

EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE

CLARISSA S. FERREIRA¹, VICENZO C. PICCOLI², GUSTAVO A. PEREIRA FILHO³, NORMA P. MARRONI⁴, CLÁUDIO G. ZETTLER⁵

RESUMO

A cirrose induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) é um modelo experimental clássico que simula as alterações da doença em humanos. A cirrose apresenta alterações nos mecanismos antioxidantes, com um desequilíbrio nos processos oxirredutivos. A NAC é um antioxidante sintético com diversas aplicações nos últimos quarenta anos, como tratamento de bronquite crônica, fibrose cística, choque séptico, SARA, e intoxicações com paracetamol. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação protetora da NAC sobre o estresse oxidativo em fígados de ratos cirróticos por inalação de CCl₄, utilizando a peroxidação lipídica, as provas de função hepática e a histologia dos fígados dos animais. Foram utilizados 41 ratos Wistar machos, com peso médio de 250g, divididos em 4 grupos: Controle (CO); Controle Tratado (CO + NAC); Cirrótico (CCl₄); Cirrótico Tratado (CCl₄+NAC). Os animais foram submetidos a inalações de CCl₄ (2x por semana) durante 13 semanas. Todos os grupos receberam fenobarbital na água de beber (0,3g/L), a fim de acelerar o metabolismo do CCl₄. A dose de NAC foi de 10 mg/Kg/dia i.p.. A análise estatística utilizada foi ANOVA e teste "t" de Student ($p < 0,05$). A determinação da lipoperoxidação foi avaliada através de quimiluminescência e TBARS, demonstrando maior dano de membranas celulares no grupo CCl₄ ($p < 0,01$)

¹Acadêmico(a) do Curso de Medicina– Bolsista PROICT/ULBRA

⁴Professora - orientadora do Curso de Fisioterapia/ULBRA

²Acadêmico do Curso de Medicina/UFRGS

⁵Professor do Curso Medicina/ULBRA

³Acadêmico do Curso de Medicina/FFFCMPA

e indicando dano reduzido no grupo CCl₄+NAC, que obteve valores semelhantes aos do controle. As provas de função hepática (AST, ALT, BT, BD, Albumina, FA) sugeriram um aumento significativo de lesão tecidual no grupo CCl₄, quando comparado aos demais ($p < 0,001$). Na análise histológica por Picrosíríus, os animais cirróticos apresentaram fibrose severa, enquanto o grupo cirrótico tratado apresentou fibrose leve a moderada. Os dados obtidos sugerem que a NAC oferece proteção ao fígado de ratos cirróticos.

ABSTRACT

The carbon tetrachloride (CCl₄) induced cirrhosis is a classic experimental model that simulates the alterations of the disease in humans. Cirrhosis represents alterations in the antioxidant mechanisms, with an unbalance in the oxidation and reduction processes. N-acetylcysteine (NAC) is a synthetic antioxidant with several applications in the last forty years, such as treatment of chronic bronchitis, cystic fibrosis, septic shock, acute respiratory distress syndrome, and acetaminofen intoxications. The objective of this study was to evaluate the protective action of NAC on oxidative stress in livers of cirrhotic rats with inhaled CCl₄, using the lipid peroxidation, the hepatic function tests and histology of the animal's livers. 41 Males Wistar rats were used, with medium weight of 250g, divided in 4 groups: control (CO); treated (CO + NAC); cirrhotic (CCl₄); and treated cirrhotic (CCl₄+NAC). The animals were submitted to inhalations of CCl₄ (twice a week) for 15 weeks. All groups received fenobarbital in the drinking water (0,3g/L), in order to accelerate the metabolism of CCl₄. The NAC's dose was of 10 mg/kg/day i.p. The statistical analysis performed were ANOVA and the Student's t test ($p < 0,05$). The determination of the lipid peroxidation was evaluated through chemiluminescence and TBARS, demonstrating larger damage of cellular membranes in the CCl₄ group ($p < 0,01$) and indicating reduced damage in the CCl₄+NAC group, which obtained values similar to control. The hepatic function tests (AST, ALT, BT, BD, Albumin, FA) suggested a significant increase of tecidual damage in the group CCl₄, when compared to the others ($p < 0,001$). In the Picrosíríus histological analysis, the cirrhotic animals presented severe fibrosis, while the treated cirrhotic group presented light to moderate fibrosis. The obtained data suggest that NAC offers protection to the liver of cirrhotic rats.

