

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA N-ACETIL-L-CISTEÍNA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL CRÔNICA

Renan Andrade Fernandes de Souza¹; André de Lima Aires²

¹Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: renan.andrade.fernandes@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Medicina Tropical – CCS – UFPE. E-mail: andrelima26@gmail.com.

Sumário: Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da N-acetilcisteína (NAC), isolada e associada à Praziquantel (PZQ), sobre o dano hepático na esquistossomose crônica experimental. Camundongos infectados foram distribuídos em controle, NAC, PZQ e NAC + PZQ. Dois grupos não infectados foram distribuídos em Controle e NAC. Após o 45º dia de infecção a NAC (200mg/kg/dia) foi administrada diariamente até o 180º dia após infecção e PZQ (100 mg / kg / dia) a partir do 45º até o 49º dia de infecção, ambas as drogas por via. No dia 181º dia de infecção os camundongos foram sacrificados para análise sorológica de AST, ALT, fosfatase alcalina e de albumina e análise do estresse oxidativo através dos níveis de ânion superóxido, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e grupos sulfidril em tecido hepático. O tratamento com NAC reduz os níveis de ânion superóxido, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e aumento de grupos sulfidril em tecido hepático. A associação da NAC ao PZQ favorece a melhora desses marcadores de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Esquistossomose; NAC; Estresse; Oxidativo

INTRODUÇÃO

Estima-se que uma a cada trinta pessoas, no mundo, seja portadora de esquistossomose. Atualmente, o tratamento é realizado com Praziquantel (PZQ), que apresenta alta eficácia contra vermes adultos no entanto não modula sobre as lesões granulomatosas já instaladas que podem causar sequelas irreversíveis. Os ovos do *S. mansoni* são transportados através da corrente sanguínea e depositados, especialmente no tecido hepático. O acúmulo de ovos nesse tecido promove um processo inflamatório granulomatoso agudo, causado pelos antígenos do miracidium e isto resulta no desequilíbrio oxi-redox hepático (Andrade, 2004). NAC reduz lesões hepáticas causadas por ROS, “varrendo” radicais tóxicos e reduzindo a infiltração inflamatória, disfunção mitocondrial e danos ao DNA. Com relação aos efeitos NAC-protetor na esquistossomose experimental, estudos evidenciam seu papel na imunomodulação e na redução da inflamação granulomatosa, estresse oxidativo e dos indicadores de danos hepático (Fan et al 2007; Seif el-Din, al-Hroob, Ebeid, 2011; Seif el-Din et al., 2006, Aires et. al., 2012). Assim, considerando as propriedades da NAC sob a função hepática e sendo a esquistossomose mansônica uma enfermidade com extensas alterações hepáticas, propomos neste trabalho, investigar o potencial antioxidante da NAC sobre o estresse oxidativo na esquistossomose experimental crônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação pela comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA/UFPE) (processo numero 23076.021878/2008-66), camundongos (n=48) fêmea *Swiss Webster*, com 30 dias de idade e pesando 28±2g, foram obtidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA da UFPE. Para a infecção dos camundongos utilizamos a cepa de *S. mansoni*, Belo Horizonte - Minas Gerais (BH). Após

