e33, 2013.

LEMMERS, A.; MORENO, C.; GUSTOT, T.; et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 646–57, 2009.

LI, J.; MCCULLOUGH, L. D. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 3, p. 480–92, 2010.

LI, X.; GAO, L.; CUI, Q.; et al. Sulindac inhibits tumor cell invasion by suppressing NF- κ B mediated transcription of microRNAs. **Oncogene**, v. 31, n. 48, p. 4979–4986, 2013.

LIAO, Q.-Q.; YUE, Z.-W.; YANG, D.; et al. Self-assembled monolayer of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on copper detected using electrochemical methods, surface enhanced Raman scattering and quantum chemistry calculations. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 19, p. 6492–6498, 2011.

LIU, M.; LI, C. M.; CHEN, Z.F.; et al. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 6, p. 1451–1458, 2014.

MANDREKAR, P.; SZABO, G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1258–1266, 2009.

MCCLAIN, C. J.; HILL, D. B.; SONG, Z.; DEACIUC, I.; BARVE, S. Monocyte activation in alcoholic liver disease. **Alcohol**, v. 27, n. 1, p. 53–61, 2002.

MCGARRY, H. F.; PLANT, L. D.; TAYLOR, M. J. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. **Filaria journal**, v. 4, p. 4, 2005.

MCKIM, S. E.; GÄBELE, E.; ISAYAMA, F.; et al. Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1834–1844, 2003.

MILLER, A. M.; WANG, H.; BERTOLA, A.; et al. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 846–56, 2011.

f constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 4, p. 350–354, 2004.

MOLYNEUX, D. H.; BRADLEY, M.; HOERAUF, A.; KYELEM, D.; TAYLOR, M. J. Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 516–522, 2003.

MU, W.; OUYANG, X.; AGARWAL, A.; et al. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 16, n. 12, p. 3651–60, 2005.

MÜHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1247–55, 2003.

MULLER, D. N.; HEISSMEYER, V.; DECHEND, R.; et al. Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 10, p. 1822–4, 2001.

MYERBURG, M. M.; KING, J. D.; OYSTER, N. M.; et al. AMPK Agonists Ameliorate Sodium and Fluid Transport and Inflammation in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 6, p. 676–684, 2010.

NAPETSCHNIG, J.; WU, H. Molecular Basis of NF-κB Signaling. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, p. 443–468, 2013.

NGUYEN, V.-A.; GAO, B. Expression of interferon alfa signaling components in human alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 425–32, 2002.

O'SHEA, R. S.; DASARATHY, S.; MCCULLOUGH, A. J. Alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 307–28, 2010.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011.

ORMAN, E. S.; ODENA, G.; BATALLER, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28 Suppl 1, p. 77–84, 2013.

OTTESEN, E. A.; HOOPER, P. J.; BRADLEY, M.; BISWAS, G. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. e317, 2008.

PEIXOTO, C. A.; SILVA, B. S. Anti-inflammatory effects of diethylcarbamazine: A review. **European journal of pharmacology**, v. 734C, p. 35–41, 2014.

Li, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates steatohepatitis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, 2012.

POLLARD, K. M.; CAUVI, D. M.; TOOMEY, C. B.; et al. Interferon- γ and systemic autoimmunity. **Discovery Medicine**, v. 16, n. 87, p. 123-131, 2013.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v. 3, p. 19–27, 2011.

PRAJAPATI, B.; SINGHAL, M.; SHARMA, G. N.; GUPTA, V. Review Article Role of NF κ B in Various Immunological & Inflammatory Disorders. **International Journal of Toxicological and Pharmacological Research**, v. 2, n. 1, p. 35–39, 2010.

QUETO, T.; XAVIER, P.; GARDEL, M. A.; et al. Inducible Nitric Oxide Synthase/CD95L-dependent Suppression of Pulmonary and Bone Marrow Eosinophilia by Diethylcarbamazine. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 5, p. 429-437, 2010.

RAMESH, S.; QI, X.-J.; WILDEY, G. M.; et al. TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. **EMBO reports**, v. 9, n. 10, p. 990–7, 2008.

RAO, R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 50, n. 2, p. 638–44, 2009.

RIBEIRO, E. L.; BARBOSA, K. P. D. S.; FRAGOSO, I. T.; et al. Diethylcarbamazine attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2014, n. 1986, p. 105120, 2014.

ROCHA, S. W. S.; SANTOS, A. C. O. DOS; SILVA, B. D. S.; et al. Effects of Diethylcarbamazine (DEC) on Hepatocytes of c57bl / 6j Mice Submitted to Protein Malnutrition. **Journal of Food And Drug Analysis**, v. 20, n. 2, p. 524–531, 2012.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 7, p. 667–76, 2011.

SANCHEZ BRUNI, S. F.; JONES, D. G.; MCKELLAR, Q. A. Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 443–57, 2006.

SARAIVA, K. L. A.; SILVA, V. A. J.; DIAS, E. S. F.; PEIXOTO, C. A. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. **Reproductive toxicology**, v. 22, n. 4, p. 754–9, 2006.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.

...e nuclear factors interact with the immunoglobulin
05-716, 1986.

SETSHEDI, M.; WANDS, J. R.; MONTE, S. M. D. LA. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 3, p. 178–85, 2010.

SID, B.; VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 2, p. 200–9, 2013.

SIEGMUND, S. V; DOOLEY, S.; BRENNER, D. A. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. **Digestive diseases**, v. 23, n. 3-4, p. 264–74, 2005.

SMARTT, H. J. M.; ELDER, D. J. E.; HICKS, D. J.; WILLIAMS, N. A; PARASKEVA, C. Increased NF-kappaB DNA binding but not transcriptional activity during apoptosis induced by the COX-2-selective inhibitor NS-398 in colorectal carcinoma cells. **British journal of cancer**, v. 89, n. 7, p. 1358–65, 2003.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 10. ed., Rio de Janeiro: LTC; p. 789, 2012.

SONG, S.; KOLE, S.; PRECHT, P.; PAZIN, M. J.; BERNIER, M. Activation of heat shock factor 1 plays a role in pyrrolidine dithiocarbamate-mediated expression of the co-chaperone BAG3. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 11, p. 1856–1863, 2011.

STASINOPOULOS, I.; SHAH, T.; PENET, M.; KRISHNAMACHARY, B.; BHUJWALLA, Z. M. COX-2 in cancer : Gordian knot or Achilles heel ?. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. March, p. 1–7, 2013.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1025-1078, 2009.

SVEGLIATI-BARONI, G.; INAGAKI, Y.; RINCON-SANCHEZ, A.R.; et al. Early response of alpha2(I) collagen to acetaldehyde in human hepatic stellate cells is TGF-beta independent. **Hepatology**, v. 42, p.343-352, 2005.

TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. **FASEB journal**, v. 15, n. 12, p. 2057–72, 2001.

TOME, S.; LUCEY, M. R. Review article: current management of alcoholic liver disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 19, n. 7, p. 707–14, 2004.

VARGAS, D.; SOARES, J. Publicações de enfermeiros sobre álcool e alcoolismo em anais do Congresso Brasileiro de Enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 66, n. 3, p. 313-20, 2013.

WATSON, R. R.; PREDDY, V. R.; ZIBADI, S. **Alcohol, Nutrition, and Health Consequences**. Totowa, NJ: Humana Press; p. 18, 2013.

V. Alcohol and medication interactions. **Alcohol** 40-54, 1999.

WEAVER, A.; BROWN, P.; HUEY, S.; et al. A low-tech analytical method for diethylcarbamazine citrate in medicated salt. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 2, p. e1005, 2011.

WEISS, A.; ATTISANO, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 2, n. 1, p. 47-63, 2013.

WHO (World Health Organization). **Alcohol. Fact sheet N°349 May 2014.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/>>. Acesso: 30 Julho 2014.

WILLENBRI, M. L. Helping Patients Who Drink Too Much: An Evidence-Based Guide for Primary Care Physicians. **American Family Physician**, v. 80, n. 1, p. 44–50, 2009.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 29, p. 141-154, 2009.

YI, C.-O.; JEON, B. T.; SHIN, H. J.; et al. Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF-κB-dependent COX-2 activation in RAW 264.7 macrophage cells. **Anatomy & cell biology**, v. 44, n. 3, p. 194–203, 2011.

YOON, W.-J.; HAM, Y. M.; KIM, S.-S.; et al. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. **EurAsian Journal of Biosciences**, v. 143, n. 3, p. 130–143, 2009.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol research & health**, v. 29, n. 4, p. 245–54, 2006.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 10, n. 4, p. 655–83, 2011.

ZERBINI, L. F.; TAMURA, R. E.; CORREA, R. G.; et al. Combinatorial effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and NF-κB inhibitors in ovarian cancer therapy. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24285, 2011.

ZHAI, J.-X.; ZHANG, Z.-X.; FENG, Y.-J.; et al. PDTC attenuate LPS-induced kidney injury in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr mice. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 6, p. 6763–71, 2012.

ZHANG, S.; SUN, W.-Y.; WU, J.-J.; WEI, W. TGF-β signaling pathway as a pharmacological target in liver disease. **Pharmacological Research**, v. 85, p. 15-22, 2014.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

-10 and chronic liver disease. **World journal of**
1, p. 1681–1685, 2006.

 **PDF**
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Capítulo II



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

SIBLE THERAPEUTIC ALTERNATIVE IN OLIC LIVER DISEASE

Artigosubmetido à revista: Alcohol

therapeutic alternative in the treatment of alcoholic liver
disease

Gabriel Barros Rodrigues^{a*}, Sura Wanessa Santos Rocha^a, Laise Aline Martins dos Santos^a, Wilma Helena de Oliveira^a, Fabiana Oliveira dos Santos Gomes^a, Maria Eduarda da Rocha de França^a, Deniele Bezerra Lós^b, Christina Alves Peixoto^a

^aUltrastructure Laboratory, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil

^bPostgraduate Program in Biotechnology - RENORBIO, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author: Gabriel Barros Rodrigues.

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – CPqAM/FIOCRUZ. Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária CEP: 50.670-420 Recife, Brazil.