INTRODUÇÃO

Cirrose hepática é definida anatomicamente como um processo difuso de fibrose e formação de nódulos. Representa as conseqüências de uma resposta cicatricial sustentada à lesão hepática crônica, caracterizada por fibrose, regeneração nodular, e destruição da arquitetura do fígado, podendo apresentar variadas causas, como toxinas, infecções virais crônicas e

colestase. O padrão histológico das lesões hepáticas é sempre o mesmo (ou praticamente o mesmo), independentemente da etiologia. Esta característica é resultado das respostas limitadas do fígado à necrose tecidual, que resultam, principalmente, no colapso de lóbulos hepáticos, na formação de septos fibrosos difusos e na regeneração nodular de hepatócitos (Goldman e Bennett, 2000; Sherlock e Dooley, 1997).

A formação da cicatriz fibrosa é resultado do aumento da produção da matriz extracelular e da redução da sua degradação. A célula estrelada hepática (célula de Ito) é a principal célula envolvida na fibrogênese. Localizada no espaço de Disse, entre as células endoteliais e os sinusóides, ela armazena vitamina A e retinóides nos fígados normais. Seguindo a lesão hepática ocasionada, por exemplo, por acetaldeído, ácido ascórbico, TGF- β , CCl_4 , a célula estrelada é ativada e passa a apresentar características de músculo liso, sendo denominada "miofibroblasto". Ocorre aumento de tamanho e proliferação celular, perda dos retinóides armazenados e aumento da expressão da α -actina do músculo liso. O aumento da produção de matriz extracelular nos fígados lesados resulta da maior produção de matriz por cada célula estrelada ativada e do aumento do número destas células (Sherlock e Dooley, 1997).

A primeira investigação caracterizando cirrose por tetracloreto de carbono (CCl_4) foi descrita por Cameron e Karunaratne em 1936. Desde essa data, numerosos estudos têm sido desenvolvidos para uma melhor compreensão dos mecanismos operacionais envolvidos na hepatotoxicidade causada pelo CCl_4 . O CCl_4 é uma potente droga hepatotóxica metabolizada no fígado pelo complexo de enzimas oxidativas denominado complexo enzimático citocromo P-450. Esse processo oxidativo gera o radical triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) e o citocromo P-450 férrico. Parte do radical triclorometil gera o radical triclorometil-peróxil ($\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$). A seguir, ocorre uma série de processos bioquímicos e fisiológicos secundários, que são os últimos responsáveis pelas conseqüências patológicas do metabolismo do CCl_4 . (Recknagel, 1989) O uso de CCl_4 por via inalatória é um modelo efetivo de

cirrose que permite, a longo prazo, a obtenção de modificações histológicas e hemodinâmicas características da cirrose hepática e da hipertensão porta verificadas em humanos. Além disso, parece ser o modelo mais apropriado para o estudo da formação do líquido de ascite. Na cirrose, têm sido descritas alterações nos mecanismos oxidantes / antioxidantes, que se encontram em desequilíbrio e contribuem em grande parte para a necrose hepática. (Clària e Jiménez, 1992; Cremonese e cols., 2001)

Recentemente, o estresse oxidativo tem sido sugerido como uma das principais causas de lesão tecidual. Segundo Lee e cols., 2001, o estresse oxidativo tem um papel fundamental na ativação da célula estrelada hepática, através da indução do NF κ B. Antioxidantes como α -tocoferol podem bloquear a ativação da célula estrelada e, conseqüentemente, a fibrogênese hepática. (Lee e cols., 2001). Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres. Portanto, funcionam em vários tipos de processos degenerativos. O reconhecimento do envolvimento dos radicais livres de oxigênio em diversas enfermidades tem levado à implementação da terapia antioxidante. Nutrientes dietéticos com propriedades antioxidantes estão assumindo grande significado no contexto de certas doenças, como a aterosclerose. Antioxidantes sintéticos têm potencial uso na química, indústria alimentícia e medicina. Alguns desses compostos contêm um grupo funcional quimicamente análogo ao de antioxidantes "naturais", e introduzem novos grupos químicos que aumentam sua amplitude de ação celular ou melhoram sua biodisponibilidade. Por outro lado, outros antioxidantes sintéticos não apresentam analogia estrutural aos naturais, mas exercem alta reatividade para com as espécies

reativas de oxigênio e/ou protegem seletivamente alguns tecidos (Packer e Cadenas, 1997)