obtenção de uma suspensão cercariana, trinta e dois camundongos foram infectados via percutânea com 50 cercárias (Olivier; Stirewalt, 1952). O restante dos animais (n=16) foi mantido nas mesmas condições, mas livre de exposição cercariana. Os animais foram divididos de acordo com a exposição cercariana e esquema de intervenção terapêutico empregado. Os animais livres de infecção foram divididos aleatoriamente em dois grupos (G1 e G2) com 8 animais cada e os animais infectados em quatro grupos (G3 – G6) com 8 animais cada, de acordo com o esquema abaixo: G1: Não infectados controle com salina; G2: Não infectados tratados com NAC; G3: Infectados controle com salina; G4: Infectados tratados com NAC; G5: Infectados tratados com PZQ; G6: Infectados tratados com NAC e PZQ. NAC foi diluída em solução salina na dose de 200mg/Kg/dia e administrada via oral a partir do 45° dia após a infecção e foi mantida diariamente até o 180° dias após infecção. Todos os animais submetidos ao tratamento com PZQ receberam a dose curativa, via oral, de 100mg/Kg/dia, por cinco dias consecutivos a partir do 45° dia após a infecção. Os grupos não expostos a nenhuma intervenção terapêutica foram submetidos às mesmas condições que os grupos experimentais. Vinte e quatro horas após a última dose de NAC, no 181° dias após a infecção, todos os camundongos foram submetidos à anestesia e logo após o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro separado por centrifugação para medir os níveis sorológicos da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, e albumina foram medidos em aparelho de Precisão TARGA. Posteriormente, os animais foram perfundidos e o fígado coletado para análise do estresse oxidativo. Ânion superóxido foi medido como previamente descrito (Poderoso et al., 1996). Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medida como um marcador de peroxidação lipídica por espectrofotometria a 532 nm (Draper et al., 1990). O teor de carbonila será determinado segundo Levine, et al., 1990. A quantidade de grupos de proteínas sulphhydryl (TNB formado) será medida a 412 nm, como descrito previamente (Bulaj et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a coleta e centrifugação do sangue para obtenção de soro, não conseguimos amostras suficientes para fazer uma análise estatística confiável. Este fato ocorreu por falha na coleta que causou hemólise. Em nosso estudo, o esquema terapêutico com PZQ reduziu em 100% a carga parasitária, uma vez que nenhum verme foi recuperado do sistema porta-hepático (dados não mostrados) e assim medimos com precisão os efeitos antioxidantes da NAC como droga adjuvante a terapia antischistosoma. Nos grupos sem intervenção com PZQ, a carga parasitária foi mantida e uniforme, assim a inflamação evoluiu, resultando em complicações patológicas, incluindo o dano oxidativo hepático. Assim, mensuramos os efeitos antioxidantes da NAC na fase crônica da infecção esquistossomótica.

Nossos resultados corroboram com os estudos de Sei fel-Din e colaboradores (2006), Sei fel-Din e colaboradores (2010) e Seif el-Din, Al-Hroob, Ebeid (2011), que mostraram que a infecção pelo *S. mansoni* reduz as defesas antioxidantes, uma vez que houve níveis elevados, no tecido hepático, de ânion superóxido, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e redução de grupos sulfidríla. Ademais, durante a infecção a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase é drasticamente reduzida, juntamente com os níveis intracelulares de glutathione no fígado. O sistema oxidante tem importante papel na defesa natural do ser humano, por um equilíbrio natural entre pró-oxidantes e antioxidantes. Nessas condições, a reposição exógena de antioxidantes é essencial para eliminar os produtos de reações oxidativas e manter as operações imunológicas capazes de neutralizar os antígenos de ovos de *S. mansoni* e assim restaurar as funções hepáticas (Sei fel-Din et al., 2006, Seif el-Din, Al-Hroob, Ebeid, 2011). Assim, em nosso desenho de estudo o tratamento com a NAC foi capaz de reduzir os níveis hepáticos de

ânion superóxido, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas e aumenta os níveis de grupos sulfidril no mesmo tecido, quando comparados grupo controle infectado. Esses achados também são observados nos grupos tratados com PZQ.

Os animais tratados com a NAC sofreram redução nos níveis de oxidantes devido a sua atuação direta ou indiretamente, pela neutralização de radicais e reações redox (cisteína-cistina) e síntese de glutathione (Tumur, 2010). O sistema antioxidante também conserva formas reduzidas de grupamentos sulfidril (-SH), pois a NAC estimula o sistema glutathione e suas enzimas, como a glutathione sintetase para a produção de glutathione reduzida (Tumur, 2010). A NAC é capaz de reduzir lesões hepática causadas por ROS, “varrendo” radicais livres e modulando favoravelmente a infiltração inflamatória, disfunção mitocondrial e danos ao DNA.