Tel.: +55 81 2101.2583. Email: gabrielb.rodrigues@hotmail.com

Alcoholic liver disease (ALD) is a major cause of chronic liver disease worldwide. Diethylcarbamazine (DEC) is a drug that has anti-inflammatory properties due to its effects on the metabolism of arachidonic acid. Thus, the present study examined the anti-inflammatory effects of DEC on the mechanisms of ALD. Mice were divided into seven groups: 1) control, 2) DEC 50 mg/kg , 3) alcohol, 4) alcohol + DEC 50 mg/kg , 5) alcohol + celecoxib 50mg/kg 6) PDTC 100mg/kg and 7) PDTC 100mg/kg + DEC 50mg/kg. Liver fragments were stained with HE and Sirius red, and processed for immunofluorescence, western blot and immunohistochemistry. Furthermore, serum was collected for biochemical measurements and ELISA assay. Alcohol induced liver damage, elevation in collagen content and increased expression of NF- κ B and inflammatory markers (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , iNOS, COX-2 and TGF- β). Treatment with DEC was able to reduce liver damage and the collagen content, the NF- κ B and inflammatory markers expression, ameliorated biochemistry parameters (total cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride content and aspartate aminotransferase) and elevate the hepatic glutathione reductase activity beyond increase the expression of anti-inflammatory markers (p-AMPK and IL -10). Future clinical trials may demonstrate that oral administration of DEC may be suitable for the treatment of ALD as other liver diseases.

Keywords: Alcoholic liver disease, diethylcarbamazine, NF- κ B, inflammation, alcohol

Alcoholic liver disease (ALD) represents a spectrum of clinical symptoms and morphological alterations ranging from simple steatosis to more severe forms of liver injury, including alcoholic hepatitis and cirrhosis (Tome and Lucey, 2004). Its mechanism has not been completely elucidated, but studies indicate that the metabolism of ethanol is associated with oxidative stress, the depletion of glutathione and the subsequent activation of the innate immune system by several factors, such as LPS. Complement and reactive oxygen species play a key role in the initiation and progression of ALD (Bruha et al., 2012; Gao et al., 2011; Gao and Bataller, 2011).

The severity and prognosis of ALD depends on the amount, pattern and duration of alcohol consumption. However, excessive and chronic alcohol intake can lead to liver damage due to the persistent inflammatory stimulus and the potentiation of other liver diseases, including chronic viral hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Few advances have been made in relation to ALD and medical treatment for ALD has not changed significantly in 40 years (Orman et al., 2013).

The nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a protein family composed of five members in mammals: p65 (RelA); RelB; c-Rel; p50/p105 (NF- κ B1) and p52/p100 (NF- κ B2). They exist in unstimulated cells as homodimers or heterodimers bonded to the inhibitory kappa B protein family (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ and BCL-3) (Hayden and Ghosh, 2012). The activation of the signaling cascade of NF- κ B results in the complete degradation of I κ B, allowing the translocation of NF- κ B to the nucleus, where it induces the transcription of more than 400 genes involved in immunoregulation, growth regulation, inflammation, carcinogenesis and apoptosis (Ahn and Aggarwal, 2005).

increases gut permeability and the translocation of bacteria-derived LPS from the gut to the liver, contributing to the increased levels of LPS found in patients with ALD. This LPS binds to the TLR4 receptor in Kupffer cells, activating NF- κ B, which leads to the production of proinflammatory cytokines and hepatic injuries (Gramenzi et al., 2006; Rao, 2009).

Nitric oxide (NO) is produced enzymatically and plays an important role in various physiological and inflammatory processes. NO is synthesized from L-arginine by one of three isoforms of the enzyme NO synthase (NOS) (Abramson, 2008). In response to pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IFN γ and lipopolysaccharide, inducible nitric oxide synthase (iNOS) produces nitric oxide which mediates the cell-damaging and toxic effects that contribute to DNA damage (Hiroi et al., 2013; Dhillon et al., 2014).

Diethylcarbamazine (DEC) is a piperazine derivative (Sanchez Bruni et al., 2006). Due to its effective microfilaricidal action, DEC has been used in the treatment and control of lymphatic filariasis since 1947 (Molyneux et al., 2003). Despite more than 50 years of use, its exact mechanism of action remains unclear (McGarry et al., 2005). However, it is known to affect the metabolism of arachidonic acid and confer anti-inflammatory properties (Maizels and Denham, 1992).

In addition, biochemical studies have demonstrated its inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways (Peixoto and Silva, 2014). Cyclooxygenases (COX) are enzymes involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandin H₂, the precursor of various compounds which are important inflammatory mediators (Mohammed, 2004). Recent studies in our laboratory have

tion of DEC (Ribeiro et al., 2014; Rocha et al., 2012).

Celecoxib is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). NSAIDs are known as targets of COX in arachidonic acid metabolism and are indicated for the treatment of inflammation, pain and inflammation-related disorders (Küçükgül et al., 2013). A selective potent COX-2 inhibitor, celecoxib was the first cyclooxygenase-2 selective inhibitor (coxib) to be introduced into clinical practice (McCormack, 2011).

Pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) has been widely used as a potent and specific inhibitor of NF- κ B. The exact mechanism by which PDTC exerts this effect is unclear. The most accepted hypothesis is that PDTC could directly prevent the degradation of I κ B sub-units or could also act through its antioxidant properties, inhibiting the known stimulating effect of oxidative stress on NF- κ B (Fujihara et al., 2007).

The aim of the present study was to report the efficacy of treatment with DEC in alcoholic liver disease, assessing its mechanism of action on the pathogenesis of ALD through analysis with a COX inhibitor drug (celecoxib) and a specific inhibitor of NF- κ B (PDTC).

Animals

Sixty-two male C57BL/6 mice aged 5 weeks old, and weighting 15-17g, were used in all experiments. The health status of the mice was examined and they were acclimated to the laboratory environment of 23°C and a 12h light: 12h dark photoperiod. The animals were housed in metal cages and fed with a standard diet and water ad libitum. The animal studies Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Institute approved all the experiments reported.

Diethylcarbamazine solutions

The solutions were composed of distilled water and DEC (Farmanguinhos, FIOCRUZ, Brazil) and adjusted according to the body weight of each animal. The groups that were treated received 50 mg/kg of DEC for twelve days through gavage (200 µl) (Saraiva et al., 2006).

Celecoxib solutions

The solutions were composed of distilled water and celecoxib (Pfizer Inc., Groton, CT, USA) and adjusted according to the body weight of each animal. The groups that were treated received 50 mg/kg of celecoxib for eight days through gavage (200 µl) (Ayalasomayajula and Kompella, 2003).

Pyrrolidinedithiocarbamate solutions

The solutions were composed of distilled water and PDTC (Sigma, St. Louis, MO, USA) and adjusted according to the body weight of each animal. The groups that

pyrrolidinedithiocarbamate for three weeks through gavage (200 μ l) (Gu et al., 2007).

Experimental groups

After a week of acclimation, 30-day old C57BL/6 mice were separated into seven groups: 1) Control group (Cont) (n=10), which only received distilled water; 2) DEC-treated group (DEC) (n=10), which received 50mg/kg DEC for twelve days by gavage; 3) alcoholic group (EtOH) (n=10), which received ethanol; 4) alcoholic plus 50mg/kg DEC group (EtOH + DEC) (n=10), which received ethanol and 50mg/kg DEC for twelve days by gavage; 5) alcoholic plus 50mg/kg celecoxib group (EtOH + CELECO) (n=10), which received ethanol and 50mg/kg celecoxib for eight days by gavage; 6) alcoholic plus 100mg/kg PDTC group (EtOH + PDTC) (n=6), which received ethanol and 100mg/kg PDTC for three weeks by gavage; 7) alcoholic plus 100 mg/kg PDTC and 50 mg/kg DEC group (EtOH + PDTC + DEC), which received ethanol, 100mg/kg PDTC for three weeks and 50mg/kg DEC by gavage. Ethanol was provided in the drinking water at 10% (v/v) for 2 days, 15% for 5 days, 20% for 5 weeks and 25% for 1 week (Cook et al., 2004). According to Cook et al (2004), the innate immune system of mice exhibits significant alterations after 3 weeks of 20% ethanol consumption. The solutions were changed daily and the remaining liquid in the bottles was measured in a graduated cylinder for final volume analysis and then discarded. In the last 3 weeks of alcoholism induction, EtOH + PDTC and EtOH + PDTC + DEC received the treatment with the PDTC solutions and DEC in the last twelve days of the alcoholism induction. Treatment with celecoxib was also performed in the last 8 days of the alcoholism induction.

Biochemical determinations

the lipid profile (total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides) and hepatic damage by testing the aspartate aminotransferase (AST). Serum concentrations were measured by the spectrophotometer method in Integra 400– Roche. Data were compared by one way ANOVA and Dunnett's or Tukey's tests, together with GraphPad Prism software, version 6.01.

Histopathology

HE staining

Liver fragments were fixed in 10% formalin for 24 hours and then processed and embedded in paraffin. Sections of 4-5 μ m were cut and mounted on glass slides. Slices were stained with hematoxylin-eosin and assessed by inverted microscopy (Observer Z1, Zeiss MicroImaging GmbH), a camera and a 4.7.4 image analysis program (AxionCamMRm Zeiss) at a magnification of 400x.

Sirius red staining

Liver fragments were fixed in 10% formalin for 24 hours and then processed and embedded in paraffin. Sections of 2.5 μ m were cut and mounted on glass slides. Slices were stained with picosirius red solution of 1%, rehydrated in water and stained with Fast Green 0.1% solution in ethanol. They were then assessed by inverted microscopy (Observer Z1, Zeiss MicroImaging GmbH), a camera and a 4.7.4 image analysis program (AxionCamMRm Zeiss) at a magnification of 400x.

Hepatic glutathione reductase activity

Liver tissues were obtained and weighed. Each piece was homogenized using the manufacturer's buffer (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan, catalog number:

g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was used to estimate the activity of hepatic glutathione reductase using the assay kit, following the manufacturer's instructions.

Immunohistochemical assays

Five sections (5 µm in thickness) of each group were cut and adhered to slides treated with 3-amino-propyl-trietoxi-silane (Sigma, St. Louis, MO, USA). Then, the immunohistochemical assays were performed according to the methodology of Ribeiro et al 2014. The antibodies used were: anti-IL-1β antibody (Abcam, Canada/US, catalog number: ab9722, 1:100), anti-IL-17 (SantaCruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA, catalog number: sc-7927, 1:50), anti-IL-10 (Abcam, Canada/US, catalog number: ab33471, 1:50), anti-iNOS (Abcam, Canada/US, catalog number: ab3523, 1:250), anti-COX-2 (Abcam, Canada/US, catalog number: ab15191, 1:400) and TGF-β (Abcam, Canada/US, catalog number: ab66043, 1:100).