A N-Acetilcisteína é um composto tiólico que vem sendo utilizado na clínica há mais de quarenta anos. Teve sua primeira aplicação no tratamento de doenças congestivas e obstrutivas pulmonares associadas a hipersecreção de mucosa, como bronquite crônica e fibrose cística. (Pastor e cols., 1997) É utilizada, atualmente, como principal antídoto em intoxicações com paracetamol, provavelmente por restaurar as reservas hepáticas de glutathiona (Hardman, Limbird e Gilman, 2001). Outras aplicações incluem o tratamento da síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e de casos de imunodeficiência causada pelo HIV-1. A NAC funciona como um antioxidante que reduz eficientemente as espécies reativas de oxigênio. Além de sua capacidade de interagir diretamente com agentes oxidantes, exerce seu efeito antioxidante indiretamente, servindo como precursora para a síntese de glutathiona (Pastor e cols., 1997). Embora a elevação da glutathiona reduzida (GSH) possa explicar a eficácia da NAC na SARA e no choque séptico, o número de mediadores inflamatórios regulados para cima durante a sepse sugere que a prevenção direta tiol-dependente da regulação do NF- κ B também pode ser terapêuticamente efetiva. Estudos anteriores demonstraram que o NF- κ B – um fator de transcrição nuclear – pode ser ativado por agentes oxidantes, como H_2O_2 , e que antioxidantes como a NAC podem prevenir esta ativação (Packer e Cadenas, 1997).

Nossos objetivos foram avaliar as alterações hepáticas no modelo experimental de ratos cirróticos por inalação de Tetracloreto de Carbono (CCl_4), utilizando as provas de função hepática e a histologia dos fígados dos animais. Também

objetivamos determinar os efeitos da administração da N-Acetilcisteína sobre o estresse oxidativo através da avaliação da peroxidação lipídica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldim e Raymundo, 1997).

Utilizaram-se 41 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da UFRGS. O peso médio dos animais foi de 250 gramas. Os animais ficaram condicionados em gaiolas de polipropileno de dimensões 47 cm X 34 cm X 18 cm, sob um ciclo de dia e noite de 12 horas e com temperatura controlada. Os animais foram alimentados com ração (Purina-Nutripal, Porto Alegre/RS, Brasil) e água foi fornecida em mamadeira de vidro com bico de inox e rolha de borracha, ambos ad libitum.

Drogas

Com o objetivo de provocar indução enzimática e, assim, abreviar o tempo necessário para o desenvolvimento da cirrose hepática, foi acrescentado fenobarbital na água de beber de todos os animais, na concentração de 0,3 g/l. A administração de fenobarbital iniciou 7 dias antes e continuou durante todo o experimento.

O CCl_4 foi administrado aos animais por via inalatória, na vazão de 1 litro/min, duas vezes por semana (segundas-feiras e sextas-feiras).

A N-Acetilcisteína (Sigmaâ) foi aplicada todos os dias do procedimentos (15 semanas) por via intraperitoneal, na dose de 10mg/Kg de peso do animal.

Drogas para avaliação de lipoperoxidação dos métodos TBARS e QL são descritas posteriormente.

Procedimentos

Grupos Experimentais

Os Animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

Controle (CO)

Controle Tratado (CO + NAC)

Cirrótico (CCl_4)

Cirrótico Tratado (CCl_4 + NAC)

Após 15 semanas do início do experimento, os animais foram sacrificados. Os fígados e amostras de sangue foram retirados para análise.