Em nosso estudo o tratamento com NAC, livre ou associado ao PZQ, reduz os níveis de ânion superóxido. Segundo Sei fel-Din e Colaboradores (2006 e 2011) essa redução pode ser atribuída à ação da NAC em aumentar a síntese de superóxido dismutase (SOD). Além disto, NAC tem papel importante na degradação de H_2O_2 , uma vez que NAC aumenta os níveis de glutathione peroxidase e catalase, enzimas responsável pela conversão H_2O_2 em H_2O e O_2 (Sei fel-Din et al., 2006, Sei fel-Din et al., 2011). Esta reação é importante, pois o H_2O_2 reage com cadeias de ácidos graxos e de outras macromoléculas, como proteínas, presente na membrana celular, aumentando a peroxidação de lipídios. Adicionalmente, o OH também reduz os níveis de cisteína e grupos tiols no curso da infecção. De acordo com os nossos resultados o tratamento com NAC e/ou PZQ confere proteção à membrana celular e as proteínas, uma vez que houve níveis reduzidos de peroxidação de lipídios e grupos carbonila e elevados níveis de albumina e grupos tiol em camundongos tratados. A melhora, desses marcadores de danos oxidativos é diretamente relacionada aos efeitos da NAC em reduzir a cistina extracelular em cisteína, aumentar a atividade da glutathione-S-transferase, aumentando a síntese de glutathione, que desintoxifica aldeídos reativos, como o malondialdeído, que são gerados durante a oxidação de lipídios e promover a desintoxicação, ao agir diretamente sobre espécies reativas de oxigênio, além de ser uma fonte de metabólitos SH e, com isso, estimular a síntese de GSH (Atkuri, Mantovani e Herzenberg, 2007). El-Din e colaboradores (2006), concluem que o tratamento com a NAC, sozinho ou associado ao PZQ, atenua os danos hepáticos ao reduzir marcadores do estress oxidativo e bioquímicos hepático.