Immunofluorescence

The samples were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1% phosphate buffer and stored at -80 ° C. Subsequently, sections were obtained on a cryostat and incubated for 2h with the rabbit polyclonal antibody against anti-p-NF-κB (Abcam, Canada/US, catalog number: ab97726, 1:100) and then diluted in 0.05 M phosphate buffer containing 1% BSA. The samples were then incubated for 45 minutes with secondary antibody conjugated to Cy3 (Jackson, catalog number 705-165-147) against rabbit immunoglobulin (Sigma–Aldrich, catalog number F6257, 1:200). The slides were observed with an inverted fluorescence microscope (Zeiss MicroImaging GmbH), equipped with a camera (Zeiss AxioCam MRM) and Release 4.7.2 image analysis

intensity was determined by the ImageJ program, version 1.58 (developed by Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD).

Western blot

Livers were quickly dissected and then homogenized in a Wheaton Overhead Stirrer (no. 903475) using an extraction cocktail of 10mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100mM sodium fluoride, 10mM sodium pyrophosphate, 10mM sodium orthovanadate (NaVO₄), 10mg of aprotinin and 100mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane (pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 3000 xg for 10 minutes and the supernatant was collected and stored at -70° C until use for immunoblotting. Protein levels were determined using the Bradford method, with bovine serum albumin as the standard (Bradford, 1970). The proteins (40 mg) were separated to 12% or 14% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide by gel electrophoresis, under reduced conditions, and were electrophoretically transferred onto the nitrocellulose membrane (Bio Rad, CA, USA, Ref. 162-0115). After blocking overnight at 4°C with 5% non-fat milk in TBS-T (Tris-buffered saline 0.1% plus 0.05% Tween 20, pH 7.4), the membranes were incubated at room temperature for 3 hours, with rabbit or mouse polyclonal antibody against TNF- α (1:1000 dilution; PreproTech, London, UK), IL-17 (1:1000 dilution, Abcam, CA, USA), IFN- γ (1:1000 dilution, Abcam, CA, USA), TGF- β (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), iNOS (1:1000 dilution; BD Transduction Laboratories, USA), ERK 1/2 (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), p-ERK 1/2 (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), I κ B- α (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), NF- κ B (1:250 dilution, Abcam, CA, USA), p-NF- κ B (1:250 dilution, Abcam, CA, USA), AMPK (1:1000 dilution, Abcam, CA, USA), p-AMPK (1:1000 dilution, Cell Signaling Technology, MA, USA) and IL-10 (1:1000

l in buffer solution TBS-T containing 3% non-fat milk. After washing (six times, 10 min each) in TBS-T, the membranes were further reacted with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (1:80000 (Ref. A6154) at 1:5000 (Ref. A5420) dilution, respectively (Sigma, USA), diluted in TBS-T with 1% nonfat milk, for 1h30min, at room temperature. An enhanced chemiluminescence reagent (Super Signal, Pierce, Ref. 34080) was used to visualize the labeled protein bands and the blots were developed on X-ray film (Fuji Medical, Kodak, Ref. Z358487-50EA). For quantification, the density of pixels of each band was determined by Image J 1.38 software. For each protein investigated, the results were confirmed in three sets of experiments. Immunoblot for β -actin (1:1000 dilutions, Sigma, USA) was carried out as a control for the above protein blots.

Statistical analysis

GraphPad Prism software, version 6.01 was used for the statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Differences between the control and treated groups were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and one of Dunnett's test, Tukey's test or the T-test as a post hoc test. Probability values less than 0.05 were considered significant.

DEC reduces liver-to-body weight ratio

There was no significant difference in the body weight of mice between the groups (data not shown). Liver weight was the parameter that varied. There was a significant increase in the ratio of the alcoholic group (EtOH) relative to the control group. This increase was significantly reduced in the EtOH + DEC and EtOH + Celeco groups (Figure 1).

DEC improves the lipid profile and reduces AST level

In the analysis of the lipid profile, the DEC and control groups exhibited similar results. However, the EtOH + DEC and EtOH + Celeco groups exhibited a reduction in the total cholesterol and triglyceride content when compared with the EtOH group. Interestingly, the EtOH + DEC group exhibited significantly higher levels of HDL cholesterol. The marker of liver injury, AST, had an increase of more than three fold in the EtOH group (Figure 2D), when compared with the control group, which was significantly reduced in the EtOH+ DEC and EtOH + Celeco groups.

Dec restore restores the standard hepatic morphology

Histological analysis of the control group confirmed standard hepatic morphology (Figure 3A). A similar histological pattern was observed after 12 days of treatment with DEC (Figure 3B).

In the group of animals exposed to alcohol, various histological characteristics of persistent inflammation were observed. There were alterations in the arrangement of hepatic lobules, with dilatation of centrilobular veins. In addition, steatosis and

ected, together with a massive presence of macrophages. Several areas of necrosis were also observed (Figure 3C).

In the histology of the EtOH + DEC group, there was a reduction in all of the histological alterations observed in the alcoholic group. There was a noticeable decrease in steatosis and in the areas of necrosis. Furthermore, the inflammatory infiltrate was reduced and the hepatocytes returned to the cord morphology. There was an improvement in the arrangement of the hepatic lobules and in the morphology of the centrilobular veins (Figure 3D).

The EtOH + CELECO group also exhibited a reduction in the histological alterations observed in the alcoholic group, particularly in the reduction of inflammatory infiltrates and areas of necrosis. However, hemorrhagic regions and severe steatosis were frequently observed in this group (Figure 3E).

DEC reduces the collagen fiber content

During the assessment of collagen content by Sirius red staining, the control and DEC groups exhibited little staining of collagen fibers, which was restricted to the periphery of the centrilobular veins (Figures 4A and 4B).

The EtOH group exhibited markedly red staining, indicating a high presence of collagen fibers near the centrilobular veins and sinusoids (Figure 4C). In the EtOH + DEC group, there was a significant reduction of red staining with a marked improvement in the morphological aspect (Figure 4D).

The EtOH + Celeco group exhibited a small reduction in collagen fibers and the collagen staining remained high in centrilobular regions. Thus, although there was a statistically significant reduction when compared with the EtOH group (Figure 4F), the

remained high when compared with the control group (Figure 4E). Impressively, DEC was more efficient in reducing the collagen content when compared with the celecoxib treatment.

DEC increases the activity of glutathione reductase

In the assessment of glutathione reductase activity, the DEC group showed a significant increase in enzyme activity when compared with the other groups. The EtOH group showed a reduction of enzyme activity, although the groups treated with DEC and celecoxib exhibited a recovery of enzyme activity in relation to the alcoholic group (Figure 5).

DEC reduces p-NF- κ B expression

Immunofluorescence analysis for p-NF- κ B revealed physiological expression mainly in the cytoplasm of liver cells in the control and DEC groups (Figures 6A and 6B). However, the EtOH group exhibited a significant increase in the phosphorylated form of NF- κ B, located both in the cytoplasm and in the nucleus of hepatic cells, where there was double staining with DAPI, a nuclear marker (Figure 6C).

Treatment with DEC (EtOH + DEC) significantly reduced p-NF- κ B labeling, with minimal labeling in the nucleus, which was almost restricted to the cytoplasm (Figure 6D). The celecoxib group also significantly reduced the labeling of p-NF- κ B, although it remained high with the transcription factor remaining in the cell nucleus (Figure 6E).

DEC reduces inflammatory markers

mice in the EtOH group demonstrated elevated staining for IL-1 β (Figure 7A). Treatment with DEC and celecoxib reduced this staining significantly (Figures 7B and 7C).

Liver tissue sections from mice in the alcoholic group showed positive staining for IL-17 (Figure 7E) and TGF- β (Figure 7U) cytokines, especially in perilobular areas, which were reduced with DEC treatment (Figures 7F and 7V). Celecoxib treatment was only able to reduce TGF- β positive staining (Figures 7G and 7W). These results are in accordance with the western blot analysis, in which DEC reduced the expression of IL-17 and TGF- β (Figures 8C and 8E).

The liver fragments obtained from the EtOH group revealed positive staining for iNOS and COX-2 enzymes (Figures 7M and 7Q). DEC and celecoxib treatment significantly reduced the specific immunolabeling of both enzymes (Figures 7N, 7O, 7R and 7S). Similar results were obtained in the western blot analysis, in which DEC treatment reduced the liver iNOS expression (Figure 8D).

In the western blot analysis, the EtOH group exhibited an elevated expression of TNF- α (Figure 8A) and IFN- γ (Figure 8B) when compared with the control group. The treatment with DEC reduced the expression of both cytokines. Celecoxib treatment only reduced TNF- α expression significantly.

The western blot analysis showed no significant changes in ERK 1/2 expression between the groups (Figure 8F). On the other hand, the EtOH group showed elevated p-ERK 1/2 expression (Figure 8G) when compared with the control group. The treatment with DEC and celecoxib reduced ERK 1/2 phosphorylation.

Similar to ERK 1/2, no significant changes were observed in NF- κ B expression (Figure 9A) between groups. However, the EtOH group exhibited a high expression of

and with the control group. PDTC, a specific inhibitor of NF- κ B, was used to compare the reduction of p-NF- κ B expression. Thus, DEC treatment reduced p-NF- κ B expression similarly to PDTC, which was even lower when the two drugs were associated. Celecoxib was not effective in reducing the expression of the phosphorylated form of NF- κ B.

Furthermore, a reduction in the expression of the NF- κ B inhibitory protein I κ B- α (Figure 9C) was observed in the alcoholic group, when compared with the control animals. DEC and celecoxib treatments significantly increased I κ B- α expression, when compared with the EtOH group. The association of PDTC and DEC induced a significant elevation of I κ B- α expression even when compared with the EtOH + DEC group. The results obtained in the NF- κ B and I κ B- α analysis suggest that DEC acts as a selective inhibitor of NF- κ B.

DEC increases anti-inflammatory markers

Liver fragments in the EtOH group revealed low staining for the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Figure 7I). In contrast, treatment with DEC and celecoxib induced elevated positive staining throughout liver stroma (Figures 7J and 7K). Similar results were observed in the western blot analysis, in which the EtOH group exhibited very low IL-10 expression (Figure 10C) when compared with the control group. This expression was elevated in the EtOH + DEC and EtOH + Celeco groups.

The AMP-activated protein kinases (AMPK) exhibited no significant differences between the groups in the western blot analysis (Figure 10A). Nevertheless, the phosphorylate form of AMPK was significantly reduced in the alcoholic group when compared with the control animals (Figure 10B). DEC and celecoxib treatments were



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

tion of p-AMPK when compared with the EtOH group.