Inalação de CCl_4

Os grupos submetidos a inalações de CCl_4 (grupos 3 e 4) foram expostos a essa droga duas vezes por semana (segundas e sextas-feiras). Os animais eram colocados no interior de uma câmara de inalação com 47 cm X 34 cm X 18 cm. O CCl_4 era

colocado em um recipiente de vidro (umidificador) ligado a um compressor de ar com uma vazão de 1litro/min. Nas primeiras 3 sessões, o tempo de exposição ao gás foi de 30 segundos, permanecendo os animais no interior da câmara por mais 30 segundos com o compressor desligado (tempo de espera). Na Quarta sessão, o tempo de exposição aumentou para 1 minuto, seguido de mais 1 minuto de tempo de espera. Subseqüentemente, a exposição ao gás e o respectivo tempo de espera aumentaram 30 segundos a cada três sessões, até alcançar o tempo máximo de cinco minutos.

Processamento do tecido hepático

Após o sacrifício dos animais, amostras do tecido hepático de cada animal foram colhidas para avaliação da lipoperoxidação. Os tecidos foram colocados em solução de tampão fosfato 20mM (KCl 140mM) na proporção de 9ml por grama de tecido. Homogeneizaram-se os fígados em homogeneizador ULTRA TURRAX (IKA-WERK), por 40 segundos, à temperatura de 0-2°C. Os homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada (SORVALL RC 5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 minutos a 3000rpm (Llesuy e cols., 1985). Desprezou-se o precipitado de cada amostra, e o sobrenadante foi utilizado nas técnicas descritas a seguir.

Quantificação de proteínas

A determinação de proteínas a partir de homogeneizado de tecido hepático foi realizada segundo o método de Lowry e cols., 1951. Albumina

bovina (SIGMA) foi utilizada como padrão, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 265 nm.

Avaliação da Lipoperoxidação

Método de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúricos (TBARS)

A técnica de TBARS foi realizada conforme o método de Buege & Aust, 1978, utilizando solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%, homogeneizado de tecido hepático (conforme descrito anteriormente), ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e água destilada. Essa mistura foi aquecida a 100°C durante 15 minutos e resfriada em gelo. Após adição de álcool n-butílico e agitação por 40 segundos, esse material foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Assim, obteve-se um sobrenadante corado, resultante da reação de malondialdeído e outros subprodutos liberados na lipoperoxidação. O sobrenadante foi colocado em cubeta de quartzo para leitura a 535 nm em espectrofotômetro (UvVis Spectrophotometer METROLAB 1700). Os resultados foram expressos em nanomoles por miligrama de proteína (nmoles/mg prot).

Determinação da Quimiluminescência iniciada por Hidroperóxido de Tert-Butil (QL)

Com o mesmo intuito de avaliar a lipoperoxidação, utilizou-se a quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil (QL). O

método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado do tecido em estudo. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação de quimiluminescência produzida pela amostra. Em tecidos submetidos a estresse oxidativo, o valor correspondente a este tecido em condições fisiológicas (pré-estresse).

A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio (Liquid Scintillation Corenter, 1209 RACKBETA, LKB WALLAR) Os resultados foram expressos em contas por segundo (cps) por mg de proteína (Gonzalez-Flecha e cols., 1991).

Para cálculo de QL, foi considerada a emissão máxima descontada a emissão basal (a QL do vial com o tampão mais o homogeneizado).

Provas de Função Hepática

Retirou-se 2 a 3 ml de sangue dos animais sacrificados para análise das bilirrubinas, da albumina, da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST) e da fosfatase alcalina. As provas de função hepática foram realizadas no Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Anatomopatológico

Para o exame do anatomopatológico, o material de tecido hepático foi incluído em blocos de parafina, sendo posteriormente cortado em

micrótomo rotativo na espessura de 6 μ m. Foram realizadas as técnicas de coloração Hematoxilina-Eosina, para avaliação histológica habitual e Picosírius, para a avaliação do grau de fibrose hepática das amostras.

Analisaram-se as lâminas em microscópio binocular Nikon Labophot nos aumentos de 25X, 100X, 200X e 400X.

