



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E
N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO ESTRESSE OXIDATIVO NA HEPATITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

RAUL PENAFORTE CORREIA DA SILVA

RECIFE

2018

RAUL PENAFORTE CORREIA DA SILVA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E
N-ACETIL-L-CISTEÍNA NO ESTRESSE OXIDATIVO NA HEPATITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

RECIFE

2018

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

- S586e Silva, Raul Penaforte Correia da.
Efeito da associação do extrato solúvel de *ascaris suum* e N-acetil-L-cisteína no estresse oxidativo na hepatite autoimune experimental / Raul Penaforte Correia da Silva. – Recife: o autor, 2018.
64 f.; il; 30 cm.
- Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina tropical.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Acetilcisteína. 2. *Ascaris suum*. 3. Estresse oxidativo. 4. Hepatite autoimune. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 088)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RAUL PENAFORTE CORREIA DA SILVA

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E N-ACETIL- L-CISTEÍNA NO ESTRESSE OXIDATIVO NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 23/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Vláudia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Pinheiro Fernandes (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV/UFPE)

*Aos meus pais, Maurício e Suely, pois não
mediram esforços para que chegássemos até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em Jesus Cristo, pois sem Ele, nada do que foi feito existiria (João 1.3). Pois “Tudo foi criado por meio dele e para ele. Ele é antes de todas as coisas. Nele, tudo subsiste” (Colossenses 1.16b,17).

Aos meus pais, Mauricio Penaforte e Suely Ferreira, pelo amor e paciência, por terem sonhado primeiro esse sonho, sem o apoio de vocês não conseguiria. O mérito dessa conclusão é nosso. E a Duce por todo afeto animal.

Aos queridos amigos, Ana Carla, Anália Guedes, Daywison Lourenço, Diego Cardoso, Edivaldo Júnior, Isabella Ralph, Jair Figueredo, Matheus Henrique, Maycon Douglas e Vanessa Justino, pessoas que sempre, ou por vezes nem tanto, mas em amor, estiveram disponíveis a ouvir e ensinar.

A Prof^a. Valdênia Souza, pela orientação, paciência (muita) e, confiança no meu trabalho, desde a iniciação científica e, agora no mestrado. E todo investimento e tempo dedicados na minha formação profissional. Que essa colaboração seja fortalecida/amadurecida.

A Prof^a. Belmira Lara e o Laboratório de Neurofisiologia, pela generosidade em colaborar nesse projeto, não medindo esforços para me auxiliar e pelos ensinamentos transmitidos. A Ricielle Lopes, pela disponibilidade em me ensinar os protocolos, mesmo com suas demandas. A David Filipe, pelo socorro oferecido, solucionando dúvidas.

A Roekson Carlos pela parceria no laboratório e auxílio na realização dos experimentos. Pelo otimismo sempre demonstrado, amizade e conselhos que se estendem a vida acadêmica.

Aos que fazem ou fizeram parte do ‘imunofeelings’, Amanda Rayssa, Cássia Nóbrega, Erica Fernandes, Gabriela Calixto, Jéssica Daniella, Letícia Melo, Luisa Yeda, Maria da Conceição, Patrícia d’Emery, Patrícia Evelyn, Weverton Alves e Wheverton Ricardo. Grato pelos conhecimentos científicos (teóricos e práticos) compartilhados e risos (muitos risos). Bom saber que cativamos e fomos cativados.

A Prof^a. Dayane Gomes, pelo auxílio nas leituras de fluorimetria, através do acesso ao Varioskan.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana em Goiana, pois não existe nada melhor do que ser acolhido por Deus, no meio do Seu povo.

A banca examinadora desta dissertação, os professores André Aires, Mariana Fernandes e Vláudia Costa, além das suplentes, professoras Iana Rafaella e Virgínia Lorena.

Obrigado pela disponibilidade e contribuições, que certamente nos auxiliaram em pontos que, porventura, não havíamos analisado da melhor forma.

Por fim, ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pela formação acadêmica a mim oferecida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudo, ímpar para a dedicação a este projeto. E ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pelo suporte técnico.

RESUMO

Estresse oxidativo e inflamação são chave nas doenças hepáticas. Hepatite autoimune é uma doença inflamatória crônica e progressiva, que há relatos de falha terapêutica. Nesse contexto, a presença de enzimas antioxidantes no *Ascaris suum* e o uso associativo de antígenos de helmintos com moléculas antioxidantes, podem modular positivamente a atividade anti-inflamatória e antioxidante nas lesões hepáticas. A associação do extrato solúvel de *A. suum* (ASC) e N-acetil-L-cisteína (NAC) atenuou a hepatite autoimune experimental (HAE) através do perfil Th2-anti-inflamatório. Entretanto, os efeitos que esta associação causa no balanço *redox* na HAE não foram esclarecidos. Para esta avaliação, foram formados os seguintes grupos experimentais: Concanavalina A foi administrada por via intravenosa (i.v.) na dose 20 mg/Kg (grupo HAE). Parte deste grupo recebeu ASC (2h após; 40 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.) (grupo HAE+ASC), e a outra parte recebeu a NAC (30 minutos; 200 mg/Kg), por via oral (v.o.) e 12 h após (grupo HAE+NAC). Parte do grupo HAE+ASC também recebeu NAC (grupo HAE+NAC+ASC). Grupo Controle recebeu apenas PBS (i.p. e i.v.). Vinte e quatro horas após a administração da Concanavalina A, o homogenato do fígado foi preparado. A lipoperoxidação foi estimada através da ligação do ácido tiobarbitúrico ao malondialdeído (MDA). Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram mensuradas através da ligação com o OPT em pH 8,0 e pH 12,0, respectivamente. A atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi determinada através da decomposição do H₂O₂ e inibição da autooxidação da epinefrina, respectivamente. Nos grupos HAE tratados com a NAC e NAC+ASC, houve redução dos níveis do MDA, bem como o aumento da atividade da SOD e da razão GSH/GSSG, em comparação ao grupo HAE. No entanto, estes parâmetros no grupo HAE+ASC foram semelhantes ao Controle e HAE. Atividade da CAT não demonstrou diferença entre os grupos de estudo. Em conjunto esses resultados demonstram que o ASC não promoveu alteração nos parâmetros do balanço *redox* avaliados na HAE, porém a NAC foi capaz de restaurar o aporte antioxidante.

Palavras-chave: Acetilcisteína. *Ascaris suum*. Estresse oxidativo. Hepatite autoimune.

ABSTRACT

Oxidative stress and inflammation are key in liver injuries. Autoimmune hepatitis is a chronic and progressive inflammatory disease, which has reported therapeutic failure. In this context, the presence of antioxidant enzymes in *Ascaris suum* and the associative use of helminth antigens with antioxidant molecules, can down modulation anti-inflammatory and antioxidant activity in liver injuries. Association *A. suum* soluble extract (ASC) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) attenuated experimental autoimmune hepatitis (EAH) through Th2-anti-inflammatory profile. However, redox balance effects that this association causes in EAH have not been clarified. Experimental groups formation, Concanavalin A (20 mg/Kg) was administered intravenously (i.v.) (EAH group). Part of this group received ASC (2 h after, 40 mg/Kg), intraperitoneally (i.p.) (EAH+ASC group), and the other part received oral NAC (30 minutes after, 200 mg/Kg) and 12 h after (EAH+NAC group). EAH+ASC group part also received NAC (EAH+NAC+ASC group). Control group received only PBS (i.p. and i.v.). Twenty-four hours after Concanavalin A administration, homogenate liver was prepared. Lipoperoxidation was estimated by thiobarbituric acid binding malondialdehyde (MDA). Reduced glutathione (GSH) and oxidized (GSSG) were measured by binding to OPT at pH 8,0 and pH 12,0, respectively. Catalase activity (CAT) and superoxide dismutase (SOD) was determined through H₂O₂ decomposition and epinephrine autoxidation inhibition, respectively. EAH groups treated with NAC and NAC+ASC there was a reduction of MDA levels, as well as the increase of SOD and GSH/GSSG ratio, compared to HAE group. However, EAH+ASC group parameters were similar EAH and Control groups. CAT activity no showed difference among study groups. Together these results showed that ASC did not promote changes in redox balance parameters evaluated in EAH, however the NAC was able to restore antioxidant reserve.

Keywords: Acetylcysteine. *Ascaris suum*. Oxidative stress. Autoimmune hepatitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de geração de espécies reativas do oxigênio na hepatite autoimune ..	19
Figura 2 – Indução da lesão hepática pela Con A através da ativação de linfócitos T e macrófagos	21
Figura 3 – Integração dos sistemas de defesa enzimático	22
Figura 4 – Estrutura química da L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutathione reduzida	25
Figura 5 – Formação dos grupos experimentais	29
Figura 1 – Níveis plasmáticos da alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) em camundongos com hepatite autoimune experimental (HAE) tratados ou não com a associação do extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> (ASC) e N-acetil-L-cisteína (NAC). # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE. Os resultados foram representados em forma de média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo	39
Figura 2 – Níveis hepáticos do malondialdeído (MDA) (A), da atividade da catalase (CAT) (B) e superóxido dismutase (SOD) (C) e da razão da glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG) (D) em camundongos com hepatite autoimune experimental (HAE) tratados ou não com a associação do extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> (ASC) e N-acetil-L-cisteína (NAC). # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE. • $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE+ASC. Os resultados foram representados em forma de média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ASC	Extrato do verme adulto de <i>Ascaris suum</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CD	Grupo de diferenciação
Con A	Concanavalina A
Grd	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HAI	Hepatite autoimune
HAE	Hepatite autoimune experimental
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
NAC	N-acetil-L-cisteína
NEM	N-etilmaleimida
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OPT	O-ftalaldeído
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócitos T auxiliar
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Hepatite autoimune	16
2.2	Hepatite autoimune experimental.....	19
2.3	Estresse oxidativo	21
2.4	Propriedades imunorregulatórias do extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i>	23
2.5	Propriedades antioxidantes e anti-inflamatória da N-acetil-L-cisteína.....	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Desenho de estudo.....	28
4.2	Extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> , Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína	28
4.3	Animais e grupos de estudo	28
4.4	Monitoramento da hepatite autoimune experimental.....	30
4.5	Eutanásia dos animais	30
4.6	Preparação do homogenato do fígado e dosagem de proteínas totais	30
4.7	Quantificação da lipoperoxidação.....	31
4.8	Níveis de glutathiona reduzida	31

4.9	Níveis de glutathione oxidada.....	31
4.10	Atividade enzimática da catalase	32
4.11	Atividade enzimática da superóxido dismutase total	32
4.12	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS.....	34
	Efeito da associação do extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> e N-acetil-L-cisteína no estresse oxidativo na hepatite autoimune experimental	
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICES	50
	APÊNDICE A – ARTIGO EM INGLÊS PARA SUBMISSÃO	50
	ANEXOS	64
	ANEXO A – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	64

1 INTRODUÇÃO

Na hepatite autoimune experimental (HAE) em murinos, NASCIMENTO et al., 2014, demonstraram que o tratamento com extrato solúvel de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) atenuou a lesão hepática acompanhada da diminuição do infiltrado leucocitário, aminotransferases, imunoglobulinas totais e perfil de resposta Th1, com indução de perfil Th2. Contudo, o ASC não atenuou a deposição do colágeno. SILVA, 2015 ao associar N-acetil-L-cisteína ao ASC no tratamento da HAE, observou redução na deposição de colágeno no tecido hepático, da síntese de interleucina (IL)-13 e óxido nítrico, com aumento de IL-5, IL-10 e TGF- β , indicando um perfil de Th2 e anti-inflamatório.

Nesse contexto, estudos demonstraram a presença de enzimas antioxidantes no *A. suum* e no *Schistosoma mansoni*, ressaltando a capacidade intrínseca em modular negativamente a resposta inflamatória (ECKELT et al., 1998; LIEBAU et al., 1997; MOURÃO et al., 2009; TSUJI et al., 2000). Na artrite autoimune experimental, o ASC reduziu a atividade inflamatória com diminuição do óxido nítrico e IL-1 β (ROCHA et al., 2008). Em modelo da asma alérgica murina, o ASC foi capaz de reduzir atividade inflamatória com diminuição dos níveis da peroxidase eosinofílica (ITAMI et al., 2005). Adicionalmente, a imunização com antígenos dos vermes de helminto potencializou o efeito antioxidante da melatonina, com diminuição do malonaldeído (MDA) e aumento da glutathiona reduzida (GSH) e da catalase (CAT) (EL-SHENAWY; SOLIMAM; ABEL-RAHMAN., 2009).

Em modelo experimental de lesão hepática crônica por tetracloreto de carbono ou intoxicação por acetaminofeno, o tratamento com a NAC alterou o *status* oxidativo e sistemas antioxidante. De modo geral, a NAC favoreceu elevados níveis de CAT, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e GSH, ao mesmo tempo houve diminuição de MDA, hidroxiprolina, glutathiona oxidada (GSSG) e espécies reativas do oxigênio (CAI et al., 2015; NISSAR et al., 2013; TERNEUS et al., 2008; TOBWALA et al., 2015). Contudo, no tratamento profilático e terapêutico com a NAC na HAE, não foram avaliados diretamente estes parâmetros do estresse oxidativo (WANG et al., 2015).