Even with the profound economic and health impact of ALD, little progress has been achieved in the treatment of patients in advanced stages. Since its pathogenesis is poorly understood, there are no modern diagnostic tools available to assess an individual's susceptibility to the development of ALD. As a result, no drug has been successfully developed to treat ALD since the 1970s, when the use of corticosteroids was suggested for the treatment of severe alcoholic hepatitis (Gao and Bataller, 2011).

The aim of the present study was to assess the efficacy of treatment for 12 days with DEC in alcoholic liver disease. The first parameter assessed was alterations in the ratio of liver mass relative to the body weight of the mice. As the body weight of the animals did not change, it was observed that the livers of animals in the EtOH group increased in weight, consequently increasing the body-to-liver ratio, which was reduced after treatment with DEC. In addition, through biochemical assessment, DEC was able to improve the lipid profile by reducing the content of triglycerides and cholesterol, and increasing HDL. In addition, DEC also reduced AST, a marker of liver injuries.

The chronic inflammatory process is directly associated with the pathogenesis of ALD. Elevated circulating levels of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ are consistently observed in the livers of rats fed with alcohol (Mandrekar and Szabo, 2009) and in patients with ALD (McClain et al., 2002). A recently identified proinflammatory cytokine, IL-17, was also found in the circulation and liver of ALD patients (Lemmers et al., 2009).

The activation of macrophages by IFN- γ plays a fundamental role in the progression of inflammation by upregulating proinflammatory factors such as TNF- α and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Mühl and Pfeilschifter, 2003). IFN- γ receptor knockout mice are highly resistant to LPS-induced toxicity, since IFN- γ

induced by LPS (Schroder et al., 2004). In the immunocytochemistry and western blot analysis of the present study, DEC was able to reduce IFN- γ , IL-1 β , IL-17 and TNF- α , when compared with the EtOH group.

Continued alcohol consumption leads to increased intestinal permeability to endotoxins, especially LPS. These lipopolysaccharides bind Kupffer cells through the CD14 receptor, which activates the transcription factor NF- κ B, causing an exacerbated transcription of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and TGF- β (Gramenzi et al., 2006; Rao, 2009).

DEC efficiently reduced the p-NF- κ B expression in ALD, both in the immunofluorescence and the western blot assays. In order to determine the specificity of the p-NF- κ B inhibition, PDTC was used to compare the results. The EtOH + DEC group was able to decrease the expression of p-NF- κ B, which was significantly similar to that observed in the PDTC group. Moreover, the association of DEC and PDTC induced a synergism of results, indicating a specific inhibition.

Furthermore, DEC was able to increase the expression of the inhibitory protein of NF- κ B, I κ B- α , which was significantly decreased in the EtOH group. The association of DEC and PDTC induced a higher I κ B- α expression, confirming the DEC can act as an inhibitor of NF- κ B, as confirmed in the western blot and immunofluorescence analysis. These data suggest that DEC can act as a direct inhibitor of NF- κ B by inhibiting its expression or by increasing the expression of its inhibitory molecule.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are known for their effective inhibition of cyclooxygenase activity (Pountos and Giannoudis, 2011). However, many studies have shown that certain NSAIDs can exert their effects through other pathways, especially the NF- κ B signaling cascade (Smartt et al., 2003; Tegeder et al., 2001;

shown examples include the prevention of IKK β phosphorylation by aspirin and surindac inhibiting NF- κ B activation (Li et al., 2013; Muller et al., 2001). Similarly, DEC modulated the inflammatory process by interfering in the NF- κ B signaling pathway.

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a central regulator in chronic liver diseases, participating in all stages of disease progression. Hepatic stellate cells (HSCs) are the primary target for active TGF- β , contributing mainly with fibrogenesis (Dooley and ten Dijke, 2012). Additionally, TGF- β has been shown to induce hepatocyte apoptosis via the increased expression of the pro-apoptotic protein BIM (Ramesh et al., 2008). As well as the reduction in collagen fiber content, DEC treatment reduced TGF- β expression, when compared with the EtOH group. This indicates that DEC has an anti-fibrotic action.

Mckim et al (2003) studied knockout mice for iNOS and observed that nitric oxide released by iNOS is required for the initiation of alcohol-induced liver injuries. Specific iNOS inhibitors have been shown to exert beneficial anti-inflammatory effects in models of chronic inflammation (Hesslinger et al., 2009). The activity of COX-2 and its synthesis products actively participates in the pathogenesis of alcoholic liver disease, contributing to hepatic steatosis and fibrosis, while also affecting the metabolism of fatty saccharides and proteins, promoting oxidative stress and facilitating the release of cytokines (Cao et al., 2008).

Moreover, NF- κ B coordinates the expressions of iNOS and COX-2 during the inflammatory processes (Yoon et al., 2009). The results of the present study confirmed elevated labeling in the alcoholic group for iNOS and COX-2 enzymes, as well as an increase in iNOS expression when compared with the control group in the western blot

the positive staining of both enzymes in the immunohistochemistry and the expression of iNOS (western blot). These results are in accordance with the inhibitory action of DEC on nuclear factor kappa B expression.

ERK activity has been associated with classical markers of apoptosis, such as caspase-3 activation, DNA condensation or DNA fragmentation (Cagnol and Chambard, 2010). Aroor et al (2012) demonstrated the correlation between the augmentation of liver injuries and increased phosphorylation of ERK 1/2 in a model of chronic oral administration of ethanol. This interaction is clinically relevant since ERK 1/2 activation has been observed in human alcoholic liver disease (Nguyen and Gao, 2002). The results of the present study confirmed an increase of ERK 1/2 phosphorylation in the alcoholic group, which correlates with the areas of cellular death observed in the histology of tissue sections. DEC was able to reduce the expression of p-ERK 1/2, suggesting some interference in its apoptotic signaling pathway.

Chronic alcohol consumption can inhibit AMPK in the liver, and this mechanism appears to play a key role in the development of steatosis and the progression of inflammation (Sid et al., 2013). In addition, it has been reported that AMPK can suppress the activation of NF- κ B and iNOS and their pro-inflammatory signaling (Li and McCullough, 2010).

Inflammation and endotoxemia/bacteremia promotes the up-regulation of IL-10 production. In the liver, IL-10 has been observed within hepatocytes, sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatic stellate cells. Among the anti-inflammatory effects, IL-10 reduces TNF- α and IFN- γ mRNA expression, as well as serum concentration, in addition to controlling TGF- β secretion and regulating hepatic injuriesZhang; Wang (2006).

elevate the expression of the anti-inflammatory markers p-Akt and IL-10. Interestingly, DEC enhanced IL-10 levels almost ten-fold, when compared with the alcoholic group.

The findings of the present study suggest a beneficial effect of DEC in the intricate mechanism of alcoholic liver disease. DEC was shown to be a promising drug in the treatment of inflammatory disorders, particularly ALD, especially in terms of the inhibition of transcription factor NF- κ B.

This study was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/ PAPES VI).

- Abramson SB (2008) Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10:S2.
- Ahn KS, Aggarwal BB (2005) Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci* 1056:218–33.
- Aroor AR, Jackson DE, Shukla SD (2012) Elevated activation of ERK-1 and ERK-2 accompany enhanced liver injury following alcohol binge in chronically ethanol fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 35:2128–2138.
- Ayalasomayajula SP, Kompella UB (2003) Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Eur J Pharmacol* 458:283–9.
- Bruha R, Dvorak K, Petrtyl J (2012) Alcoholic liver disease. *World J Hepatol* 4:81-90.
- Cagnol S, Chambard J-C (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277:2–21.
- Cao M, Dong L, Lu X, Luo J (2008) Expression of cyclooxygenase - 2 and its pathogenic effects in nonalcoholic fatty liver disease. *J Nanjing Med Univ* 22:111–116.
- Cook RT, Zhu X, Coleman RA, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Ray NB, LaBrecque DR, Cook BL (2004) T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol* 33:175–81.
- Dhillon SS, Mastropaolo LA, Murchie R, Griffiths C, Thöni C, Elkadri A, Xu W, Mack A, Walters T, Guo C, Mack D, Huynh H, Baksh S, Silverberg MS, Brumell JH, Snapper SB, Muise AM (2014) Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol* 5:e46.
- Dooley S, ten Dijke P (2012) TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res* 347:245–56.
- Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DMAC, Vieira JM, Zatz R (2007) Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F92–9.
- Gao B, Bataller R (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141:1572–85.
- Gao B, Seki E, Brenner DA, Friedman S, Cohen JI, Nagy L, Szabo G, Zakhari S (2011) Innate immunity in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:516–525.

- aria F, Loggi E, Andreone P, Bernardi M (2006) Disease--pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther* 24:151–61.
- Gu J-W, Young E, Busby B, Covington J, Johnson JW (2009) Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis, and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol Ther* 8:514–21.
- Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26:203–34.
- Hesslinger C, Strub A, Boer R, Ulrich W-R, Lehner MD, Braun C (2009) Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans* 37:886–91.
- Hiroi M, Sakaeda Y, Yamaguchi H, Ohmori Y (2013) Anti-inflammatory cytokine interleukin-4 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression in the mouse macrophage cell line RAW264.7 through the repression of octamer-dependent transcription. *Mediators Inflamm* 2013:369693.
- Küçükgülzel ŞG, Coşkun İ, Aydın S, Aktay G, Gürsoy Ş, Çevik Ö, Özakpınar ÖB, Özşavcı D, Şener A, Kaushik-Basu N, Basu A, Talele TT (2013) Synthesis and characterization of celecoxib derivatives as possible anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer and anti-HCV agents. *Molecules* 18:3595–614.
- Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruysse V, Le Moine O, Devière J (2009) The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 49:646–57.
- Li J, McCullough LD (2010) Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:480–92.
- Li X, Gao L, Cui Q, Gary BD, Dyess DL, Shevde-samant LR, Samant RS, Dean-colomb W, Gary A (2013) Sulindac inhibits tumor cell invasion by suppressing NF- κ B mediated transcription of microRNAs. *Oncogene* 31:4979–4986.
- Maizels RM, Denham DA (1992) Diethylcarbamazine (DEC): immunopharmacological interactions of an anti-filarial drug. *Parasitol* 105:S49-S60.
- Mandrekar P, Szabo G (2009) Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol* 50:1258–1266.
- McClain CJ, Hill DB, Song Z, Deaciuc I, Barve S (2002) Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol* 27:53–61.
- McCormack PL (2011) Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Drugs* 71:2457-89.