O grau de fibrose foi classificado da seguinte maneira:

Grau Leve: comprometimento de 25% dos espaços-porta;

Grau Moderado: comprometimento de 25 a 75% dos espaços-porta

Grau Severo: comprometimento de mais de 75% dos espaços-porta.

Análise Estatística

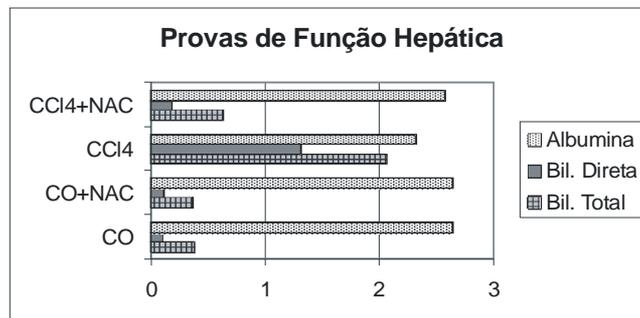
A análise estatística utilizada foi ANOVA e teste "t" de Student. Para o anatomopatológico, utilizou-se o teste U de Mann Whitney (não paramétrico). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados

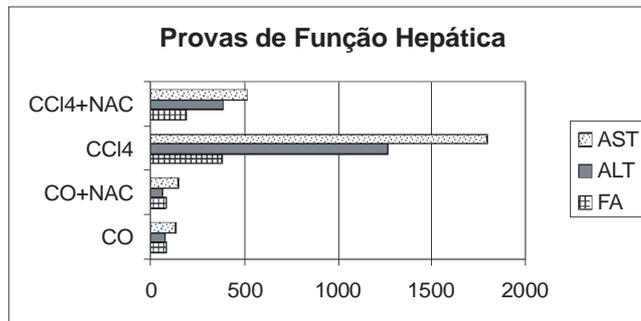
foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Avaliação da Função Hepática

Ao avaliarmos a bilirrubina total (Bil. Total), a bilirrubina direta (Bil. Direta), a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina (FA), percebemos o mesmo padrão de resultados, ou seja, todas elas apresentam um aumento significativo no grupo cirrótico (CCl₄) quando comparado aos demais grupos: cirróticos tratados (CCl₄+NAC), controles tratados (CO+NAC) e controles (CO), para um p<0,001. A diferença de médias entre o grupo cirrótico e o grupo cirrótico tratado foi de 1,43 unidades para Bil. Total; 1,12 unidades para Bil. Direta; 1284,17 unidades para AST; 871,57 unidades para ALT; 194,51 unidades para FA. A albumina apresentou medidas menores no grupo cirrótico, quando comparado aos demais grupos. Esta diferença foi estatisticamente significativa e, entre os grupos CCl₄+NAC e CCl₄, teve o valor de 0,25 unidades.

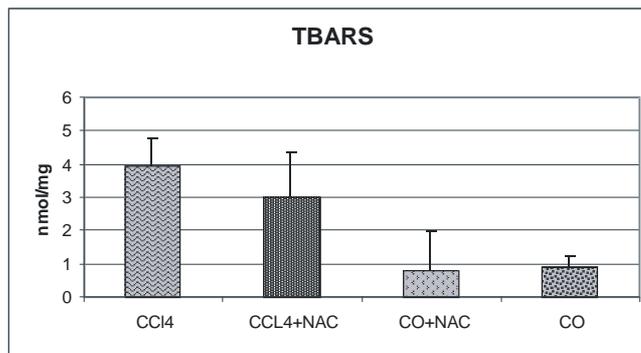




Avaliação da Peroxidação Lipídica

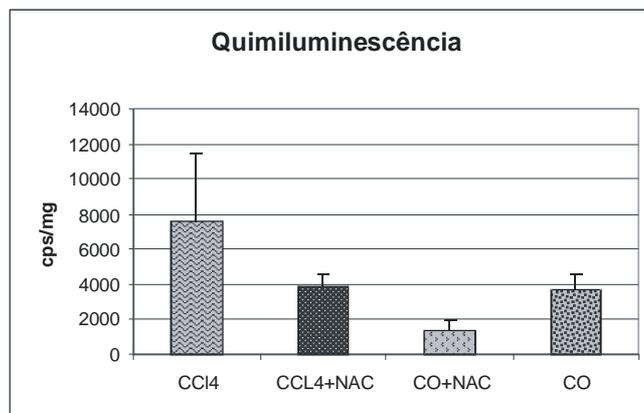
A avaliação dos valores encontrados pelo método de *substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico* (TBA-RS), demonstra um aumento significativo do estresse oxidativo nos grupos CCl₄ e