Portanto, é provável que a associação do ASC e NAC, potencialize a atividade anti-inflamatória do ASC e ocorra a restauração do aporte antioxidante promovido pela NAC. Além disso, os resultados desse estudo auxiliarão numa melhor compreensão dos mecanismos pelos quais os antígenos de helmintos atuam modulando o balanço redox frente a desordens

inflamatórias, bem como informações quanto ao balanço das moléculas oxidantes e antioxidantes na HAE.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da associação do ASC com a NAC sob o estresse oxidativo na HAE, através da determinação dos níveis do MDA (*status* oxidativo) e SOD, CAT e GSH/GSSG, (sistemas antioxidante).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hepatite autoimune

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica, de caráter progressivo, caracterizada pela presença de autoanticorpos circulantes, elevação de aminotransferases, hipergamaglobulinemia (sobre tudo IgG), bem como pelo infiltrado inflamatório (hepatite de interface) e regiões de necrose ao exame histopatológico (CZAJA, 2015). A HAI atinge todas as idades, porém comumente afeta a mulheres na idade adulta, de 30-45 anos, numa razão 1:4 de homens para mulheres (MANNS et al., 2010). A incidência no Brasil é desconhecida, mas estima-se que a prevalência é de 3,3% dentre as hepatites crônicas (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

Embora sua etiopatogênese seja pouco conhecida, semelhante a outras desordens autoimunes, a HAI apresenta causas multifatoriais, com relevante participação de fatores ambientais e falhas nos mecanismos de autotolerância em pessoas geneticamente susceptíveis (MAKOL; WATT; CHOWDHARY, 2011). Os exatos mecanismos pelos quais os danos ao fígado ocorrem não são totalmente compreendidos, no entanto, tem sido relatado que a agressão autoimune se inicia com a perda da autotolerância decorrente da lise de hepatócitos por linfócitos T CD8⁺ efetores após processo infeccioso, resultando na apresentação de autoantígenos; pelo uso de drogas e por mimetismo molecular entre antígenos próprios de agentes exógenos que compartilham determinantes antigênicos comuns (BJÖRNSSON et al., 2010; WATT; CHOWDHARY, 2011). Os linfócitos T regulatórios também desempenham um papel consolidado na manutenção da autotolerância hepática, tendo vista que sua diminuição tem sido relatada na HAI (WANG et al. 2012; CARAMBIA; HERKEL 2010; JONULEITAND; SCHMITT, 2003).

No processo de lesão hepática quando há produção de moléculas pró-oxidantes a via de sinalização NF-κB é ativada principalmente nas células de Kupffer, induzindo a secreção de mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e o gene do óxido nítrico sintase induzida, que sintetiza óxido nítrico, extremamente lesivo as células. O consumo das reservas antioxidantes e o excesso da reação inflamatório produz um *feedback* positivo, com mais produção de ROS, que lesa o DNA e induz apoptose celular, que por sua vez culmina em mais ativação celular por meio do reconhecimento dos corpos apoptóticos via células de Kupffer. Essas ROS que induzem ativação das células estreladas hepáticas, estimulando-as a produzirem ROS (CZAJA, 2016a), **Figura 1**. Esse processo de

retroalimentação induz exaustão do aporte antioxidante e conduz a cronicidade e modificações morfológicas e funcionais do órgão.

Em um artigo de revisão, LIBERAL et al. (2016) sistematizam o eventos imunológicos desencadeados na HAI. Inicialmente ocorre apresentação de autoantígenos pelas células apresentadoras de antígenos, via MHC II aos linfócitos T CD4⁺ *naive*, que a depender do segundo sinal. Quando há IL-12 ou IL-4, há diferenciação em Th1 ou Th2, respectivamente, e a presença de IL-6 e TGF- β , conduz os linfócitos Th0 à se diferenciarem em Th17. Células Th1 secretam IFN- γ que podem atuar em células de Kupffer, estimulando-os a secretarem IL-1 e TNF- α , bem como IL-2 e IFN- γ secretadas por Th1, irão induzir expressão de MHC I, seguido por ativação de linfócitos T CD8⁺, mecanismos efetores estes direcionados aos hepatócitos. Já as células Th2, secretam principalmente IL-4, o que promove ativação de linfócitos B e troca isotípica de anticorpos, que irão ligar-se aos hepáticos que desencadearão a citotoxicidade dependente de anticorpos, via células natural killer. No que compete às células Th17, as mesmas secretam citocinas (IL-17, IL-22 e TNF α) que contribuem para o processo inflamatório da HAI. Todo esse contexto de inflamação é decorrente do desequilíbrio dos mecanismo regulatórios, principalmente associado as células T regulatórias (Treg).

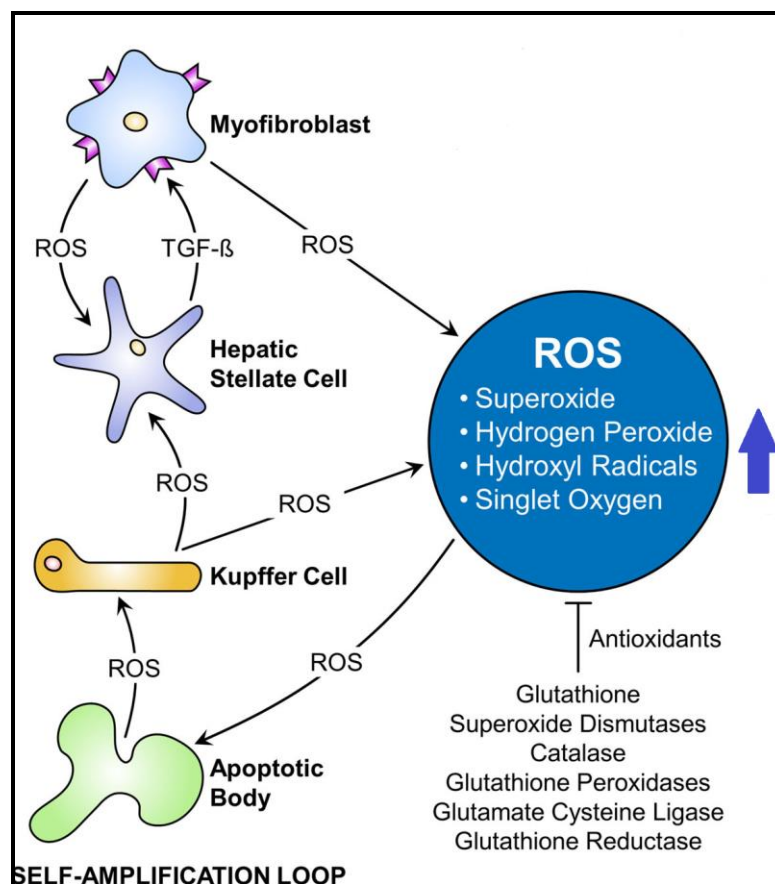
Entre disfunções hepáticas, a hepatite autoimune, está relacionada à deposição de matriz extracelular que é dependente de macrófagos com ativação alternativa e não os clássicos. Além disso, a participação das células estreladas hepáticas, que tomam um fenótipo de miofibroblasto e depositam colágeno no parênquima hepático é essencial (ANDRADE et al., 2015). A maior consequência da hepatite autoimune é a sua progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular, visto que ela é fator de risco para o seu estabelecimento (CZAJA, 2014).

De acordo com o perfil de autoanticorpos produzido, a HAI pode ser classificada em três categorias: **HAI tipo I**) caracterizada pela presença de anticorpos antinúcleo (ANA) e/ou anticorpos antimúsculo liso (SMA); **HAI tipo II**) caracterizada pela presença de anticorpos antimicrosoma de fígado e rim (LKM-1) e baixos níveis de anticorpos LKM-3, com ou sem anticorpos ANA e SMA; e **HAI tipo 3**) caracterizada pela presença de autoanticorpos contra antígenos solúveis do fígado/fígado e pâncreas, com ou sem anticorpos ANA e SMA (MANNS et al., 2010; CZAJAb, 2016; AIZAWA; HOKARI, 2017). O carcinoma hepatocelular ocorre em 4% dos pacientes com HAI tipo 1, e a probabilidade de desenvolvimento desta neoplasia é de 2,9% (MANNS et al., 2010).

O prognóstico da HAI depende do grau de atividade da doença e da presença ou não de cirrose. Pode ter uma apresentação aguda e grave, que pode ser confundida com hepatite viral ou tóxica, e, às vezes pode se apresentar como uma insuficiência hepática aguda. Além disso, a doença crônica não diagnosticada pode apresentar uma exacerbação espontânea e manifestar-se de forma aguda e fatal. Sem tratamento mais de 40% dos pacientes com a forma aguda da doença evoluem para óbito em até 6 meses após o diagnóstico e os que sobrevivem, frequentemente, desenvolvem complicações secundárias como cirrose e varizes esofagianas (MANNS et al., 2010; CZAJA, 2016; AIZAWA; HOKARI, 2017). Mesmo com o tratamento convencional, monoterapia com prednisona ou em combinação com azatioprina, a cirrose costuma ocorrer em 40% dos pacientes tratados e é tida como um fator de risco para o desenvolvimentos do carcinoma hepatocelular (MANNS et al., 2010; AIZAWA; HOKARI, 2017). A inabilidade de suprimir totalmente a atividade inflamatória em até 12 meses de tratamento está relacionada com sua evolução para cirrose em 54% dos casos e morte ou transplante hepático em 15% dos casos (CZAJA, 2009).

Dessa forma, devido os relatos de falha terapêutica, toxicidade aos fármacos utilizados, opções terapêuticas que suplementem ou atuem como adjuvantes no tratamento convencional, que utilizam de mecanismo de indução de homeostase hepática, estão começando a surgir, tais como a geração de células T regulatórias e de citocinas imunossupressoras e restauração do aporte antioxidante para tratamento de doenças autoimunes (CARAMBIA; HERKEL, 2010; CZAJA, 2016).

Figura 1 - Mecanismo de geração de espécies reativas do oxigênio na hepatite autoimune



Fonte: CZAJA, 2016a (Adaptado). Os eventos decorrentes destas causas são caracterizados com inflamação e acompanhados do aumento das espécies reativas do oxigênio (ROS). As ROS induzem apoptose dos hepatócitos e os corpos apoptóticos destas, por sua vez, ativam células de Kupffer e células estreladas hepáticas induzindo-as a produzirem mais ROS. A manutenção desse estímulo oxidante e a presença do fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) promovem transdiferenciação das células estreladas em um fenótipo de miofibroblasto, contribuindo para o aumento da produção das ROS. A manutenção desse perfil oxidante induz progressão para a lesão crônica e consequente cirrose e desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

2.2 Hepatite autoimune experimental

A hepatite autoimune experimental é induzida mediante a administração intravenosa da lectina Concanavalina A (Con A), extraída da *Canavalia ensiformis* (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992). Esse modelo experimental de lesão hepática mimetiza de forma satisfatória as desordens hepáticas imunomediadas, sendo bastante aceito e adequado para o estudo fisiopatológico da hepatite autoimune e prospecção de novas ferramentas terapêuticas (CAI et al., 2015; LIU et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2014; WANG et al., 2012).

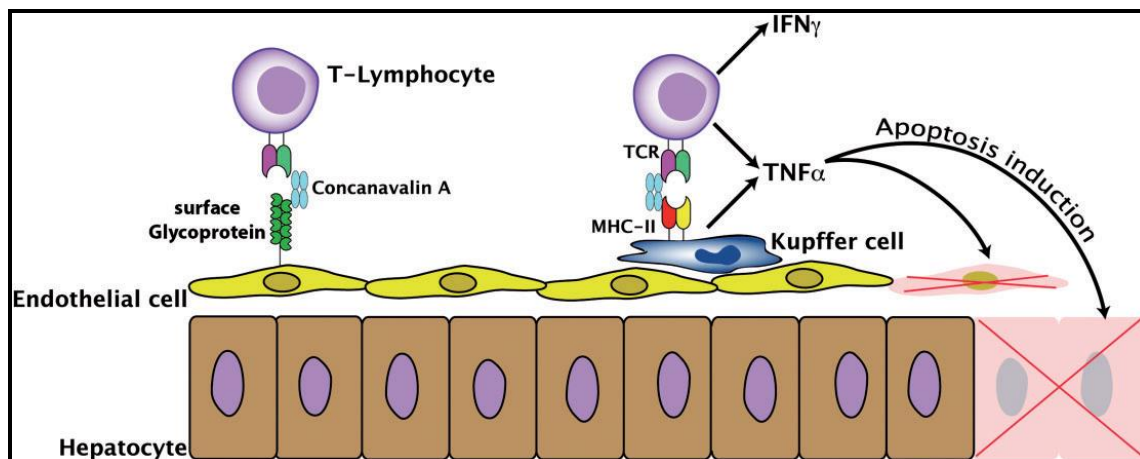
Inicialmente, TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992, verificaram que a lesão hepática induzida pela Con A é dose-dependente, com a participação de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. No exame de microscopia eletrônica, foi observada adesão de leucócitos ao endotélio e aos hepatócitos com desarranjo estrutural nos mesmos, bem como interação macrófago-linfócito.

Diversos estudos esclareceram a sequência dos eventos que desencadeiam a lesão hepática na HAE, sumarizado na **Figura 2**. Cerca de quinze minutos após a administração intravenosa da Con A, a lectina liga-se ao receptor de manose nas células endoteliais sinusoidais, lesionando sua membrana através da ativação de linfócitos T e causando liberação de citocinas quimiotáticas. Quatro horas após a administração da Con A, a lectina liga-se as células de Kupffer que a apresentam via MHC de classe II ao receptor dos linfócitos T, induzindo uma hiperativação inespecífica destas células. Nesse contexto, as citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α são as citocinas mais relevantes na fisiopatogênese da HAE, resultam na indução de apoptose nos hepatócitos (HEYMANN et al., 2015; KÜSTERS et al., 1996; SCHÜMANN et al., 2000; WANG et al., 2012).

SHIRIN et al. (2010) investigaram o papel do estresse oxidativo na patogênese da HAE, demonstrando que este componente atua de forma secundária aos eventos imunomediados decorrentes da administração da Con A. O processo de lipoperoxidação, ocorre doze horas após sua administração e permanece por até vinte e quatro horas. A participação do estresse oxidativo na HAE foi demonstrada através da administração prévia de moléculas com atividade antioxidante (“free radical scavenger”) que atenuou a lesão neste modelo.