- 2005) Diethylcarbamazine activity against *Brugia* on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Parasitol Int* 54:4.
- McKim SE, Gäbele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, Connor HD, Mason RP, Doll MA, Hein DW, Arteel GE (2003) Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Gastroenterology* 125:1834–1844.
- Mohammed NA (2004) Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J Clin Pathol* 57:350–354.
- Molyneux DH, Bradley M, Hoerauf A, Kyelem D, Taylor MJ (2003) Mass drug treatment for lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Trends Parasitol* 19:516–522.
- Mühl H, Pfeilschifter J (2003) Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol* 3:1247–55.
- Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R, Hampich F, Park JK, Fiebeler A, Shagdarsuren E, Theuer J, Elger M, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H, Scheidereit C, Luft FC (2001) Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. *FASEB J* 15:1822–4.
- Nguyen V-A, Gao B (2002) Expression of interferon alfa signaling components in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 35:425–32.
- Orman ES, Odena G, Bataller R (2013) Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *J GastroenterolHepatol* 1:77–84.
- Peixoto CA, Silva BS (2014) Anti-inflammatory effects of diethylcarbamazine: A review. *Eur J Pharmacol* 734C:35–41.
- Pountos I, Giannoudis P (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. *Int J Interf Cytokine Mediat Res* 3:19–27.
- Ramesh S, Qi X-J, Wildey GM, Robinson J, Molkentin J, Letterio J, Howe PH (2008) TGF beta-mediated BIM expression and apoptosis are regulated through SMAD3-dependent expression of the MAPK phosphatase MKP2. *EMBO Rep* 9:990–7.
- Rao R (2009) Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 50:638–44.
- Ribeiro EL, Barbosa KPS, Fragoso IT, Donato MAM, Gomes FOS, da Silva BS, Silva AKS, Rocha SWS, Junior VAS, Peixoto CA (2014) Diethylcarbamazine attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Mediators Inflamm* 2014:105120.
- Rocha SWS, Dos Santos ACO, Silva BS, Torres DOC, Ribeiro EL, Barbosa KPS, Gomes FO, Peixoto CA (2012) Effects of Diethylcarbamazine (DEC) on

Submitted to Protein Malnutrition. J Food Drug

- Sanchez Bruni SF, Jones DG, McKellar QA (2006) Pharmacological approaches towards rationalizing the use of endoparasitic drugs in small animals. *J Vet Pharmacol Ther* 29:443–57.
- Saraiva KLA, Silva VAJ, Dias ESF, Peixoto CA (2006) Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod Toxicol* 22:754–9.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163–189.
- Sid B, Verrax J, Calderon PB (2013) Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease. *Biochem Pharmacol* 86:200–9.
- Smartt HJM, Elder DJE, Hicks DJ, Williams NA, Paraskeva C (2003) Increased NF-kappaB DNA binding but not transcriptional activity during apoptosis induced by the COX-2-selective inhibitor NS-398 in colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* 89:1358–65.
- Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 15:2057–72.
- Tome S, Lucey MR (2004) Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19:707–14.
- Yoon W-J, Ham YM, Kim S-S, Yoo B-S, Moon J-Y, Baik JS, Lee NH, Hyun C-G (2009) Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsian J Biosci* 143:130–143.
- Zerbini LF, Tamura RE, Correa RG, Czibere A, Cordeiro J, Bhasin M, Simabuco FM, Wang Y, Gu X, Li L, Sarkar D, Zhou J-R, Fisher PB, Libermann TA (2011) Combinatorial effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and NF-κB inhibitors in ovarian cancer therapy. *PLoS One* 6:e24285.
- Zhang L, Wang X (2006) Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 12:1681–1685.

Figure 1 - Changes in the ratio of liver mass relative to the body weight of mice. The results are expressed as the means $\pm$ s.e.m of ten mice in each group *P<0.05 vs. EtOH; †P<0.05 vs. CONT.

Figure 2 - Biochemical parameters: A – Total cholesterol; B – HDL cholesterol; C – triglyceride content; D - aspartate aminotransferase (AST). The results are expressed as the means $\pm$ s.e.m of six mice in each group. *P<0.05 vs. EtOH; †P<0.05 vs. CONT.

Figure 3 - Histological analysis of liver fragments (magnification: x400) in HE staining: A – control group showing the pattern of liver morphology; B – DEC group showing standard morphology; C, D, E - the EtOH group exhibited dilated centrilobular veins, significant inflammatory infiltrate, massive steatosis and areas of necrosis; F - EtOH + DEC restored the default architecture of the liver, with a reduction in the inflammatory infiltrate and steatosis; G,H – EtOH + CELECO group also restored the pattern of liver morphology and reduced inflammatory infiltrate, however showed hemorrhagic foci and steatosis. Legend: C – centrilobular vein; H – hepatocyte; HF – hemorrhagic focus; IF – inflammatory infiltrate; NC – necrosis areas; S – sinusoid; ST – steatosis. Bar = 50 μ m.

Figure 4 - Assessment of the content of collagen fibers by Sirius red staining: A- control group showing the physiological content of the collagen fibers; B – DEC group showing no alterations compared to the control; C – EtOH group showing high labeling

group showing a significant reduction in staining and an improvement in the aspect of the tissue; E – EtOH + CELECO group showing elevated Sirius red staining. Quantification (five arbitrarily selected areas per animal) was performed using GIMP 2 image analysis software (F), $n = 4$ animals/group. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. * $P < 0.05$ vs. EtOH; † $P < 0.05$ vs. CONT. Bar = 50 μ m.

Figure 5 - Assessment of glutathione reductase activity. The DEC group exhibited an expressive increase in enzyme activity. Unit definition (U): one unit is defined as the amount of enzymes that generates 1.0 μ mol of 5-thionitrobenzoic acid (TNB) per minute at 25°C. The results are expressed as the means $\pm$ s.e.m of four mice (in duplicate) in each group * $P < 0.05$ vs. EtOH.

Figure 6 - Immunofluorescence (Cy3 fluorochrome) for p-NF-kB in the liver. A – normal florescence in the cytoplasm of cells in the control group; B – DEC group showing similar fluorescence to control group; C – alcoholic group showing elevated intensity in the fluorescence of both the cytoplasm and in the nucleus; D – treatment with DEC reduced the high fluorescence and almost eliminated nuclear labeling; E – the group treated with celecoxib revealed elevated fluorescence in the cytoplasm and in the nucleus of the hepatic cells. Quantification (five arbitrarily selected areas per animal) was performed using GIMP 2 image analysis software (F), $n = 4$ animals/group. * $P < 0.05$ vs. EtOH; † $P < 0.05$ vs. CONT. Bar = 2 μ m.

for IL-1 β , IL-17, IL-10, iNOS, COX-2 and TGF- β in the liver. A,E,I,M,Q,U – EtOH group, B,F,J,N,R – EtOH + DEC group, C,G,K,O,S – EtOH + CELECO group. Quantification (seven areas arbitrarily selected per animal) was performed using GIMP 2 image analysis software (D, H, L, P, T), n = 3 animals/group. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. *P<0.05 vs. EtOH. Bar = 50 μ m.

Figure 8 - Immunoblot of inflammatory markers. A - TNF- α , B - INF- γ , C - IL-17, D - iNOS, E - TGF- β , F - ERK 1/2, G - p-ERK 1/2 and H – β -actin. The densitometric analysis was performed using Image J 1.38 software (I, J, K, L, M, N, O) n = 5 animals/group. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. *P<0.05 vs. EtOH; †P<0.05 vs. CONT.

Figure 9 - Immunoblot of NF-kB signaling pathway. A – NF-kB, B - p-NF-kB, C-IkB- α and D – β -actin. The densitometric analysis was performed using Image J 1.38 software (E, F, G), n = 5 animals/group. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. *P<0.05 vs. EtOH; †P<0.05 vs. CONT.

Figure 10 - Immunoblot of anti-inflammatory markers. A - AMPK, B - p-AMPK, C - IL-10 and D – β -actin. The densitometric analysis was performed using Image J 1.38 software (E, F, G), n = 5 animals/group. The results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. *P<0.05 vs. EtOH; †P<0.05 vs. CONT.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

of action of DEC in the complex pathogenesis of

alcoholic liver disease.