CCl₄ + NAC, quando comparados aos grupos CO + NAC e CO, para um $p < 0,001$. Entre os grupos cirrótico e cirrótico tratado, o valor de p foi menor do que 0,05 e a diferença de médias foi de 0,95 unidades. Quando comparados os grupos CCl₄ e CO, a diferença de médias representou 3,04 unidades.



Quando se avalia o estresse oxidativo através da quimiluminescência observa-se que o grupo CCl₄ apresenta um aumento significativo de seus valores quando comparado ao grupo CO + NAC, para um $p < 0,001$ e também em re-

lação aos grupos CO e CCl₄ + NAC, para um $p < 0,01$. A diferença de médias foi de 3658,6 unidades entre os grupos cirrótico e cirrótico tratado e de 3878,5 unidades entre os grupos cirrótico e controle.



Análise histológica

Ao exame histológico dos fígados dos animais, observou-se que no grupo dos animais cirróticos havia fibrose severa, com comprometimento de mais de 75% dos espaços porta. No grupo dos animais tratados, encontrou-se fibrose leve a moderada, com comprometimento de 25% a 50% dos espaços porta. Por fim, nos animais controle, não se evidenciou qualquer alteração anatomopatológica.

DISCUSSÃO

A cirrose hepática induzida pela inalação de CCl_4 é um método experimental eficaz, no qual a lesão hepática provavelmente se origina a partir da formação de radicais livres. O modelo utilizado neste trabalho é uma adaptação do proposto por Clària e Jiménez, 1992, e apresenta, como principal diferença, o aumento mais gradual no tempo gaseado – de 30 segundos a cada três sessões – produzindo progressivo desarranjo do parênquima hepático sem acarretar em mortalidade tão acentuada como ocorria inicialmente,

quando se utilizavam incrementos de 1 minuto no tempo de inalação (Cremonese e cols., 2001).

A produção de espécies reativas de oxigênio e a peroxidação lipídica estão associadas à fibrose hepática e cirrose. Em estudos anteriores, estes efeitos foram parcialmente prevenidos por compostos antioxidantes como a-tocoferol, adenosina e S-adenosil-L-metionina (SAM) (Simile e cols., 2001; Hernandez-Muñoz e cols., 2001; Pastor e cols., 1996). Nossos resultados demonstraram que o modelo experimental de cirrose foi adequadamente reproduzido e que as alterações esperadas no grupo dos animais cirróticos puderam ser observadas nas provas de função hepática, na peroxidação lipídica e na histologia. A avaliação dos animais tratados com NAC permitiu afirmar que este grupo teve menores alterações do que o grupo cirrótico, o que sugere prevenção por este antioxidante.

No que diz respeito à função dos hepatócitos, é importante recordar que mais de 90% das proteínas corporais e 100% das específicas, como a albumina, são sintetizadas no fígado. Por isso, os níveis séricos de albumina tornam-se importantes indicadores da função hepática (Henry, 1999).

Ao analisarmos o grupo cirrótico, percebemos uma diminuição dos níveis de albumina, enquanto que o grupo tratado com NAC manteve os valores próximos ao dos grupos controles.

As aminotransferases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) estão envolvidas nas vias de interconversão aminoácido-carboidrato. Dessas duas enzimas, a ALT está predominantemente no fígado e é um excelente marcador para lesão ou necrose hepática (Henry, 1999). Em nossos animais, observamos uma ampla elevação de ambas as enzimas no grupo cirrótico, em comparação aos demais grupos, o que sugere um lesão hepática extensa, sendo parcialmente revertida pelo uso da NAC no grupo tratado.