Recentemente tem sido investigado o papel dos marcadores hepáticos do *status* oxidativo e sistemas antioxidante na HAE, frente a diversas estratégias terapêuticas que visam regular os mecanismos imunológicos e oxidantes na HAE, sobre tudo as ROS. Nesse sentido, moléculas derivadas de plantas, como shikonin e revasterol e o ácido alfa-lipóico, regulador do metabolismo mitocondrial têm sido alvo de estudo frente a HAE. De forma geral, estas moléculas foram capazes de prevenir a resposta inflamatória e oxidante, induzindo aumento de citocinas inflamatórias, bem como aumentando níveis de moléculas dos sistemas antioxidantes e da atividade enzimática (FEI et al., 2016; LIU et al., 2016; ZHOU et al., 2015).

Figura 2 – Indução da lesão hepática pela Con A através da ativação de linfócitos T e macrófagos



Fonte: HEYMANN et al., 2015.

2.3 Estresse oxidativo

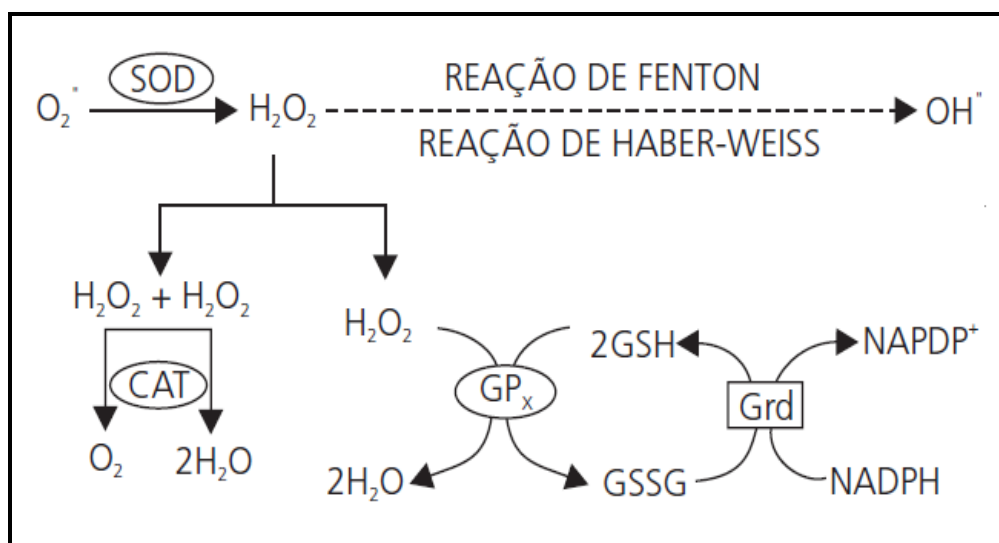
Espécies reativas do oxigênio (ROS) são um grupo variado de moléculas, como os radicais livres ou íons derivados da molécula de oxigênio (O_2), que atuam em diversas vias de sinalização celular e na eliminação de microrganismos patogênicos (SERVIDDIO; BELLANTI; VENDEMIALE, 2013). Estas são geradas fisiologicamente no metabolismo aeróbico nas mitocôndrias, através da cadeia transportadora de elétrons. Nesse processo para obtenção de energia, a molécula de O_2 sofre quatro reduções e posteriormente recebe quatro moléculas de H^+ , pela oxidação do citocromo c, resultando em H_2O e energia na forma de ATP. Cerca de 2 a 5 % desse oxigênio é desviado, estando disponível para sofrer reduções univalente, gerando as ROS. Em condições fisiológicas a célula utiliza de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, a fim de controlar a produção destas moléculas mantendo assim a homeostase (BARBOSA et al., 2010).

O estresse oxidativo é o favorecimento de estímulos pró-oxidantes, quando a capacidade de contenção destas espécies de oxigênio supera a ação das moléculas antioxidantes, resultando em lesão das membranas plasmáticas, proteínas e DNA da célula (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997). Dentre estas espécies, temos o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) gerado pela redução do O_2 e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), potencialmente lesiva, sendo formada através da reação de dismutação $O_2^{\bullet -}$ pela enzima superóxido dismutase (SOD). Por sua vez o H_2O_2 quando se liga aos íons metais Fe/Cu (reação de Fenton), por meio da oxidação destas moléculas, gera o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), molécula esta extremamente lesiva às biomoléculas, a qual não existe neutralizador. Além

disso, os íons Fe/Cu catalisam a ligação do H_2O_2 e $\text{O}_2^\bullet$ na formação de mais $\text{OH}^\bullet$ (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007), esquematizados na **Figura 3**.

Em contrapartida, é necessário que essas moléculas sejam removidas do sistema para evitar lesão celular e tissular e manutenção da homeostase. Dentre essas moléculas antioxidantes, como ilustrado na **Figura 3**, a principal é a glutathiona reduzida (GSH) que atua na conjugação e eliminação das ROS às custas da sua oxidação (GSSG) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA., 2008). Além da GSH, o organismo dispõe das vitaminas A, C e E, bem como as enzimas SOD e catalase (CAT), esta catalisando a reação de hidrólise do H_2O_2 em H_2O . Este último processo também é realizado pela glutathiona peroxidase (GP_x) à custa da conversão da GSH a GSSG. Assim, é fundamental a atuação da glutathiona redutase (Grd) para a recuperação da GSH (BARBOSA et al., 2010; SERVIDDIO; BELLANTI; VENDEMIALE, 2013).

Figura 3 - Integração dos sistemas de defesa enzimático



Fonte: BARBOSA et al., 2010 (Adaptado). Legenda: radical ânion superóxido ($\text{O}_2^\bullet$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$); superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutathiona peroxidase (GP_x); glutathiona reduzida (GSH); glutathiona oxidada (GSSG); glutathiona redutase (Grd); fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAPDP^+) e fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida (NADPH).

Após o contato com o agente lesivo, ocorre aumento da respiração celular nas mitocôndrias das células de Kupffer, neutrófilos e hepatócitos, o que eleva a produção das ROS. As ROS são capazes de induzir dano no DNA, carboidratos e nas membranas celulares, por meio da peroxidação dos ácidos graxos insaturados, formando produtos aldeídos, tal como o malondialdeído (MDA), produto secundário a peroxidação das membranas celulares

(ANDRADE et al., 2015; CENTER, 2004; DA COSTA SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011; ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

O fígado é a maior glândula do organismo humano, desempenhando funções metabólicas e de detoxificação de xenobióticos e sua capacidade tolerogênica é extremamente importante para a manutenção da homeostase sistêmica. Estímulos externos que venham alterar a homeostase hepática, além de modificar o ambiente hepático, prejudica suas funções e reflete em todo organismo (ANDRADE et al., 2015). Consequente à liberação de ROS, há ativação da via de sinalização para genes inflamatórios nas células de Kupffer, principalmente a do NF- κ B, que induz a secreção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α), amplificando o processo de inflamação. A manutenção desses estímulos pró-inflamatórios e antioxidantes, conduzem o processo inflamatório para um estado crônico, com posterior agravamento no quadro de cirrose hepática e possível progressão para um quadro de carcinoma hepatocelular (ANDRADE et al., 2015; CZAJA, 2014).

2.4 Propriedades imunorregulatórias do extrato solúvel de *Ascaris suum*

Tem sido demonstrado que diferentes componentes do extrato de vermes de *A. suum* são capazes de modular a resposta imune para antígenos não relacionado ao verme. A administração conjunta do extrato do ASC com a ovalbumina, resultou na supressão da reação imediata e da reação tardia de hipersensibilidade, acompanhada pela inibição da produção de IgE e subtipos e IgG anti-OVA (FERREIRA; ELIANA S; MACEDO., 1995; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002). Os componentes de alto peso molecular de *A. suum* também inibiram a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40) e MHC de classe II em células apresentadores de antígenos (SILVA et al., 2006) e induziu efeitos tolerogênicos.

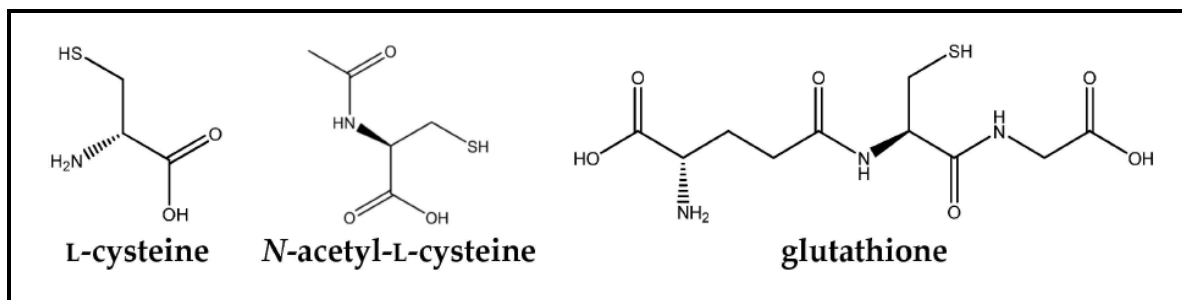
Na asma alérgica, o ASC tem um profundo efeito inibitório. Neste modelo, foi verificado que o pré-tratamento com ASC levou à inibição do perfil Th2 (diminuição de eosinófilos, redução IL-5 e IL-4 no lavado broncoalveolar e os níveis de IgE total e IgE específica para o alérgeno (LIMA et al., 2002) e que transferência adotiva de células ASC-específicas, linfócitos T regulatórios (CD4⁺, CD25⁺, e FoxP3⁺) e linfócitos T (CD8⁺ $\gamma\delta$ e TCR⁺), foram capazes de modular negativamente a alergia e elevar os níveis de IL-10 e TGF- β , revelando que o mecanismo de ação do ASC nesse contexto é via linfócitos T regulatórios (ARAÚJO et al., 2010) e dependente de linfócitos T.

Em relação à capacidade imunossupressora do ASC em modelos de hipersensibilidade autoimune foi observado que na artrite autoimune experimental, o ASC foi administrado por via intraperitoneal ou oral, antes ou depois da indução da artrite, levando a diminuição da produção de IL-1 β e óxido nítrico (ROCHA et al., 2008). Na HAE, os efeitos do ASC foram avaliados de forma profilática e terapêutica. Em ambos os esquemas, o ASC restaurou os níveis das aminotransferases, imunoglobulinas totais e o peso do fígado, no entanto, no grupo terapêutico o reestabelecimento foi mais tardio. Nos grupos tratados houve uma redução do infiltrado inflamatório, com elevada produção de IL-4, IL-10 e IL-13 e menor produção de IFN- γ (NASCIMENTO et al., 2014). SILVA, 2015 observou aumento de IL-5 e TGF- β , indicando um perfil de Th2 e anti-inflamatório e aumento de células com perfil inibitório (Treg) em camundongos com HAE e tratados com ASC.

Estudos identificaram enzimas antioxidantes no *A. suum*, CAT e glutathione-S-transferase. Esse fato ressalta a capacidade intrínseca deste helminto em modular a reposta oxidante do hospedeiro, como um mecanismo de evasão, garantindo o sucesso da infecção (ECKELT et al., 1998; LIEBAU et al., 1997). Diversos estudos com helmintos, principalmente o *S. mansoni*, demonstraram que a imunização com antígenos desse verme e posterior infecção em camundongos, foi capaz de diminuir a carga parasitária (EL-SHENAWY; SOLIMAM; ABEL-RAHMAN., 2009; MOURÃO et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que a imunização com antígenos deste verme potencializa o efeito antioxidante da melatonina, com diminuição do MDA e aumento da GSH e da atividade da CAT.

2.5 Propriedades antioxidantes e anti-inflamatória da N-acetil-L-cisteína

A NAC é uma droga com conhecido efeito pleiotrópico, utilizada na prática clínica por diversas décadas como agente mucolítico (ANDRADE et al., 2015), no tratamento da hepatotoxicidade por acetaminofeno (KHAYYAT et al., 2016) e em diversos modelos animais, como a doença alcoólica (CARO et al., 2014) e fibrose (NISSAR et al., 2013). Esses efeitos são decorrentes da presença do aminoácido cisteína na composição química da NAC, doando esse aminoácido para a biossíntese da GSH, bem como a presença do grupamento sulfidril (-SH) também chamado de grupo tiol (**Figura 4**). O aumento dos tióis está associado a melhora do balanço *redox* celular (ANDRADE et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura química da L-cisteína, N-acetil-L-cisteína e glutathiona reduzida

Fonte: ANDRADE et al., 2015.

Quanto à melhora da intoxicação por acetaminofeno, foi demonstrado que a NAC atua nos hepatócitos, restaurando os níveis de GSH, inibindo a lipoperoxidação e eliminando as ROS (TOBWALA et al., 2015). ALTURFAN et al., 2012 em modelo de intoxicação por acrilamida, após o tratamento com a NAC, resultou no menor recrutamento de neutrófilos, diminuição dos níveis de MDA e de colágeno, seguido pelo aumento de GSH. Por sua vez, em resposta a doença granulomatosa, a NAC reduziu a fibrose associada aos granulomas de *S. mansoni* e modulou negativamente a produção de IFN- γ e óxido nítrico com aumento de IL-10 (AIRES et al., 2012).

Em modelo experimental de lesão hepática crônica por tetracloreto de carbono, o tratamento com a NAC alterou o *status* oxidativo e sistemas antioxidante, reduzindo os níveis de MDA e hidroxiprolina, bem aumento nos níveis de GSH, GPx e atividade da CAT e SOD, em relação aqueles que não receberam NAC (NISSAR et al., 2013). O que ressalta a capacidade antioxidante e antifibrótica da NAC.

SILVA, 2015 ao associar a NAC ao esquema terapêutico do ASC na HAE, observou redução na deposição de colágeno no tecido hepático e na síntese da IL-13 e óxido nítrico, com aumento de IL-5, IL-10 e TGF- β , indicando um perfil de Th2 e anti-inflamatório. Ainda no modelo da HAE, o tratamento profilático e terapêutico com a NAC (WANG et al., 2015), resultou em diminuição dos marcadores de lesão hepática (aminotransferases), juntamente com redução do infiltrado inflamatório, seguido por redução das citocinas IL-2 e IL-6, TNF- α , IFN- γ , bem como a redução do NF- κ B. Esses resultados apontam para uma redução do estímulo pró-inflamatório e pró-oxidante em hepatócitos e células de Kupffer. No entanto, não foram avaliados diretamente os parâmetros do balanço *redox*.