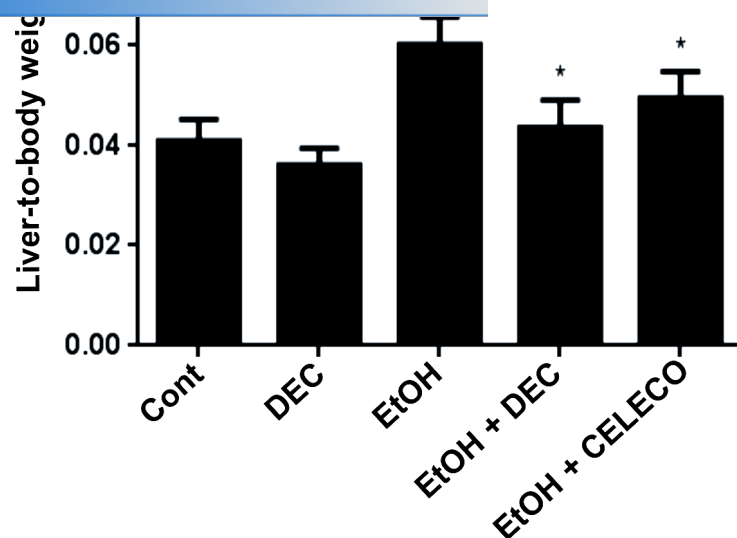


Figure 1

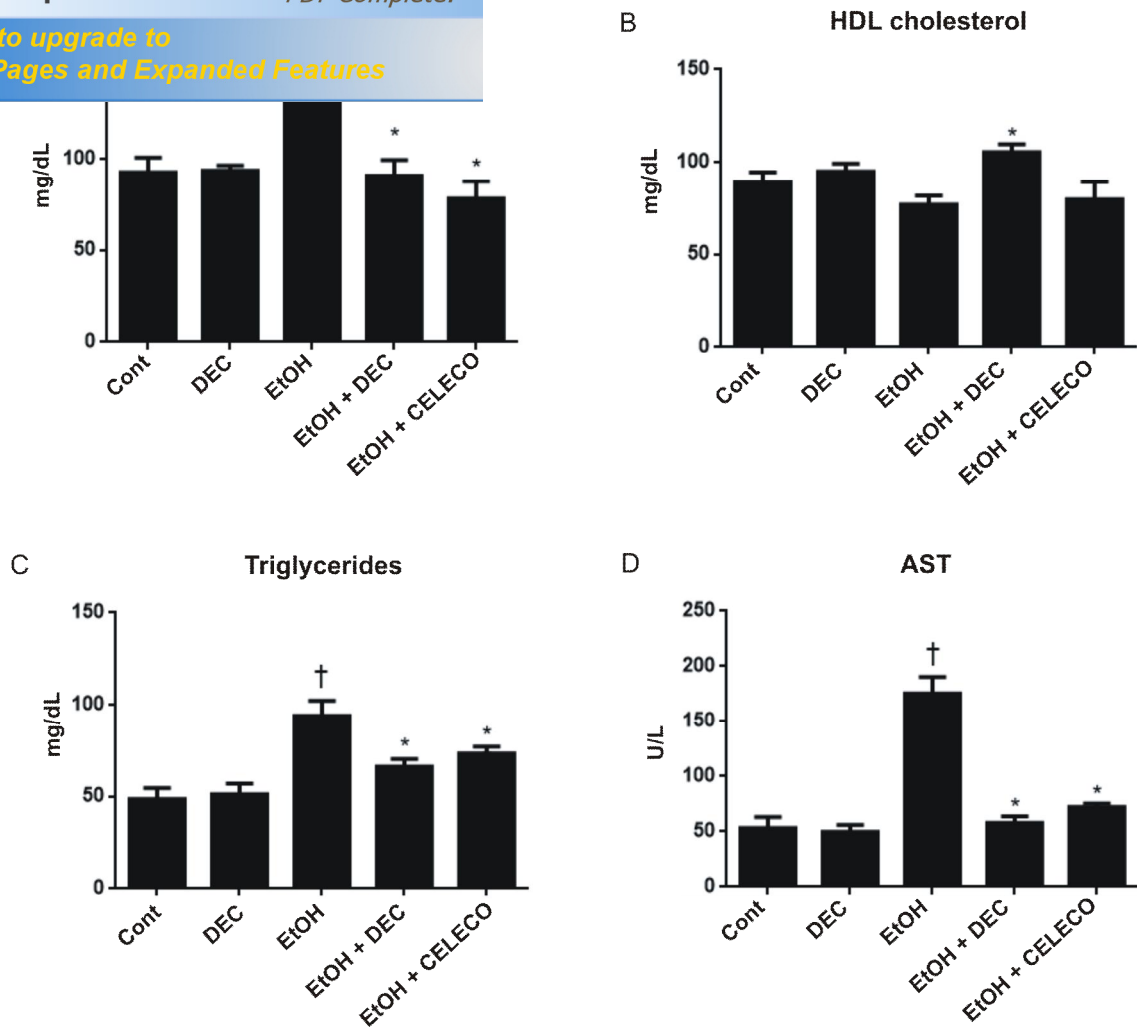


Figure 2

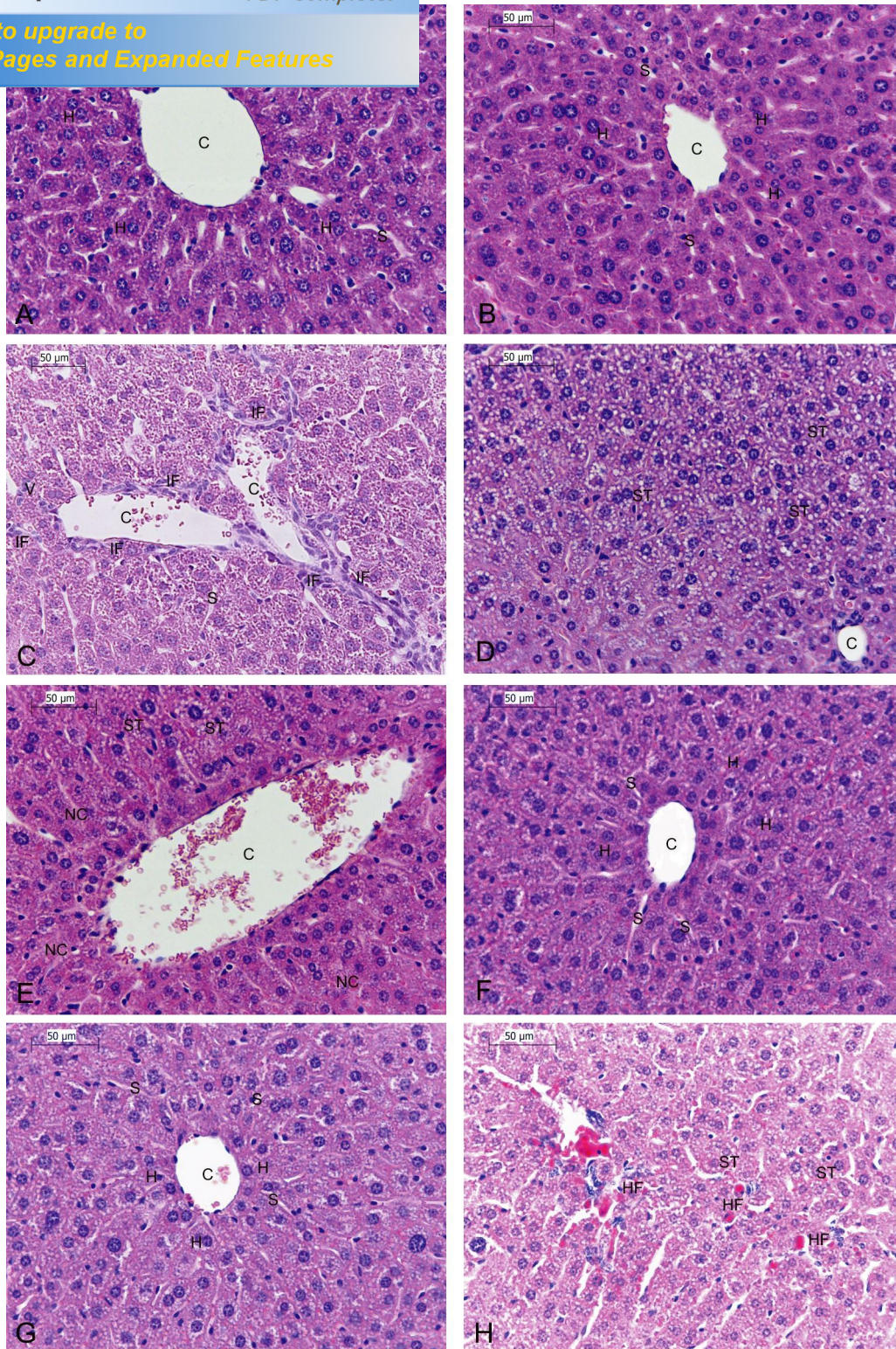


Figure 3

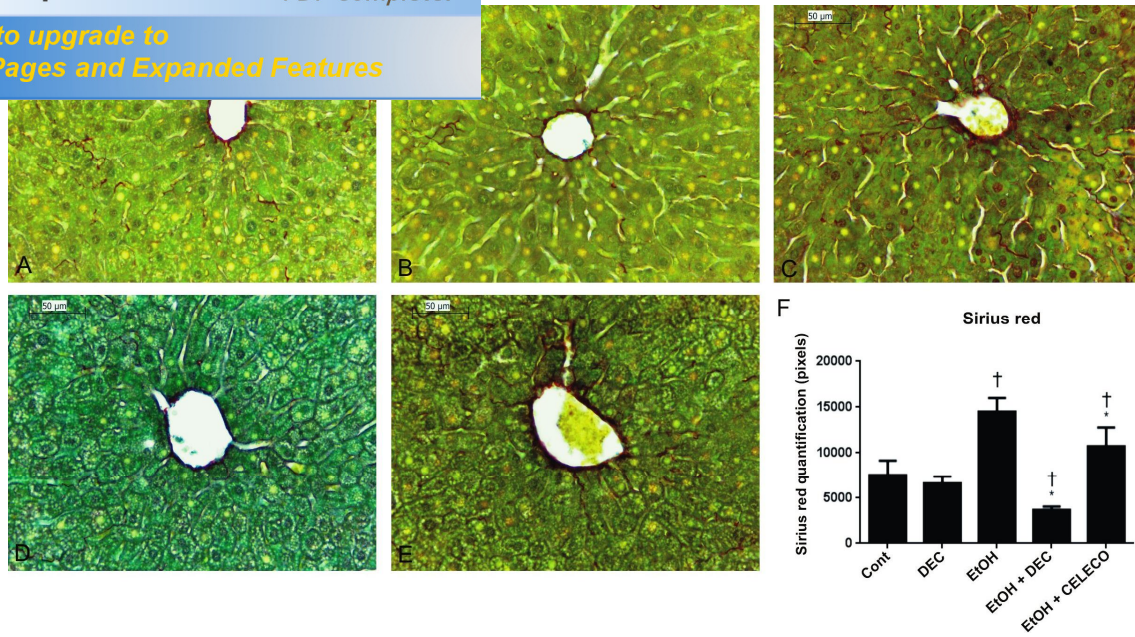


Figure 4

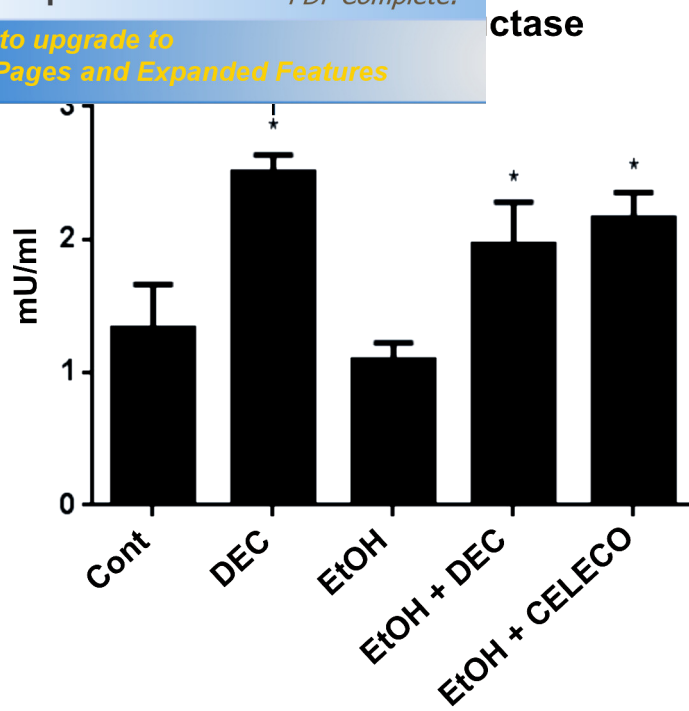


Figure 5

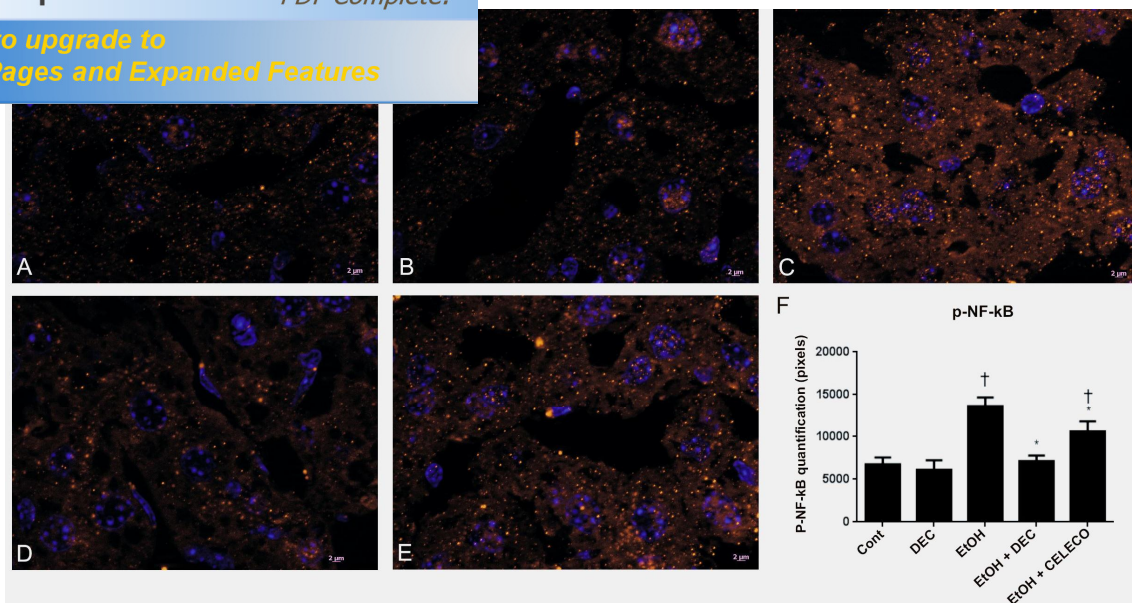


Figure 6

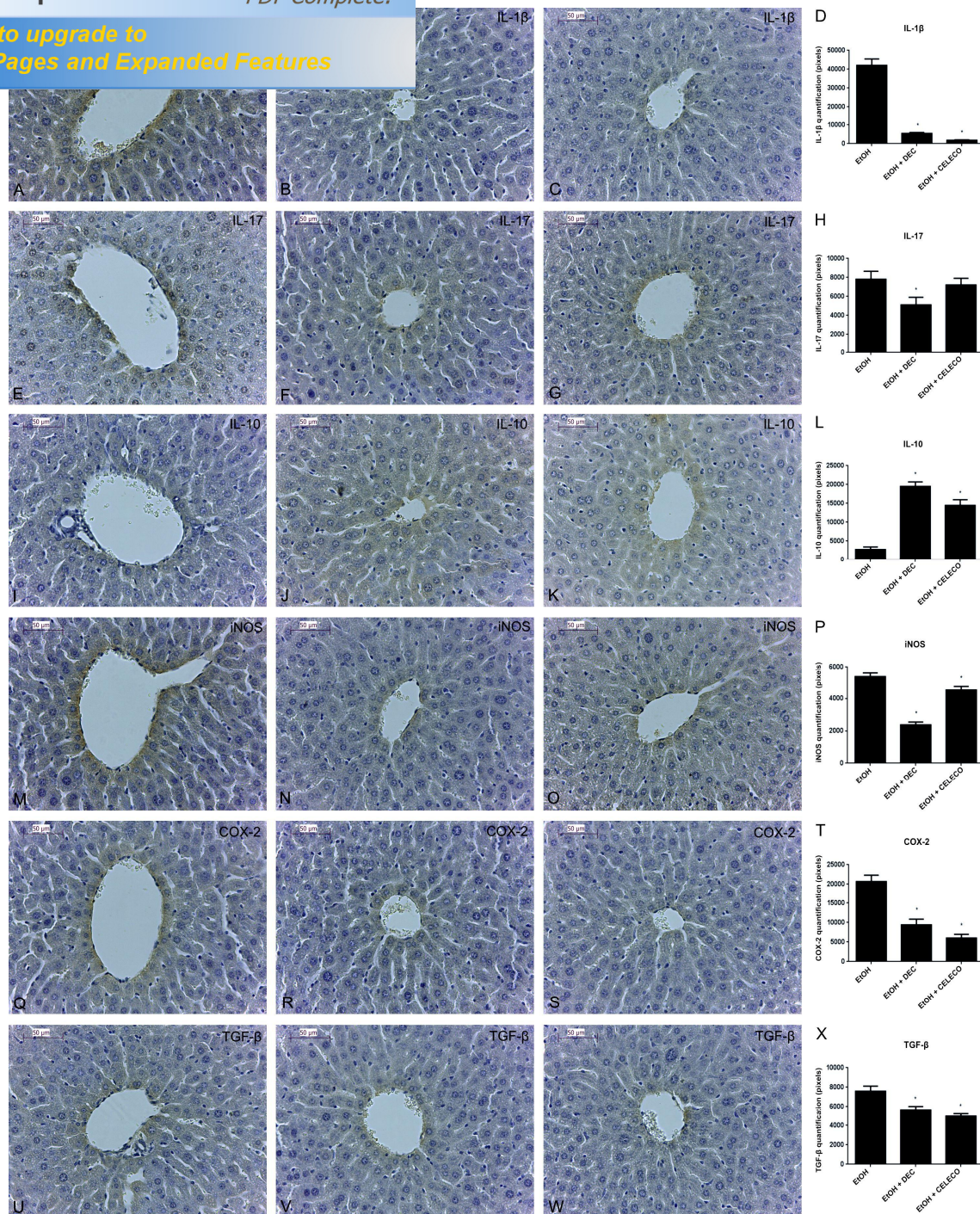


Figure 7

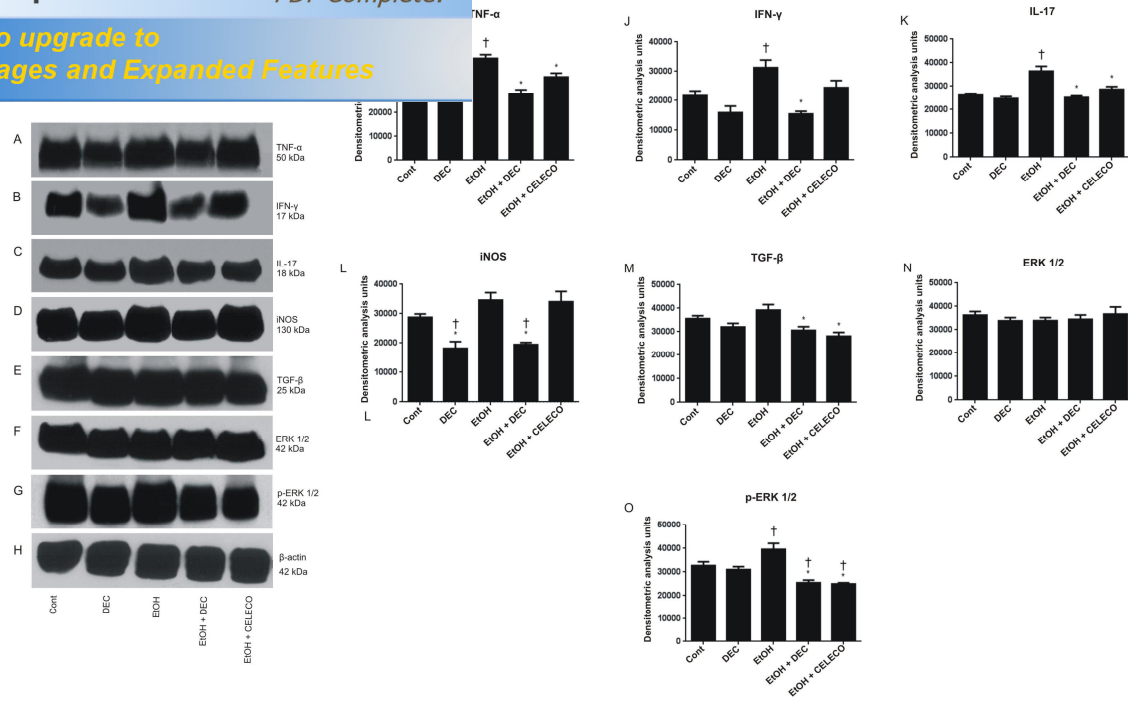


Figure 8

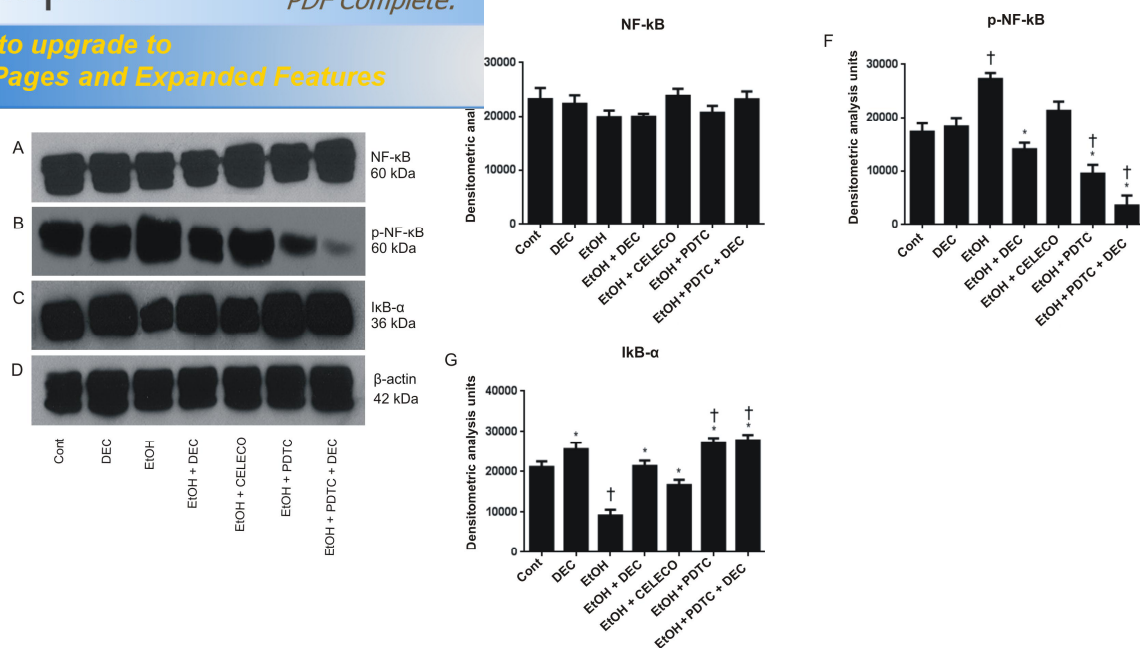


Figure 9

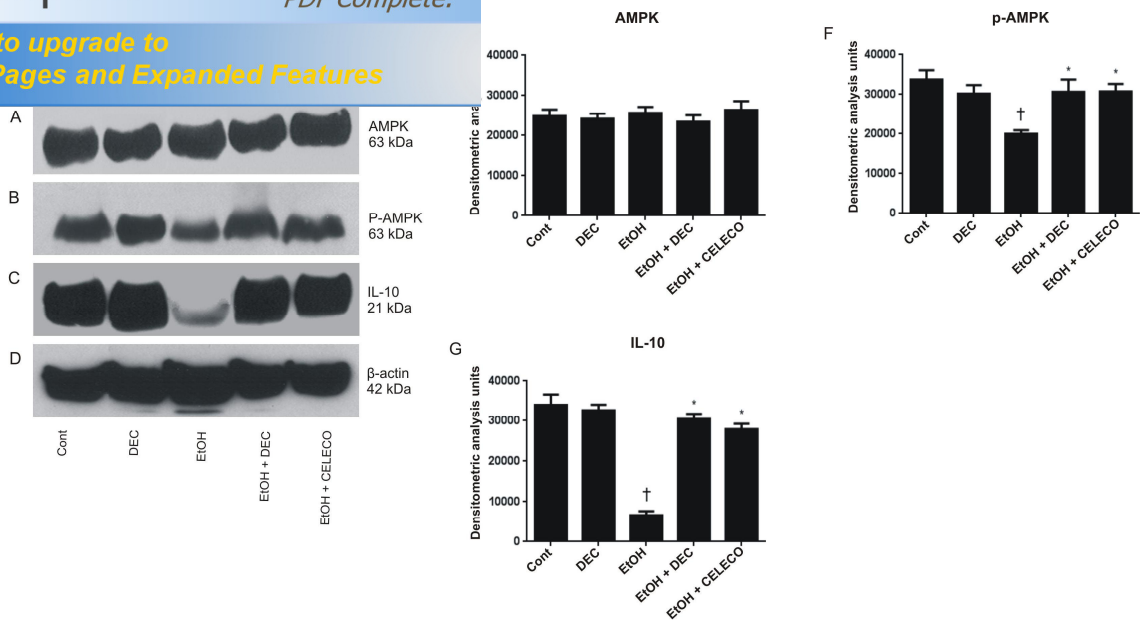


Figure 10

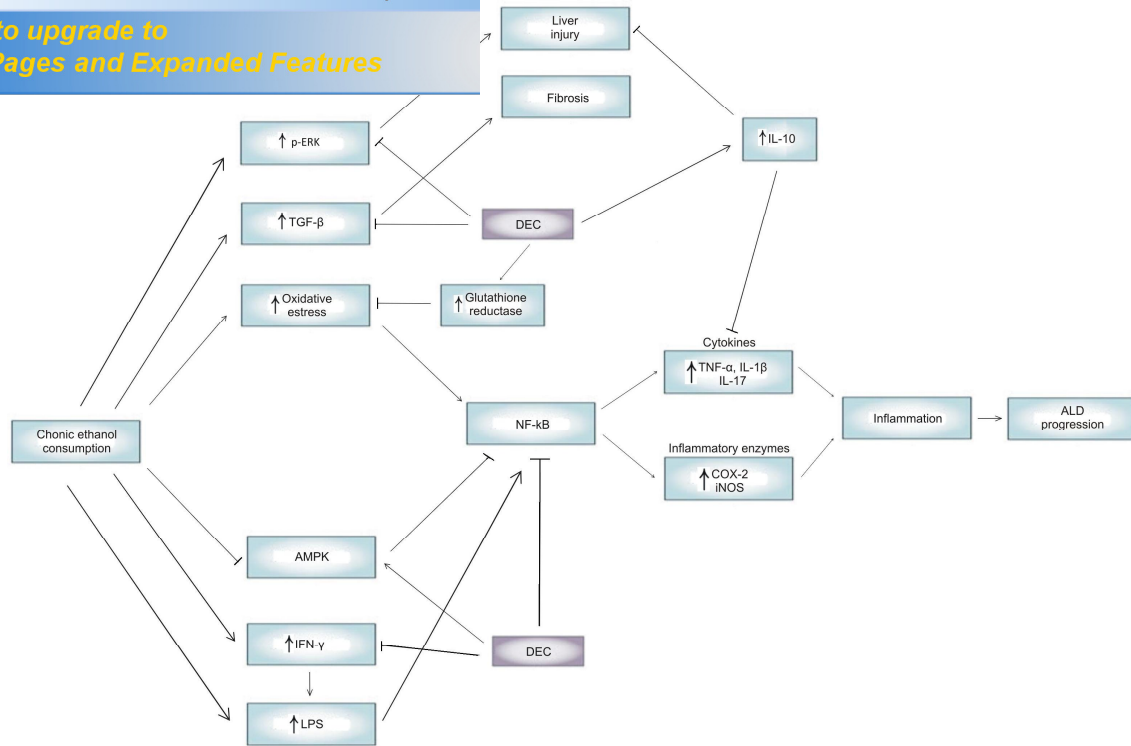


Figure 11

- Na avaliação histopatológica foi observado a eficácia do tratamento com a DEC em reduzir alterações histológicas como a esteatose, infiltrado inflamatório e áreas de necrose. Além disso, a DEC reduziu o conteúdo de fibras colágenas sugerindo uma atividade antifibrótica.
- Confirmando o que foi observado na análise histológica, a DEC foi capaz de melhorar o perfil lipídico (HDL, colesterol total e triglicerídeos) como também reduzir o marcador de dano hepático, AST, melhorando assim parâmetros bioquímicos.
- A dietilcarbamazina foi capaz de aumentar a atividade da enzima glutathionaredutase, contribuindo para diminuição do estresse oxidativo.
- O uso da DEC foi capaz de reduzir marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , TGF- β , ERK 1/2, IL-17, iNOS e COX-2) de forma significativa, além de diminuir a expressão do fator de transcrição NF-kB e aumentar a expressão da sua molécula inibitória a I κ B- α .