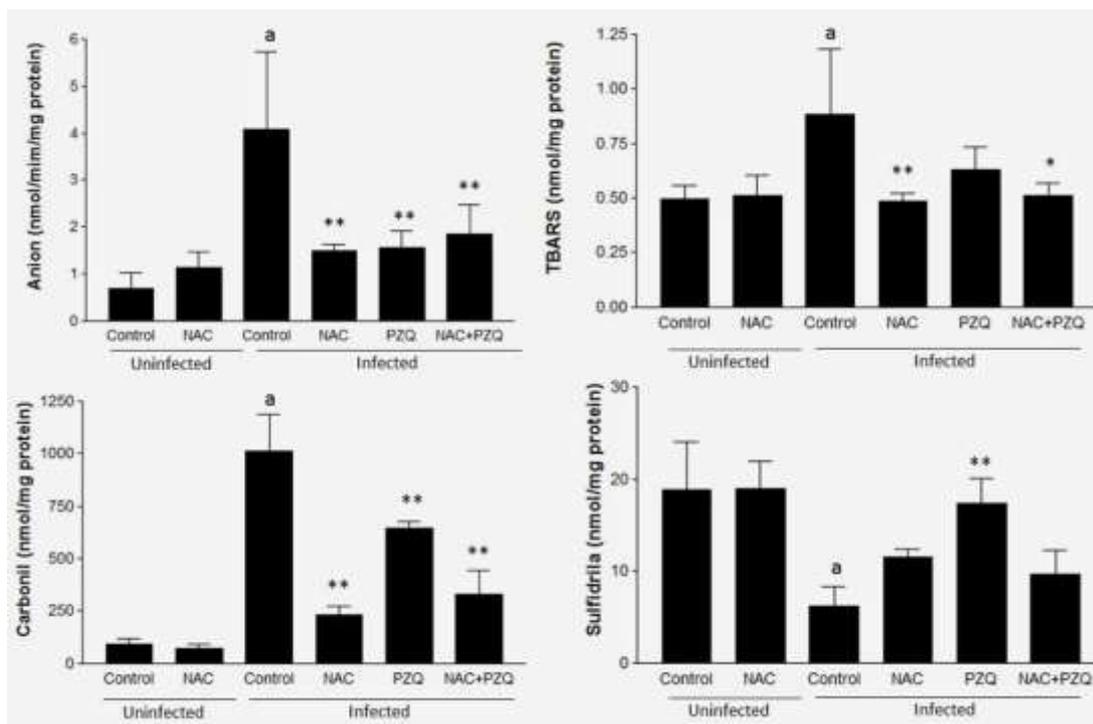


Figura 1 Efeito do tratamento com NAC e/ou do PZQ em camundongos, não infectados e infectados com *S. mansoni*, sobre os níveis de (A) ânion superóxido, (B) peroxidação lipídica, (C) carbonilação de proteínas e (D) grupos sulfidril no tecido hepático. * $P < 0.01$ diferença entre controle infectado e NAC, PZQ e NAC+PZQ infectados; a $P < 0.001$ diferença entre controle não infectado e controle infectado e ** $P < 0.001$ diferença entre controle infectado e NAC, PZQ e NAC+PZQ infectados.

CONCLUSÕES

Camundongos infectados com *S.mansoni* e tratados com NAC apresentaram redução nos níveis de ânion superóxido, peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e aumento de grupos sulfidril em tecido hepático. A associação da NAC ao PZQ favorece a melhora desses marcadores de estresse oxidativo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, pelo fomento necessário e paciência, à Dra. Mônica Pessoa pela participação fundamental junto com toda a equipe do laboratório. Ao LIKA, pela estrutura, à UFPE, bem como a ProExt e ao CNPq pela credibilidade e bolsa cedida. A todos envolvidos direta ou indiretamente, nosso muito obrigado!

REFERÊNCIAS

1. Abdallahi OMS, Hanna S, Reggi Max De, Gharib B. 1999. *Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with Schistosoma mansoni*. Liver 495-500.
2. Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, R.A.R., Schirato, G.V., Filho, N.T.P., Araújo, S.B., Souza, V.M.O., Costa, V.M.A., Malagueño, E., 2012. *Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine*. Parasitol. Res. 4, 1569-1578.
3. Andrade ZA: Schistosomal hepatopathy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 99:51–57, 2004.
4. Atkuri, K.R.; Mantovani, J.J.; HerzenberG, L.A. 2007. N-Acetylcysteine - a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Current Opinion in Pharmacology, 355-359.

5. Bulaj G, Kortemme T, Goldenberg DP. 1998. *Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides*. Biochemistry Jun 23;8965-72.
6. Draper HH, Hadley M. 1990. *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. Methods Enzymol;186:421-31.
7. Jones, A. L. et al. 1994. Portal and 487 systemic haemodynamic action of N-acetylcysteine in patients 488 with stable cirrhosis. **Gut**, v. 35, p. 1290-1293,.
8. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. 1990. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol;186:464-78.
9. Michael G. *Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay*. Analytical Biochemistry 1987 Jun;163(2):476-81.
10. Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 38, 19–23.
11. Poderoso JJ, Carreras M, Lisdero C, Riobi N, Schapfer F, Boveris A. 1996. *Nitric Oxide Inhibits Electron Transfer and Increases Superoxide Radical Production in Rat Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles*. Archives of Biochemistry and Biophysics 1;328(1):85-92.
12. Seif El-Din, S.H., F.A. Ebeid, A.A. Badawy and A.R. Ezzat. 2006. *Protective Effects of carotene; N-acetyl-L-cysteine With and Without Praziquantel Treatment in Schistosoma mansoni-Infected Mic*. 67 – 90.
13. Seif el-Din, Sayed H., Amir M. Al-Hroob, Fatma A. Ebeid. 2011. *Schistosoma mansoni: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice*. Experimental Parasitology 128 (2011) 230–235.
14. Seif el-Din, Sayed H., Naglaa M. El-Lakkany, Heba A. Hagag and Fatma A. Ebeid. 2010. *Role of B-Carotene and N-Acetyl-L-Cysteine With and Without Praziquantel Treatment in Modulating Schistosoma Mansoni-Induced Genotoxic Effects on Albino Mice*. Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 5(1): 8-17.
15. Tumur, Z.; Shimizu, H.; Enomoto, A.; Miyazaki, H.; Niwa, T. 2010. *Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NFkappaB activation*. American Journal Nephrology.31,435-41.