Portanto, é provável que a associação do ASC e NAC, potencialize a atividade anti-inflamatória do ASC e ocorra a restauração do aporte antioxidante promovido pela NAC. Além disso, os resultados desse estudo auxiliarão numa melhor compreensão dos mecanismos

pelos quais os antígenos de helmintos atuam modulando o balanço redox frente a desordens inflamatórias, bem como informações quanto ao balanço das moléculas oxidantes e antioxidantes na HAE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis hepáticos de moléculas do *status* oxidativo (MDA) e sistemas antioxidante (CAT, SOD e GSH/GSSG) em camundongos com hepatite autoimune experimental submetidos, ou não, ao tratamento associativo do extrato solúvel de *Ascaris suum* e a N-acetil-L-cisteína, em comparação aos camundongos tratados apenas com o extrato solúvel de *Ascaris suum* ou com a N-acetil-L-cisteína.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar os níveis hepáticos de moléculas do *status* oxidativo (MDA) e sistemas antioxidante (CAT, SOD e GSH/GSSG) entre os seguintes grupos de animais:

- Camundongos com hepatite autoimune experimental em relação aos tratados com a associação do extrato solúvel de *Ascaris suum* e N-acetil-L-cisteína;
- Camundongos com hepatite autoimune experimental em relação aos tratados apenas com extrato solúvel de *Ascaris suum*;
- Camundongos com hepatite autoimune experimental em relação aos tratados apenas N-acetil-L-cisteína;
- Camundongos com hepatite autoimune experimental tratados com a associação do extrato solúvel de *Ascaris suum* e N-acetil-L-cisteína em relação aos tratados apenas com extrato solúvel de *Ascaris suum* ou apenas com N-acetil-L-cisteína.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho de estudo

Realizou-se um estudo experimental, onde grupos de camundongos isogênicos machos (BALB/c) foram submetidos à indução da HAE. Alguns grupos foram submetidos ao tratamento associativo com NAC e/ou com o ASC, e outro grupo apenas com PBS (grupo controle). Os animais apresentaram o mesmo tempo de vida, fizeram parte da mesma linhagem e foram criados sob as mesmas condições. Devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção avaliada. Como vantagens do estudo, além de condições controladas de observação, o modelo experimental utilizado mimetiza a doença autoimune hepática humana. Entretanto, não é possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

4.2 Extrato solúvel de *Ascaris suum*, Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína

O extrato de vermes adultos de *A. suum* foi produzido segundo protocolo de SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002. Brevemente, vermes adultos de *A. suum* foram lavados em solução salina e homogeneizados em tampão borato (BBS), pH 8,0, em um aparelho de Ultra-Turrax (Janke e Kunkel, Staufen, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 10.000 *g* durante 1 h. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 400 mL de BBS e agitado overnight, a 4 °C. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante dialisado contra água destilada overnight, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 10.000 *g*, por 2 h e liofilizado em alíquotas. A alíquota foi ressuspensionada em PBS 0,01 M, pH 7,2, a uma concentração de 2 mg/mL, e filtrada em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 µm. O ASC foi administrado na dose de 40 mg/Kg (NASCIMENTO et al., 2014).

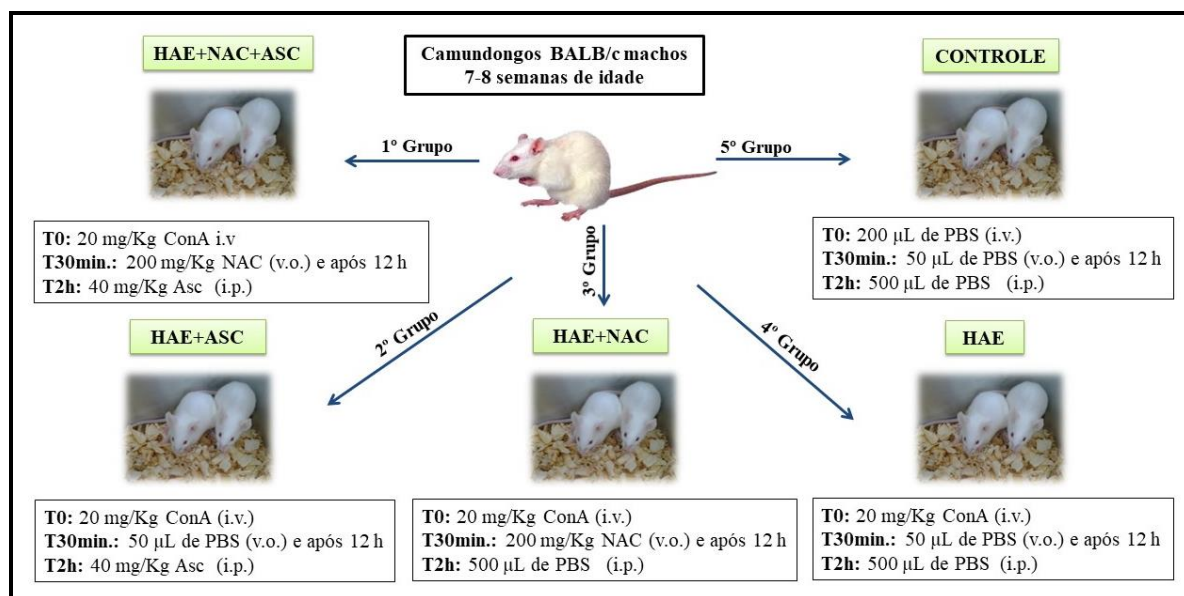
A Concanavalina A tipo IV (C2010, Sigma-Aldrich, EUA) e a N-acetil-L-cisteína (NAC) (A7250, Sigma-Aldrich, EUA) foram ressuspensionadas em PBS 0,01 M, pH 7,2, a uma concentração de 2 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente. Foram filtradas em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 µm. A Con A foi administrada por via intravenosa na dose de 20 mg/Kg (NASCIMENTO et al., 2014) e a NAC foi administrada por via oral na dose de 200 mg/Kg (SILVA, 2015).

4.3 Animais e grupos de estudo

Foram utilizados camundongos isogênicos machos, da linhagem BALB/c, com 7-8 semanas de idade, provenientes do Biotério de Criação e Manutenção de Animais de Laboratório, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas, sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro) e receberam água e alimento *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (nº 23076.041705/2015-93).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=5). Para indução da HAE, a Con A foi administrada por via intravenosa (i.v.) na dose 20 mg/Kg (grupo HAE). Parte deste grupo recebeu ASC (2h após; 40 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.) (grupo HAE+ASC) e a outra parte recebeu a NAC (30 minutos; 200 mg/Kg), por via oral (v.o.) e após 12 h (grupo HAE+NAC). Parte do grupo HAE+ASC também recebeu NAC (grupo HAE+NAC+ASC). Grupo Controle recebeu apenas PBS (i.p. e i.v.). O protocolo experimental foi idealizado a partir dos estudos de TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992, SILVA, 2015 e NASCIMENTO et al. (2014), foi executado conforme orientações no esquema abaixo (Figura 4).

Figura 5 - Formação dos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: hepatite autoimune experimental (HAE); N-acetil-L-cisteína (NAC); extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC); via intravenosa (i.v.); via intraperitoneal (i.p.); via oral (v.o.); tempo zero (T0); tempo de trinta minutos após o T0 (T30min.) e tempo de duas horas após o tempo zero (T2h).

4.4 Monitoramento da hepatite autoimune experimental

O controle da indução da HAE, foi monitorada através das aminotransferases séricas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) 24 h após a indução da HAE. A coleta sanguínea foi realizada pela veia safena lateral (0,2-0,4 mL de sangue) em tubos com EDTA. As amostras foram centrifugadas a 479 g durante 5 minutos. O plasma foi coletado e armazenado a -20°C.

Os níveis das aminotransferases (ALT e AST) foram quantificados pela metodologia de Frankel e Reitman (Labtest, BRA) (108 e 109, Labtest, Brasil). Os resultados foram expressos em U/L, em forma de média de 5 animais/grupo $\pm$ desvio padrão.

4.5 Eutanásia dos animais

No tempo 24 horas após indução da HAE, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fígados foram removidos cirurgicamente e destinados para preparação do homogenato e obtenção do sobrenadante deste, para determinações bioquímicas.

4.6 Preparação do homogenato do fígado e dosagem de proteínas totais

O fígado de cada animal foi homogeneizado em 10mL de tampão Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2, a 4°C, contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (P7626, Sigma-Aldrich, EUA) e 1 mM ortovanadato (S6208, Sigma-Aldrich, EUA). O fígado foi homogeneizado em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen em Turrax (Yamato, Japão) em gelo durante 1 min em intervalos de 20 segundos. Posteriormente, foi centrifugado a 10 000 g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante do homogenato do fígado foi coletado em diferentes alíquotas e armazenado a -80°C.

A concentração das proteínas totais foi determinada por meio do método do Ácido Biciconínico (SMITH et al., 1985), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) (A2153, Sigma-Aldrich, EUA) como padrão, sendo o limiar de detecção do teste de 0,03125-2 mg/mL. Brevemente, em placas de 96-poços (3590, Costar, EUA) foram adicionados 25 μ L de cada amostra (diluída em 1:50), em triplicata, seguido da adição de 200 μ L da solução reveladora

(BCA e sulfato de cobre 0,16 M). As placas foram lidas em 450 nm em um leitor de ELISA automatizado.

4.7 Quantificação da lipoperoxidação

Os níveis da lipoperoxidação foram determinados segundo OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979. O ensaio baseia-se na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) se ligar a lipídios oxidados, dentre eles, o malondialdeído (MDA). A ligação forma um complexo rosa, mensurado por espectrofotometria em 532 nm. Sobrenadante do homogenato do fígado (200 µL) foram adicionados em tubos de ensaios, seguida da adição sequencial de 80 µL de dodecil sulfato de sódio 8,1%, 600 µL de ácido acético pH 3,5 a 20%, e 600 µL de solução aquosa do TBA 0,8%. A mistura foi então colocada em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Os tubos foram resfriados e seguiu-se com adição de 600 µL de *n*-butanol. Os mesmos foram centrifugados a 1 000 *g* por 10 minutos e a parte orgânica (sobrenadante) foi adicionada em triplicata em placa de 96-poços. As placas foram lidas em 532 nm em um leitor de ELISA automatizado. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína com referência a uma curva padrão de 1,1,1,3 tetramethoxypropane (108383, Sigma-Aldrich, EUA), com limiar de detecção de 3,25-208,5 nmol/L.

4.8 Níveis de glutathiona reduzida

Os níveis de GSH foram determinados conforme descrito em HISSIN; HILF, 1976. A reação baseia-se na ligação do *O*-ftalaldeído (OPT) a molécula da GSH, em pH 8,0. Sobrenadante do homogenato do fígado (50 µL) foi adicionado em eppendorf contendo 450 µL PBS 100 mM, pH 8,0 e EDTA 5 mM, seguida da adição de 50 µL desta mistura, em triplicata, em placa de 96-poços preta contendo 140 µL de PBS. A reação foi desenvolvida pela adição de 10 µL do OPT. A placa foi homogeneizada durante 5 min e incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. A fluorimetria foi determinada em espectrofluorímetro em 420 nm, com 350 nm de excitação. Os resultados foram obtidos em µmol/mg de proteína com referência a uma curva padrão de GSH (G4251, Sigma-Aldrich, EUA), com limiar de detecção de 1,01-65,07 µmol/L, e expressos em forma de razão GSH/GSSG.

4.9 Níveis de glutathiona oxidada

Os níveis de GSSG foram determinados conforme descrito em HISSIN; HILF, 1976. A reação baseia-se da interação da GSSG com o OPT, em pH 12,0. E na inibição da interação GSH-OPT, através da ligação da molécula de GSH com a *N*-etilmaleimida (NEM). NEM 0,04 M (04260, Sigma-Aldrich, EUA) (20 µL) foi adicionada em eppendorf contendo 50 µL do sobrenadante do homogenato do fígado e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 430 µL de NaOH 0,1 M, seguida da adição de 50 µL desta mistura, em triplicata, em placa de 96-poços preta contendo 140 µL de NaOH. A reação foi desenvolvida pela adição de 10 µL do OPT (79760, Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi homogeneizada durante 5 min e incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. A fluorometria foi determinada em espectrofluorímetro em 420 nm, com 350 nm de excitação. Os resultados foram obtidos em µmol/mg de proteína com referência a uma curva padrão de GSSG (G4501, Sigma-Aldrich, EUA), com limiar de detecção de 0,25-16,32 µmol/L, e expressos em forma de razão GSH/GSSG.

4.10 Atividade enzimática da catalase

A atividade da CAT foi determinada de acordo com AEBI, 1984. O método baseia-se da decomposição do H₂O₂ pela enzima, observado durante 1,5 minutos por espectrofotometria a 240 nm. Sobrenadante do homogenato do fígado (60 µL) foi adicionado em cubeta de quartzo contendo 905 µL de PBS 50 mM, pH 7,0, a 37°C. A reação foi desenvolvida pela adição de 35 µL de peróxido de hidrogênio a 300 mM, seguida pela diminuição da absorbância a 240 nm durante 1,5 minutos, com obtenção de quatro leituras. A absorbância a ser utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg). Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

4.11 Atividade enzimática da superóxido dismutase total

A atividade da SOD-t foi determinada de acordo com MISRA, H.P., FRIDOVICH, 1972. O método baseia-se na inibição da auto-oxidação da epinefrina em pH 10,2 pela enzima, observado durante 4 minutos por espectrofotometria a 480 nm. Sobrenadante do homogenato de fígado (60 µL) foi adicionado em cubeta de quartzo contendo 920 µL de tampão carbonato 50 mM, pH 10,2 e EDTA 0,1 Mm, a 37°C. Posteriormente, foi adicionado

20 µL de epinefrina (E4642, Sigma-Aldrich, EUA) a 150 mM em ácido acético 0,05%, seguido pelo aumento da absorbância a 480 nm durante 4 minutos, com obtenção de quatro leituras. A absorbância a ser utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg). Uma unidade de SOD-t é definida como a quantidade de enzima que causa inibição de 50% da oxidação da epinefrina.