- O tratamento com a DEC aumentou a expressão de marcadores anti-inflamatórios (AMPK e IL-10).



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



IX

CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA

13 A 15 DE JUNHO 2013
CENTRO DE EXPOSIÇÃO DO
HOTEL MACEIO ATLANTIC

CERTIFICADO

Certificamos que
GABRIEL BARROS RODRIGUES
participou do IX CONGRESSO ALAGOANO DE BIOMEDICINA realizado nos
dias 13, 14 e 15 de junho de 2013 na categoria de CONGRESSISTA.
Carga Horário: 40hs

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO CIENTÍFICO:
1º MELHOR TRABALHO

**AValiação DO EFEITO DA DIETILCARBAMAZINA EM MODELO DE INFLAMAÇÃO
HEPÁTICA INDUZIDA PELO ALCOOL**
Rodrigues, G.B.¹, Rocha, W.S.¹, Silva, B.S.¹, Gomes, F.O.S.¹, Ribeiro, E.L.¹, França,
M.E.R.¹, Peixoto, C.A.^{1,2}.



FLÁVIO BARBOSA PACHECO JUNIOR
Presidente do Congresso



MARCOS MARCELO SANTOS BARBOSA
Presidente da Comissão Científica

REALIZAÇÃO: **CONSELHO DE PROFISSIONAIS E ESTUDANTES DE BIOMEDICINA DE Alagoas**

PATROCÍNIO:     

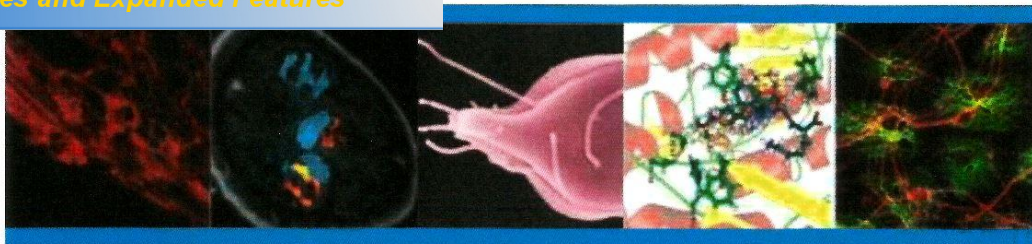
APOIO: 



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



IV Encontro Anual do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB)

Certificado

Certifico que **GABRIEL BARROS RODRIGUES** recebeu prêmio de melhor pôster, na categoria graduação, pelo trabalho **“DIETHYLCARBAMAZINE REDUCED THE NF- κ B ACTIVATION IN MODEL OF CHRONIC ETHANOL CONSUMPTION”** no IV Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 08, 09 e 10 de maio de 2013, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Coordenador do INBEB
Dr. Jerson Lima da Silva
Prof. Titular do Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ

INBEB
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem





PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

XIX Semana de Biomedicina

"O Iluminismo Científico Promovendo a Saúde"

Declaração

Declaramos para os devidos fins que o trabalho intitulado **AValiação DA ATIVIDADE DA ILICARBAMAZINA NA LESÃO HEPÁTICA INDUZIDA PELO ÁLCOOL**, de autoria de **el B. Rodrigues, Bruna S. Silva, Sura W.S. Rocha, Fabiana O.S. Gomes, Karla P.S. ossa, Edilene L. Ribeiro, Maria E.R. França, Christina A. Peixoto**, apresentado durante a **XIX na de Biomedicina – UFPE: "O Iluminismo Científico Promovendo a Saúde"**, foi premiado em **ar**. O evento foi realizado pelo Diretório Acadêmico de Biomedicina (D.A.BIOM./UFPE), no Centro **ncias Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco**, de 23 a 26 de Outubro de 2012.

Prof. Dr. **Matheus André Cavalcanti Bezerra**
Coordenador da XIX Semana de Biomedicina

André dos Santos Catena
Acad. **André dos Santos Catena**
Vice-coordenador da XIX Semana de Biomedicina
Presidente do Diretório Acadêmico de Biomedicina/UFPE