4.12 Análise estatística

Os níveis das aminotransferases e marcadores do *status* oxidativo e sistemas antioxidante foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Para a análise estatística nós utilizamos o GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). A significância foi considerada admitindo-se um $p < 0,05$. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

5 RESULTADOS

Efeito da associação do extrato solúvel de *Ascaris suum* e N-acetil-L-cisteína no estresse oxidativo na hepatite autoimune experimental

Introdução

A hepatite autoimune é uma doença inflamatória crônica, tendo a inflamação e o estresse oxidativo como papéis chave na sua patogênese, com possibilidade de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular (CZAJA, 2014, 2016). Portanto, o controle dessas duas vertentes mostra-se imprescindível na terapêutica da hepatite autoimune. Para isto, foi desenvolvido modelo de hepatite autoimune experimental (HAE), que mimetiza a lesão hepática com rico infiltrado de linfócitos T, através da administração intravenosa da lectina Concanavalina A (HEYMANN et al., 2015; TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992). Ferramentas terapêuticas com capacidade antioxidante podem atenuar a lesão na HAE por diminuição da inflamação, bem como das espécies reativas do oxigênio (ROS), da peroxidação lipídica e da elevação da atividade enzimática da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e da razão glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) (FEI et al., 2016; LIU et al., 2016; SHIRIN et al., 2010; ZHOU et al., 2015).

Nesse contexto, estudos demonstraram a presença de enzimas antioxidantes no *Ascaris suum*, como a CAT e a glutatona-S-transferase (GST) e no *Schistosoma mansoni*, ressaltando a capacidade intrínseca em modular negativamente a resposta inflamatória (ECKELT et al., 1998; LIEBAU et al., 1997; MOURÃO et al., 2009; TSUJI et al., 2000). Adicionalmente, a imunização com antígenos dos vermes de helminto potencializou o efeito antioxidante da melatonina, com diminuição do malonaldeído (MDA) e aumento da GSH e atividade da catalase (EL-SHENAWY; SOLIMAM; ABEL-RAHMAN., 2009). Na artrite autoimune experimental, o extrato do verme do *A. suum* (ASC) reduziu a atividade inflamatória com diminuição do óxido nítrico e IL-1 β (ROCHA et al., 2008). Em modelo da asma alérgica murina, o ASC foi capaz de reduzir atividade inflamatória com diminuição dos níveis da peroxidase eosinofílica (ITAMI et al., 2005).

Na HAE, NASCIMENTO et al. (2014), demonstraram que o tratamento com ASC atenuou a lesão hepática (diminuição das aminotransferases, imunoglobulinas totais e perfil de resposta Th1) com indução de perfil Th2. Contudo, o ASC não atenuou o aumento da deposição de colágeno. SILVA, 2015, ao associar a N-acetil-L-cisteína (NAC) ao ASC no

tratamento, observou redução na deposição de colágeno e da síntese de interleucina (IL)-13 e óxido nítrico, com aumento de IL-5, IL-10 e TGF- β , indicando um perfil de Th2 e anti-inflamatório.

Em modelo experimental de lesão hepática crônica por tetracloreto de carbono e intoxicação por acetaminofeno, o tratamento com a (NAC) alterou o *status* oxidativo e sistemas antioxidante. De modo geral, a NAC favoreceu aumento da atividade da CAT, glutathiona peroxidase, SOD e GSH, ao mesmo tempo houve diminuição de MDA, hidroxiprolina, GSSG e ROS (CAI et al., 2015; NISSAR et al., 2013; TERNEUS et al., 2008; TOBWALA et al., 2015). Contudo, no tratamento profilático e terapêutico com a NAC na HAE, não foram avaliados diretamente estes parâmetros do estresse oxidativo (WANG et al., 2015). Portanto, é provável que a associação do ASC e NAC, potencialize a atividade anti-inflamatória do ASC e ocorra a restauração do aporte antioxidante promovido pela NAC.

No presente estudo, nós avaliamos o efeito da associação do ASC e a NAC no estresse oxidativo na hepatite autoimune experimental, além de investigar possíveis alvos terapêuticos deste tratamento associativo.

Materiais e métodos

Extrato solúvel de *A. suum*, Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína

O extrato de vermes adultos de *A. suum* foi produzido segundo protocolo de SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002. Brevemente, vermes adultos de *A. suum* foram lavados em solução salina e homogeneizados em tampão borato (BBS), pH 8,0, em um aparelho de Ultra-Turrax (Janke e Kunkel, Staufen, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 10.000 g durante 1 h. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 400 mL de BBS e agitado overnight, a 4 °C. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante dialisado contra água destilada overnight, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 10.000 g, por 2 h e liofilizado em alíquotas. Para administração nos animais, as alíquotas foram diluídas em solução estéril de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M, pH 7,2. A Concanavalina A tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA) e a N-acetil-L-cisteína (Sigma-Aldrich, EUA) foram diluídas em solução estéril de PBS 0,01M, pH 7,2.

Animais e formação dos grupos de estudo

Camundongos machos BALB/c, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), foram mantidos em gaiolas, sob condições padronizadas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro) e com água e comida *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=5). Para indução da HAE, a Con A foi administrada por via intravenosa (i.v.) na dose 20 mg/Kg (grupo HAE). Parte deste grupo recebeu ASC (2h após; 40 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.) (grupo HAE+ASC) e a outra parte recebeu a NAC (30 minutos; 200 mg/Kg), por via oral (v.o.) e após 12 h (grupo HAE+NAC). Parte do grupo HAE+ASC também recebeu NAC (grupo HAE+NAC+ASC). Grupo Controle recebeu apenas PBS (i.p. e i.v.).

O modelo experimental foi desenvolvido a partir dos estudos de NASCIMENTO et al. (2014) e SILVA, 2015 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (nº 23076.041705/2015-93).

Dosagem das aminotransferases

Amostras de sangue foram coletadas vinte e quatro horas após indução da HAE. Os níveis das aminotransferases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados pela metodologia de Frankel e Reitman (Labtest, BRA). Os resultados foram expressos em U/L, em forma de média de 5 animais/grupo $\pm$ desvio padrão.

Preparação do homogenato do fígado para análise bioquímica

Vinte e quatro horas após indução da HAE, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fígados foram coletados, pesados e homogeneizados em tampão Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,2, a 4°C , contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1mM (Sigma-Aldrich, EUA) e ortovanadato (Sigma-Aldrich, EUA) e centrifugado a 10.000 g, durante 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para serem utilizados nos ensaios descritos abaixo. A concentração de proteínas foi determinada pelo método do BCA (SMITH et al., 1985), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Quantificação da lipoperoxidação

Os níveis da lipoperoxidação foram determinados segundo OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979. Sobrenadante do homogenato do fígado (200 µL) foram adicionados em tubos, seguida da adição sequencial de 80 µL de dodecil sulfato de sódio 8,1%, 600 µL de ácido acético pH 3,5 a 20%, e 600 µL de solução aquosa do TBA 0,8% seguido de incubação em banho-maria a 95°C durante 60 minutos. Após esfriamento dos tubos, foram adicionados de 600 µL de *n*-butanol, misturados e centrifugados a 1 000g por 10 minutos e a parte orgânica (sobrenadante) foi adicionada em placa de 96-poços e foram lidos em 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína em referência a curva padrão (nmol/L) de 1,1,1,3 tatrathemethoxypropane (Sigma-Aldrich, EUA).

Níveis de glutathiona reduzida e oxidada

Os níveis de GSH e GSSG foram determinados conforme descrito em HISSIN; HILF, 1976. Para dosagem da GSH, 50 µL sobrenadante do homogenato do fígado foi adicionado em tubos contendo 450 µL PBS 100 mM, pH 8,0 e EDTA 5 mM. Para dosagem de GSSG, 20 µL *N*-etilmaleimida 0,04 M (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado em tubos contendo 50 µL do sobrenadante do homogenato do fígado e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos ao abrigo da luz. Posteriormente, foi adicionado 430 µL de NaOH 0,1 M. Foram adicionados 50 µL de cada mistura, em triplicata, em placa de 96-poços preta contendo 140 µL dos tampões. Ambas as reações foram desenvolvidas pela adição de 10 µL do OPT (Sigma-Aldrich, EUA). As placas foram homogeneizadas e incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada em 420 nm, com 350 nm de excitação. Os resultados foram obtidos em µmol de GSH e GSSG em referência a curvas padrão (Sigma-Aldrich, EUA) e expressos em µmol/mg de proteína em forma da razão GSH/GSSG.

Atividade enzimática da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com AEBI, 1984. Sobrenadante do homogenato do fígado (60 µL) foi adicionado em cubeta, contendo 905 µL de PBS 50 mM, pH 7,0, a 37°C. A reação foi desenvolvida pela adição de 35 µL de peróxido de hidrogênio a 300 mM. Absorbância foi mensurada em 240 nm durante cinética de 1,5 minutos, obtendo-se o delta de absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em

unidade por miligrama de proteína (U/mg). Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

Atividade enzimática da superóxido dismutase total

A atividade da SOD-t foi determinada de acordo com MISRA, H.P., FRIDOVICH, 1972. Sobrenadante do homogenato de fígado (60 μL) foi adicionado em cubeta, contendo 920 μL de tampão carbonato 50 mM, pH 10,2 e EDTA 0,1 mM, a 37°C. Seguindo a adição de 20 μL da epinefrina (Sigma-Aldrich, EUA) a 150 mM em ácido acético 0,05%. Absorbância foi determinada em 480 nm durante cinética de 4 minutos, obtendo-se o delta de absorbância por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg). Uma unidade de SOD-t é definida como a quantidade de enzima que causa inibição de 50% da oxidação da epinefrina.

Análise estatística

Os níveis das aminotransferases e marcadores do *status* oxidativo e sistemas antioxidante foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. Para a análise estatística nós utilizamos o GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). A significância foi considerada admitindo-se um $p < 0,05$. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados.

Resultados

Como esperado a administração da Con A induziu lesão hepática, através do aumento significativo das aminotransferases (**Figura 1A e 1B**) e houve diminuição dos níveis dessas enzimas nos animais submetidos ao tratamento com ASC e com ou sem a NAC.

A lipoperoxidação foi determinada a partir da detecção dos níveis do MDA no tecido hepático. A administração da Con A induziu aumento dos níveis do MDA (**Figura 2A**), os quais foram estatisticamente semelhantes no grupo HAE+ASC. No entanto, com a adição da NAC os níveis do MDA foram estatisticamente menores (HAE+NAC e HAE+NAC+ASC).

Nos grupos estudados não foi observado diferença na atividade da CAT (**Figura 2B**). Em relação a atividade da SOD, foi semelhante nos grupos HAE e Controle (**Figura 2C**) e sem diferença estatística nos níveis dos grupos tratados apenas com ASC. Contudo, os grupos

que receberam a associação NAC+ASC ou apenas NAC apresentaram aumento significativo nos níveis da SOD em comparação ao grupo HAE e HAE+ASC.

A **Figura 2D** representa a razão GSH/GSSG nos grupos estudados. Em comparação ao grupo HAE, pôde ser observado que o grupo HAE+ASC apresentou razão semelhante, enquanto nos grupos HAE+NAC e HAE+NAC+ASC a razão foi estatisticamente maior.

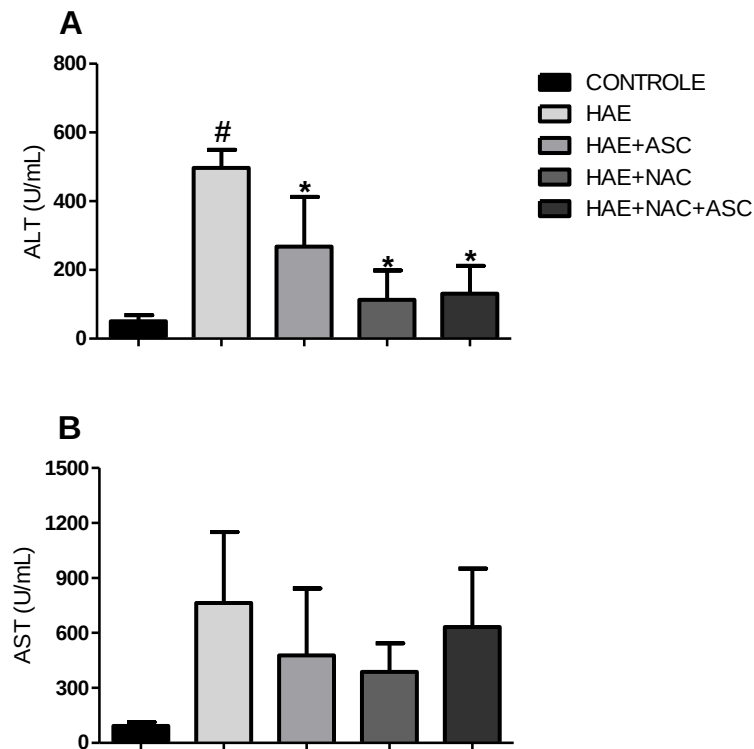


Figura 1. Níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) em camundongos com hepatite autoimune experimental (HAE) tratados ou não com a associação do extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) e N-acetil-L-cisteína (NAC). # $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE. Os resultados foram representados em forma de média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo.

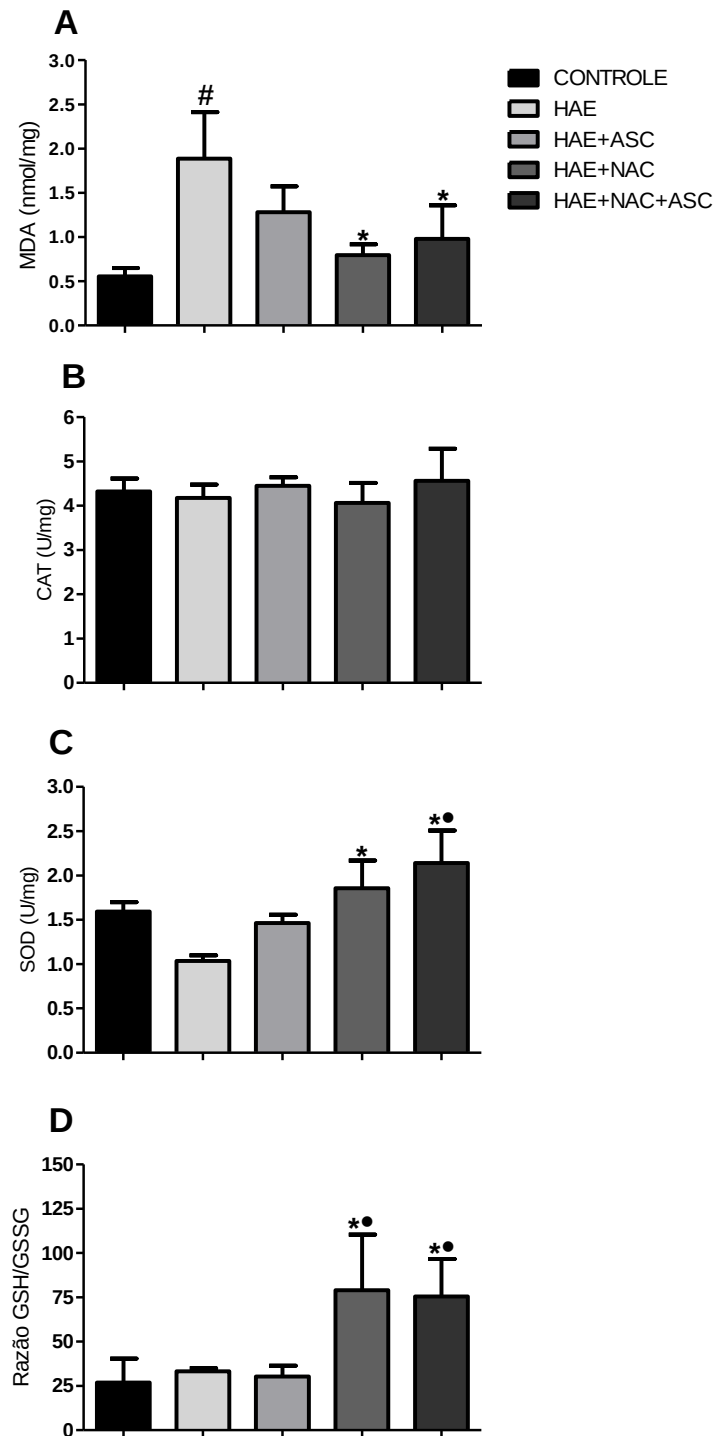


Figura 2. Níveis de malondialdeído (MDA) (A), atividade da catalase (CAT) (B) e superóxido dismutase (SOD) (C) e da razão da glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) (D) no fígado de camundongos com hepatite autoimune experimental (HAE) tratados ou não com a associação do extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) e N-acetil-L-cisteína (NAC). [#] $p < 0,05$ em comparação ao grupo Controle. ^{*} $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE. [•] $p < 0,05$ em comparação ao grupo HAE+ASC. Os resultados foram representados em forma de média $\pm$ desvio padrão de 5 animais/grupo.

Discussão

Sabendo que o estresse oxidativo é ponto marcante no processo inflamatório da hepatite autoimune, as estratégias de controle desse mecanismo mostram-se imprescindíveis. O extrato de *A. suum* modulou negativamente a resposta Th1 em modelo de HAE (NASCIMENTO et al., 2014) e foram identificadas moléculas antioxidantes (CAT e GST) nesse helminto (ECKELT et al., 1998; TSUJI et al., 2000). É sabido que a NAC atuou nestas duas vertentes, apresentando efeito antioxidante e diminuindo a resposta Th1 (AIRES et al., 2012; WANG et al., 2015). Então, nos perguntamos sobre o efeito do ASC e NAC separadamente e em associação na HAE. Os achados mostraram que o ASC não tem efeito sobre os parâmetros do estresse oxidativo na HAE, avaliados neste estudo, ao contrário da NAC.

Conforme o esperado, a lesão hepática pôde ser verificada pela elevação das aminotransferases e MDA (FEI et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2014). Contudo, a atividade da CAT e da SOD não foram prejudicadas 24 horas após administração da Con A. LI et al., 2015 também não observaram alterações nos níveis destas enzimas, enquanto WANG et al., 2016 observaram níveis mais baixos da SOD nos animais com HAE em relação aos saudáveis. É possível que a detecção destas enzimas seja menos flutuante quando dosadas precocemente. Aqui, o tempo de 24 h foi escolhido baseado no estudo de SHIRIN et al., 2010, onde foi demonstrado ser o pico da lipoperoxidação, bem como de acordo com cinética das aminotransferases de nossos estudos anteriores (NASCIMENTO et al., 2014; SILVA, 2015).

É bem conhecido o papel antioxidante da NAC. Em diferentes modelos de lesão hepática, a NAC favoreceu níveis elevados das enzimas antioxidantes (CAT e SOD) e os antioxidantes não-enzimáticos (GSH) e diminuição do MDA (CAI et al., 2015; NISSAR et al., 2013; TERNEUS et al., 2008; TOBWALA et al., 2015). O nosso estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos da NAC no estresse oxidativo na hepatite autoimune experimental. O efeito da NAC está associado à doação do aminoácido cisteína para biossíntese da GSH, envolvida na detoxificação de xenobióticos e eliminação de radicais livres (ANDRADE et al., 2015). Realmente, aqui, a NAC atenuou o estresse oxidativo, com diminuição da lipoperoxidação e aumento da atividade da SOD, refletidos na elevação da razão GSH/GSSG.

O tratamento com ASC não modificou os parâmetros avaliados do *status* oxidativo na HAE, apesar do potencial antioxidante (ECKELT et al., 1998; TSUJI et al., 2000). Nós acreditamos em duas razões para esse resultado. A primeira é possível que o ASC não seja

capaz de atuar na resposta imune inata de forma eficaz sendo necessária uma resposta dependente de linfócitos T. A segunda é que o ASC tem um efeito mais evidente quando administrado junto com o antígeno heterólogo, neste caso virtualmente os auto-antígenos.

No modelo de inflamação de bolsa de ar (OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES, 2005), o ASC diminuiu citocinas inflamatórias de resposta imune inata e induziu aumento de citocinas imunossupressoras quando administrando concomitante com o LPS. De fato, o tratamento com ASC foi mais efetivo quando no modelo profilático onde é administrado 30 min antes da indução da HAE (NASCIMENTO et al., 2014). Em acordo com SHIRIN et al., 2010, demonstraram níveis aumentados do MDA e carbonilação de proteínas na HAE, ambos diminuídos quando os camundongos foram pré-tratados com “free-radical scavengers”. Ao mesmo tempo, a imunização com ovalbumina+ASC inibiu a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, CD40) e MHC de classe II em células apresentadoras de antígenos (SILVA et al., 2006) que podem alterar o perfil de resposta imune T-dependente. Em modelo de asma alérgica, ARAÚJO et al., 2010, demonstraram que o efeito do ASC é dependente dos linfócitos T regulatórios, bem como a participação de citocinas imunossupressoras. Recentemente nosso grupo observou um aumento de células com perfil inibitório (Treg) em camundongos com HAE e tratados com ASC (dados não publicados) e aumento de IL-10 e TGF- β (SILVA, 2015).

Em conclusão, os achados mostraram que na atenuação da hepatite autoimune experimental proporcionada pelo tratamento pelo NAC+ASC, a NAC esteve comprometida com a modulação dos parâmetros do estresse oxidativo aqui avaliados. Apesar disso, nós não descartamos o uso de NAC+ASC como estratégia terapêutica, visto que é possível a atuação anti-inflamatória do extrato do verme do helminto e droga em momentos e vias diferentes, a NAC mais precocemente e o ASC mais tardiamente de maneira T-dependente.

6 CONCLUSÕES

- A associação da NAC+ASC levou à diminuição nos níveis do MDA e aumento na atividade da SOD e da razão GSH/GSSG na HAE, porém ambos os grupos não apresentaram diferença na atividade da CAT;
- Os animais tratados apenas com o ASC não apresentaram diferença significativa nos níveis das moléculas do *status* oxidante (MDA) e sistemas antioxidante (GSH/GSSG, CAT e SOD) na HAE.
- Apenas o tratamento com a NAC foi capaz de diminuir os níveis do MDA e levou ao aumento da razão GSH/GSSG e da atividade da SOD na HAE, mas em não apresentaram diferença na atividade da CAT;
- A associação NAC+ASC levou ao aumento da atividade da SOD e da razão GSH/GSSG em relação ao tratamento apenas com ASC, mas não apresentou diferença para os tratados apenas com NAC.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. [13] Catalase. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AIRES, A. DE L. et al. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1569–1578, 2012.

AIZAWA, Y.; HOKARI, A. Autoimmune hepatitis: current challenges and future prospects. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 10, p. 9-18, 2017.

ALTURFAN, E. I. et al. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 36, n. 4, p. 438–445, 2012.

ANDRADE, K. Q. DE et al. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 30269–30308, 2015.

ARAÚJO, C. A. A. et al. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN- γ , but not IL-12. **Cytokine**, v. 44, n. 3, p. 335–341, 2008.

ARAÚJO, C. A. A. et al. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 6, p. 491–503, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BJÖRNSSON, E. et al. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. **Hepatology**, v. 51, n. 6, p. 2040–2048, 2010.

CAI, Z. et al. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 7, p. 8655–8662, 2015.

CARAMBIA, A.; HERKEL, J. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 1, p. 23–28, 2010.

CARO, A. A. et al. N-acetylcysteine inhibits the up-regulation of mitochondrial biogenesis genes in livers from rats fed ethanol chronically. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 12, p. 2896–2906, 2014.

CENTER, S. A. Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 34, n. 1, p. 67–172, 2004.

CZAJA, A. J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 10, p. 2515–2532, 2014.

CZAJA, A. J. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 10, n. 2, p. 177–203, 2016b.

CZAJA, A. J. Nature and Implications of Oxidative and Nitrosative Stresses in Autoimmune Hepatitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1–20, 2016a.

DA COSTA SILVA, D.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300–305, 2011.

ECKELT, V. H. O. et al. Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 203–214, 1998.

EL-SHENAWY, N. S.; SOLIMAM, M. F. M.; ABEL-RAHMAN., S. E. Melatonin and schistosomal antigens ameliorate the anti-oxidative and biochemical response to *Schistosoma mansoni* infection in hamster. **Current Zoology**, v. 55, n. 2, p. 165–172, 2009.

FEI, M. et al. Alpha-lipoic acid protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and reducing reactive oxygen species generation. **International Immunopharmacology**, v. 35, p. 53–60, 2016.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, A. P.; ELIANA S, F.; MACEDO., M. S. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cellular Immunology**, v. 162, n. 2, p. 202–210, 1995.

HEYMANN, F. et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. **Laboratory**

Animals, v. 49, n. S1, p. 12–20, 2015.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–26, 1976.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA., Â. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

ITAMI, D. M. et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 7, p. 873–879, 2005.

JONULEIT, H; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6323–6327, 2003.

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

KÜSTERS, S. et al. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. **Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 462–71, 1996.

LI, X. et al. The effect of black raspberry extracts on MnSOD activity in protection against concanavalin A induced liver injury. **Nutritional Cancer**, v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.

LIBERAL, R. et al. Cutting edge issues in autoimmune hepatitis. **Journal of Autoimmunity**, v. 75, p. 6–19, 2016.

LIEBAU, E. et al. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 659–666, 1997.

LIMA, C. et al. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1659–1666, 2002.

LIU, T. et al. Shikonin Attenuates Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibition of the JNK Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, n. 2016, p. 1–14, 2016.

MANN, M. P. et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.

51, n. 6, p. 2193–2213, 2010.

MAKOL, A.; WATT, K. D.; CHOWDHARY, V. R. Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment. **Hepatitis Research and Treatment**, v. 2011, p. 390916, 2011.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MOURÃO, M. D. M. et al. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. 550–558, 2009.

NASCIMENTO, W. C. et al. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. **Parasitology Research**, v. 113, p. 3309–3317, 2014.

NISSAR, A. U. et al. Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from *Allium* plants, on experimentally induced hepatic prefibrogenic events in wistar rat. **Phytomedicine**, v. 20, p. 828–833, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

ROCHA, F. A. C. et al. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2736–2745, 2008.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59–69, 2012.

SCHÜMANN, J. et al. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1671–83, 2000.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 952–968, 2013.

SHIRIN, H. et al. Inhibition of immune-mediated concanavalin a-induced liver damage by free-radical scavengers. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 2, p. 268–275, 2010.

SILVA, ROECKSON CARLOS PEIXOTO. Mecanismos de imunorregulação do extrato solúvel de *Ascaris suum* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína na hepatite autoimune experimental. 84 folhas: Il., fig, 30 cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. DISSERTAÇÃO (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2015.

SILVA, S. R. et al. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3227–3237, 2006.

SMITH, P. K., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOUZA, V. M. O.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. . Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 81–89, 2002.

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

TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 196–203, 1992.

TOBWALA, S. et al. Comparative evaluation of N-acetylcysteine and N-acetylcysteineamide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in human hepatoma HepaRG cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, n. 2, p. 261–272, 2015.

TSUJI, N. et al. Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 125–128, 2000.

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

WANG, C. et al. Protective effects of N-acetylcysteine in concanavalin a-induced hepatitis in

mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

WANG, H.-X. et al. Immune mechanisms of Concanavalin a model of autoimmune hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 119–125, 2012.

WANG, K. et al. *Angelica sinensis* polysaccharide attenuates concanavalin A-induced liver injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 140–148, 2016.

ZHOU, Y. et al. The Protective Effect of Resveratrol on Concanavalin-A-Induced Acute Hepatic Injury in Mice. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, n. 506390, p. 1–11, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO EM INGLÊS PARA SUBMISSÃO

Revista: Experimental and Molecular Pathology

Fator de impacto: 2,423

Qualis: B1

ISSN: 0014-4800

Effect of association *Ascaris suum* soluble extract and N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress in an experimental autoimmune hepatitis

Raul Penaforte Correia da Silva^a, Roeckson Carlos Peixoto Silva^a, Ricielle Lopes Augusto^b, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa^b, André de Lima Aires^{a,c}, Valdênia Maria Oliveira de Souza^{a,d,*}.

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

^c Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

*Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brazil

Email address: valdenia.souza@gmail.com (Souza, V. M. O)

Abstract

Autoimmune hepatitis is a chronic and progressive inflammatory disease, which has reported therapeutic failure. Association *A. suum* soluble extract (ASC) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) attenuated experimental autoimmune hepatitis (EAH) through Th2-anti-inflammatory

profile. This study evaluated the association effects of ASC and NAC on oxidative stress in EAH. Experimental groups, Concanavalin A (20 mg/Kg) was administered intravenously (i.v.) (EAH group). Part of this group received ASC (2 h after, 40 mg/Kg), intraperitoneally (i.p.) (EAH+ASC group), and the other part received oral NAC (30 minutes after, 200 mg/Kg) and 12 h after (EAH+NAC group). EAH+ASC group part also received NAC (EAH+NAC+ASC group). Control group received only PBS (i.p. and i.v.). At 24 h after EAH induction, homogenate liver was prepared. Lipoperoxidation was estimated by thiobarbituric acid binding malondialdehyde (MDA). Reduced glutathione (GSH) and oxidized (GSSG) were measured by binding to OPT at pH 8,0 and pH 12,0, respectively. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity was determined through H₂O₂ decomposition and epinephrine autoxidation inhibition, respectively. EAH groups treated with NAC and NAC+ASC there was a reduction of MDA levels, as well as the increase of SOD and GSH/GSSG ratio, compared with the HAE group. However, EAH+ASC group parameters were similar EAH and Control groups. CAT activity no showed difference among study groups. Our findings showed that ASC has no effect on the parameters of oxidative stress evaluated in EAH, unlike NAC.

Keywords: Acetylcysteine; *Ascaris suum*; oxidative stress; autoimmune hepatitis.

1. Introduction

Autoimmune hepatitis is a chronic inflammatory disease with inflammation and oxidative stress as key roles in its pathogenesis and possibility of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Czaja, 2014, 2016). Therefore, control these two aspects is essential in the autoimmune hepatitis therapy. For this, experimental autoimmune hepatitis model (EAH) of intravenous Concanavalin A lectin administration has allowed the study of pathophysiology in liver disease with rich T lymphocyte infiltrate, as occurs in autoimmune hepatitis (Tiegs et al., 1992; Heymann et al., 2015;). Therapeutic tools with antioxidant capacity can attenuate EAH by reducing inflammation, as well as reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and high activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and the ratio glutathione reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) (Shirin et al., 2010; Zhou et al., 2015; Fei et al., 2016; Liu et al., 2016).

In this context, studies have demonstrated antioxidant enzymes in *Ascaris suum* and *Schistosoma mansoni*, such as CAT and glutathione-S-transferase (GST), emphasizing negative modulate ability to inflammatory host response (Liebau et al., 1997; Eckelt et al.,

1998; Mourão et al., 2009; Tsuji et al., 2000). In addition, immunization with helminths worm antigens enhanced the antioxidant effect of melatonin, with decreased malonaldehyde (MDA) and increased GSH and catalase activity (El-Shenawy et al., 2009). Experimental autoimmune arthritis, *A. suum* worm extract (ASC) reduced inflammatory activity with decreased nitric oxide and IL-1 β (Rocha et al., 2008). Murine allergic asthma model, ASC was able to reduce inflammatory activity with decreased levels of eosinophilic peroxidase (Itami et al., 2005).

In EAH, Nascimento et al. (2014), demonstrated ASC treatment attenuated hepatic injury (aminotransferases decreased, total immunoglobulins and Th1 profile) with Th2 profile induction. However, ASC did not attenuate the increase in collagen deposition. Silva, 2015 associating N-acetyl-L-cysteine (NAC) to ASC treatment, it observed a reduction in collagen deposition, interleukin (IL)-13 synthesis and nitric oxide, with increase of IL-5, IL-10 and TGF- β , indicating a Th2 profile and anti-inflammatory activity.

In chronic hepatic injury by carbon tetrachloride and acetaminophen intoxication models, treatment with NAC altered oxidative status and antioxidant systems. In general, NAC favored increased activity of CAT, glutathione peroxidase, SOD and GSH, while there was a decrease in MDA, hydroxyproline, GSSG and ROS (Terneus et al., 2008; Nissar et al., 2013; Cai et al., 2015; Tobwala et al., 2015). However, EAH prophylactic and therapeutic treatment with NAC did not were evaluate oxidative stress parameters (Wang et al., 2015). Therefore, the association of ASC and NAC, potentiate anti-inflammatory activity of ASC and restore the antioxidant contribution promoted by NAC.

The aim of the present study was to see whether effect association ASC and NAC on oxidative stress in an experimental autoimmune hepatitis, besides investigating possible therapeutic targets of this associative treatment.

2. Material and methods

2.1 Concanavalin A, N-acetyl-L-cysteine and *A. suum* soluble extract

An extract of adult *A. suum* worms was obtained using the protocol of Souza et al, 2002. Briefly, live adult *A. suum* worms were washed in saline and homogenized in borate buffered saline (BBS) at pH 8,0 in an Ultra-Turrax apparatus (Janke and Kunkel, Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at 10.000 rpm for 1 h. Then, the precipitate was resuspended in 400 mL and stirred in BBS overnight at 4 °C. This suspension was centrifuged, the supernatant was dialyzed against distilled water overnight at 4 °C, and the

supernatant was centrifuged at 10.000 rpm for 2 h and lyophilized. For administration in animals, aliquots were diluted in sterile 0,01 M sodium phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2, as well as to Concanavalin A (Con A) tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA) e a N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, EUA).

2.2 Animals and study groups

Eight-week-old male BALB/c mice were housed in the animal care facility at the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco (LIKA/UFPE). All animals were acclimatized under controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) and 12 h light/12 h dark cycle with water and food *ad libitum*. The protocol for these studies was approved by the Ethics Committee for the Research Center of Biological Sciences/UFPE (nº 23076.041705/2015-93).

Experimental groups formation, Con A (20 mg/Kg) was administered intravenously (i.v.) (EAH group). Part of this group received ASC (2 h after, 40 mg/Kg), intraperitoneally (i.p.) (EAH+ASC group), and the other part received oral NAC (30 minutes after, 200 mg/Kg) and 12 h after (EAH+NAC group). EAH+ASC group part also received NAC (EAH+NAC+ASC group). Control group received only PBS (i.p. and i.v.). This experimental model was adjusted according to Nascimento et al. (2014) and Silva et al. (2015).

2.3 Measurement of aminotransferases

Blood samples were collected 24 h after EAH induction. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were obtained using Frankel and Reitman's methodology (Labtest, MG, Brazil). The results were expressed as the mean of $\text{U/L} \pm$ standard deviation.

2.4 Liver preparations for biochemical analysis

Twenty-four hours after EAH induction, animals were euthanized to cervical dislocation. Liver were immediately collected, weighed and homogenized. Briefly, homogenates of liver tissues were prepared in 50 mM Tris buffer containing 1 mM EDTA (pH 7,2) at 4°C , 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich, EUA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, EUA) and centrifuged at 10.000 *g* for

10 min at 4°C. The supernatant was collected and stored to used in the following experiments as described below. Concentration of protein in supernatant was estimated to BCA method using bovine serum albumin (BSA) as standard (Smith et al., 1985).

2.5 Lipoperoxidation quantification

Lipoperoxidation levels were measure according to Ohkawa et al. (1979). The reaction was developed by the sequential addition of 80 µL of 8.1 % sodium dodecyl sulfate, 600 µL of 20 % acetic acid pH 3.5, and 600 µL of 0.8 % TBA solutions boiled in water for 60 min to 200 µL of liver homogenate supernatants. After tap water cooling, 600 µL of n-butanol was added to the sample, centrifuged at 1.000 *g* for 10 min, and the organic phase was read at 532 nm using a plate reader (Thermo Scientific, Varioskan flash spectral scanning multimode reader). The results were expressed as nmol per mg of protein using a standard curve generated using different concentrations of a 1,1,3,3-tetramethoxy propane solution (Sigma-Aldrich, EUA).

2.6 Reduced and oxidized glutathione levels

The reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels were measure according to Hissin; Hilf, 1976. To measure GSH, 450 µL of phosphate buffer 100 mM with EDTA (5 mM) (pH 8,0) were added to 50 µL of the supernatant. And to GSSG evaluate, 50 µL of the supernatant were incubated at room temperature with 20 µL of N-ethylmaleimide (NEM) 0,04M for 30 min. To this mixture, 430 µL of sodium hydroxide (NaOH) 0,1 M was added. It was added 50 µL of each mixture plus 140 µL of buffers and 10 µL OPT were placed in the wells of a 96-well plate. This mixture was incubated for 15 min at room temperature and protected from light. The reading was made in a spectrofluorimeter using a wavelength of 420 nm for issue with 350 nm excitation. The results were obtained as µmol per mg of protein with reference to a standard curve built with known reduced and oxidized glutathione concentrations (Sigma-Aldrich, EUA) and expressed in GSH/GSSG ratio.

2.7 Catalase enzymatic activity

Catalase (CAT) enzymatic activity was measured according to Aebi, 1984. Triplicates of liver homogenate supernatants (60 µL) were added to 905 µL of sodium phosphate buffer

pH 7,0 at 37°C. The reaction was developed by adding 35 µL of 300 mM hydrogen peroxide in sodium phosphate buffer. Measuring the absorbance changes per 10 s, for 1,5 min at 240 nm. Enzymatic activity was also expressed as units per milligram of protein (U/mg protein). One unit of catalase is equivalent to hydrolysis of 1 µmol H₂O₂ per minute.

2.8 Superoxide dismutase total enzymatic activity

Assessment of total-superoxide dismutase (t-SOD) enzymatic activity was performed according to Misra; Fridovich, 1972. Triplicates of liver homogenate supernatants (60 µL) were previously incubated in a water bath at 37 °C and then added to 920 µL of 0,05 % sodium carbonate buffer pH 10,2 in 0,1 mM EDTA. The reaction was developed by adding 20 µL of 150 mM epinephrine in 0.05 % acetic acid. Absorbance changes per 15 s for a total of 2 min, at 480 nm, were measured. One unit of t-SOD was defined as the enzyme amount causing 50% inhibition of epinephrine oxidation. Tissue t-SOD enzymatic activity was expressed as units per milligram of protein (U/mg protein).

2.9 Statistical analysis

The aminotransferases levels and markers of oxidative status and antioxidant systems were assessed using analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison post hoc test. For statistical analysis, we used GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA), and all findings were considered significant at $p < 0,05$. All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results.

3. Results

Con A administration induced hepatic injury through a significant increase in aminotransferases (**Figure 1A** and **1B**) and decreased levels of these enzymes in animals submitted to ASC treatment with or without NAC.

Lipoperoxidation was determined from the detection of MDA levels in hepatic tissue. Con A administration induced increased levels of MDA (**Figure 2A**), which were statistically similar in the EAH+ASC group. However, with the addition of NAC, MDA levels were statistically lower (EAH+NAC and EAH+NAC+ASC).

CAT activity not was observed difference in the studied groups (**Figure 2B**). Regarding SOD activity, it was similar in the EAH and Control groups (**Figure 2C**) and without statistical difference in the levels of the groups treated with ASC only. However, the groups that received the NAC+ASC association or only NAC showed a significant increase in SOD levels compared to the EAH and EAH+ASC groups.

Figure 2D shows the GSH/GSSG ratio. In comparison to the EAH group, it was observed that the EAH+ASC group presented a similar ratio, whereas in the EAH+NAC and EAH+NAC+ASC groups the ratio was statistically higher.

4. Discussion and conclusion

Oxidative stress is very important in autoimmune hepatitis inflammatory process and strategies control this mechanism are essential. The *A. suum* extract negatively modulated the Th1 response in EAH model (Nascimento et al., 2014) and antioxidant molecules (CAT and GST) in this helminth were identified (Eckelt et al., 1998; Tsuji et al., 2000). NAC acted in these two ways, antioxidant effect and decreasing Th1 response (Aires et al., 2012; Wang et al., 2015). Therefore, we question about ASC and NAC effect separately and association on EAH. Our findings showed that ASC has no effect on the parameters of oxidative stress evaluated in EAH, unlike NAC.

As expected, hepatic injury could be verified by elevation of aminotransferases and MDA (Nascimento et al., 2014; Fei et al., 2016). However, CAT and SOD activity were not impaired 24 hours after administration of Con A. Li et al. (2015) did not observe changes in the enzymes levels, while Wang et al. (2016) observed lower levels of SOD in EAH group compared with the Control group. It is possible that the detection of these enzymes is less fluctuating when dosed early. In our study, the time of 24 h was chosen based on the study of Shirin et al. (2010), where it was shown to be the peak of lipoperoxidation, as well as according to aminotransferases kinetics of our previous studies (Nascimento et al., 2014; Silva, 2015).

NAC antioxidant effect is well known. In hepatic injury models, NAC favored high levels of antioxidant enzymes (CAT and SOD) and non-enzymatic antioxidants (GSH) and decreased MDA (Terneus et al., 2008; Nissar et al., 2013; Cai et al., 2015; Tobwala et al., 2015). The effect of NAC is associated with the donation of the cysteine amino acid to GSH biosynthesis, involved in detoxification of xenobiotics and elimination of free radicals (Andrade et al., 2015). The present study is the first to evaluated NAC effects on oxidative

stress in EAH. Here, NAC attenuated oxidative stress, with decreased lipoperoxidation and increased SOD activity, reflected in the elevation of the GSH/GSSG ratio.

The ASC treatment did not modify the parameters of oxidative status evaluated in EAH, despite the antioxidant potential (Eckelt et al., 1998; Tsuji et al., 2000). We believe in two reasons for this result. The first one ASC is not able to act on the innate immune response effectively and a T lymphocyte-dependent response is required. The second is that the ASC has a more evident effect when administered along with the heterologous antigen, in this case virtually the autoantigens.

In the air pouches by LPS, ASC decreased inflammatory cytokines of innate immune response and induced increase of immunosuppressive cytokines when administered concomitantly with LPS (Oshiro et al., 2005). In fact, ASC treatment was more effective when in the prophylactic model where it is administered 30 min prior to EAH induction (Nascimento et al., 2014). In agreement with SHIRIN et al. (2010), were demonstrated increased of MDA levels and carbonylation of proteins in EAH, both decreased when the mice were pre-treated with free radical scavengers. At the same time, immunization with ovalbumin+ASC inhibited the costimulatory molecules expression (CD80, CD86, CD40) and MHC class II in antigen-presenting cells (Silva et al., 2006) able to change the T-dependent immune response. In allergic asthma model, Araújo et al. (2010), were showed that ASC effect is regulatory T Lymphocytes-dependent, as well as immunosuppressive cytokines. Our group observed an increase of cells with inhibitory profile (Treg) in mice with EAH and treated with ASC (unpublished data) and increase of IL-10 and TGF- β (SILVA, 2015).

In conclusion, the findings showed that in the attenuation of the EAH provided by the NAC+ASC treatment, the NAC was compromised with the modulation of the oxidative stress parameters evaluated. Despite this, we do not rule out the use of NAC+ASC as a therapeutic strategy, since it is possible the anti-inflammatory action of the helminthic worm extract and drug at different times and routes, the NAC earlier and the ASC later T-dependent.

Conflict of interest

The authors do not have potential conflicts of interest associated with this paper.

References

Aebi, H., 1984. [13] Catalase. *Methods Enzym.* 105, 121–126.

- Aires, A. DE L. et al., 2012. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitol. Res.* 111, 569–1578.
- Andrade, K. Q. DE et al, 2015. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 30269–30308.
- Araújo, C. A. A. et al., 2010. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Scand. J. Immunol.* 72, 491–503.
- Cai, Z. et al., 2015. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 8655–8662.
- Czaja, A. J., 2014. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 2515–2532.
- Czaja, A. J., 2016. Nature and Implications of Oxidative and Nitrosative Stresses in Autoimmune Hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1–20.
- Eckelt, V. H. O. et al., 1998. Primary sequence and activity analyses of a catalase from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95, 203–214.
- El-Shenawy, N. S. et al., 2009. Melatonin and schistosomal antigens ameliorate the anti-oxidative and biochemical response to *Schistosoma mansoni* infection in hamster. *Curr. Zool.* 55, 165–172.
- Fei, M. et al., 2016. Alpha-lipoic acid protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and reducing reactive oxygen species generation. *Int. Immunopharmacol.* 35, 53–60.
- Heymann, F. et al., 2015. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab. Anim.* 49, 12–20.
- Hissin, P. J.; Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214–26.
- Itami, D. M. et al., 2005. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin. Exp. Allergy.* 35, 873–879.
- Li, X. et al., 2015. The effect of black raspberry extracts on MnSOD activity in protection

against concanavalin A induced liver injury. *Nutr. Cancer*. 33, 395–401.

Liebau, E. et al., 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem. J.* 324, 659–666.

Liu, T. et al., 2016. Shikonin Attenuates Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury in Mice via Inhibition of the JNK Pathway. *Mediators Inflamm.* 2016, 1–14.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.

Mourão, M. D. M. et al., 2009. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, 550–558.

Nascimento, W. C. et al., 2014. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitol. Res.* 113, 3309–3317.

Nissar, A. U. et al., 2013. Effect of N-acetyl cysteine (NAC), an organosulfur compound from *Allium plants*, on experimentally induced hepatic prefibrogenic events in wistar rat. *Phytomedicine*. 20, 828–833.

Ohkawa, H. et al., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.

OSHIRO, T. M. et al., 2005. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm. Res.* 54, 17–21.

Rocha, F. A. C. et al., 2008. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infec. Immun.* 76, 2736–2745.

Shirin, H. et al., 2010. Inhibition of immune-mediated concanavalin a-induced liver damage by free-radical scavengers. *Dig. Dis. Sci.* 55, 268–275.

Silva, R. C. P., 2015. Mecanismos de imunorregulação do extrato solúvel de *Ascaris suum* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína na hepatite autoimune experimental. 84 folhas: Il., fig, 30 cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. DISSERTAÇÃO (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical.

Silva, S. R. et al., 2006. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate

expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur. J. Immunol.* 36, 3227–3237.

Smith, P. K., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

Souza, V. M. O., 2002. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 35, 81–89.

Terneus, M. V. et al., 2008. Comparison of S-adenosyl-l-methionine (S-AMe) and N-acetylcysteine (NAC) protective effects on hepatic damage when administered after acetaminophen overdose. *Toxicology.* 244, 25–34.

Tiegs, G et al., 1992. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J. Clin. Invest.* 90, 196–203.

Tobwala, S. et al., 2015. Comparative evaluation of N-acetylcysteine and N-acetylcysteineamide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in human hepatoma HepaRG cells. *Exp. Biol. Med.* 240, 261–272.

Tsuji, N. et al., 2000. Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.* 30, 125–128.

Wang, C. et al., 2015. Protective effects of N-acetylcysteine in concanavalin a-induced hepatitis in mice. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–17.

Wang, K. et al., 2016. *Angelica sinensis* polysaccharide attenuates concanavalin A-induced liver injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* 31, 140–148.

Zhou, Y. et al., 2015. The Protective Effect of Resveratrol on Concanavalin-A-Induced Acute Hepatic Injury in Mice. *Gastroenterol. Res. Prac.* 2015, 1–11.

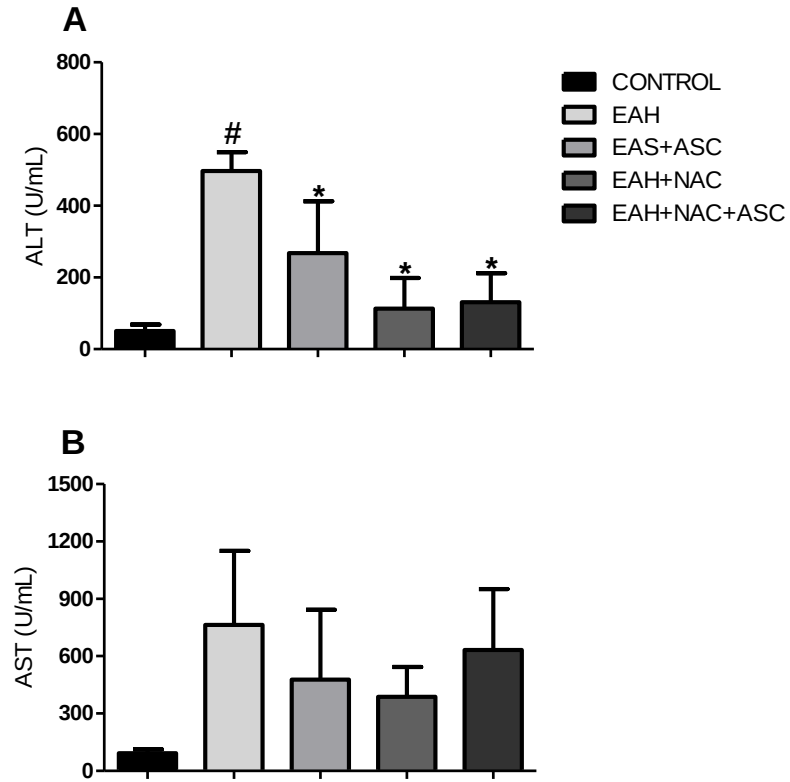
Title of figures

Figure 1. Plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) (A) and aspartate aminotransferase (AST) (B) in mice with experimental autoimmune hepatitis (EAH) treated or not with the association of the soluble extract of *Ascaris suum* (ASC) and N-acetyl-L-cysteine (NAC). # $p<0,05$ compared to control group. * $p<0,05$ compared with EAH group. The results represent the mean $\pm$ standard deviation for five animals/group.

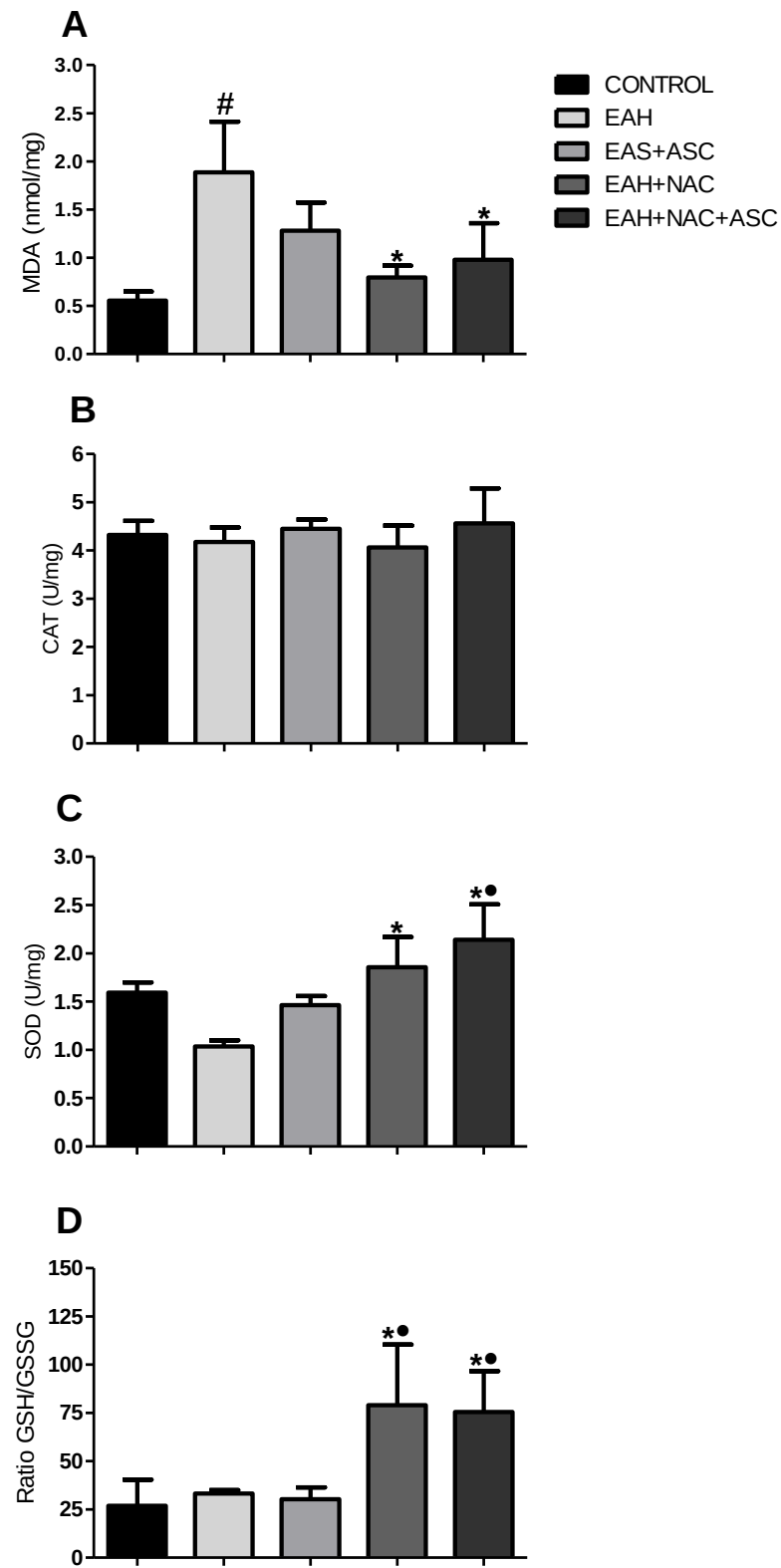
Figure 2. Malondialdehyde levels (MDA) (A), catalase (CAT) (B) and superoxide dismutase (SOD) activity (C) and reduced/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) (D) in liver mice with experimental autoimmune hepatitis (EAH) treated or not with the association of the soluble extract of *Ascaris suum* (ASC) and N-acetyl-L-cysteine (NAC). # $p<0,05$ compared with Control group. * $p<0,05$ compared with EAH group. • $p<0,05$ compared with EAH+ASC group. The results represent the mean $\pm$ standard deviation for five animals/group.

Appendices

A - Figure 1



B - Figure 2.



ANEXOS

ANEXO A – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de outubro de 2015.

Ofício nº 103/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza**
Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.041705/2015-93

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeitos imunorregulatórios do extrato de *Ascaris sunn* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína sobre os mecanismos intracelulares da população de macrófagos (M1 e M2) e linfócitos T na hepatite autoimune experimental”**.

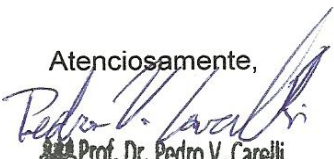
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do LIKA-UFPE; Animais: camundongos isogênicos BALB/c; Idade: 8 semanas; Peso: 250g; Sexo: machos; Nº total de animais: 300.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584