O metabolismo da bilirrubina depende de sua velocidade de síntese a partir da ruptura da hemoglobina e de sua velocidade de excreção através dos canalículos e ductos biliares no fígado. Antes de ser excretada, a bilirrubina conjuga-se ao ácido glicurônico no retículo endoplasmático liso do hepatócito (Henry, 1999). Obtivemos um aumento dos níveis de bilirrubina direta e total no grupo cirrótico em relação aos demais, o que pode ser explicado pelo bloqueio da excreção biliar causado pela cirrose. No grupo tratado com NAC, foi observada uma redução dos valores das bilirrubinas, por provável diminuição na obstrução nos ductos e canalículos biliares.

A fosfatase alcalina está presente em vários tecidos, incluindo o fígado, ossos, rins, intestinos e placenta (Henry, 1999). Nossos resultados apresentaram aumento significativo da FA nos animais cirróticos quando comparado aos demais grupos, o que indica maior disfunção biliar nesse grupo. No grupo tratado os resultados foram semelhantes aos obtidos no grupo controle.

A lipoperoxidação é um marcador para a lesão das membranas celulares. Os resultados obtidos na avaliação do grupo cirrótico evidenciaram um grande aumento do estresse oxidativo neste grupo, o que foi observado em ambas as técnicas (TBA-RS e QL.). O grupo cirrótico tratado apresentou valores menores, principalmente na avaliação da quimiluminescência, na qual eles foram semelhantes aos do grupo controle. Este resultado sugere que a NAC promova uma resistência à peroxidação lipídica provocada pelo CCl_4 , o que também foi demonstrado com o uso de outro antioxidante (5'-Methylthioadenosine) por Simile e cols., 2001. Desse modo, a NAC parece estar protegendo o parênquima hepático da ação dos radicais triclorometil e triclorometilperoxil, devido ao seu potencial antioxidante.

A análise histológica dos fígados dos animais do grupo CCl_4 permitiu a observação de fibrose severa, com formação nodular e destruição da arquitetura do fígado. Estes achados permitem a afirmação do diagnóstico de cirrose, como era esperado para os animais desse grupo. No grupo dos animais tratados com NAC, as alterações foram menores, caracterizadas por fibrose leve a moderada e pela ausência dos nódulos característicos da cirrose.

A melhora da função hepática e da histologia dos ratos tratados com o antioxidante podem ser explicadas pela ação da NAC sobre o estresse oxidativo, que vem sendo descrito como um dos responsáveis pela ativação da célula estrelada hepática. (Lee e cols., 2001; Bruck e cols., 2001; Walen e cols., 1999). Sugere-se que a NAC esteja prevenindo a indução do NFkB, bloqueando, desta forma, a ativação da célula estrelada e a fibrogênese hepática.

CONCLUSÕES

As provas de função hepática demonstram maior lesão tecidual no grupo cirrótico e indicam que a lesão é reduzida no grupo cirrótico tratado, que obteve valores semelhantes aos dos grupos controles;

As medidas da peroxidação lipídica foram maiores no grupo CCl_4 , indicando maior dano de membranas celulares nesse grupo, possivelmente pelo efeito do estresse oxidativo. No grupo cirrótico tratado, os valores foram menores, sugerindo proteção pela droga utilizada.

A análise histológica permitiu afirmar que a indução de cirrose foi eficaz entre os animais avaliados. Com a técnica de Picrosírius, observou-se menor fibrose no grupo CCl_4 + NAC, quando comparado ao CCl_4 , sugerindo proteção pela NAC.

Em suma, a NAC parece oferecer proteção ao fígado de ratos cirróticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. 10. ed. Blackwell Science Ltd, 1997. p. 371-384.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. **Cecil Textbook of Medicine**. 21.ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 2000.

CAMERON, J. R.; KARUNARATE, W. A. E. Carbon tetrachloride cirrosis in relation to liver regeneration. **Journal of Pathology**

and Bacteriology, v.92, p.1-4, 1936.

RECKNAGEL, R. O.; GLENDE, E.; DOLAK, J. R.; WALLER, R. L. Mechanisms of Carbon Tetrachloride Toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, p.139-54, 1989.

CLÀRIA, J.; JIMÉNEZ, W. Cirrosis hepática experimental y fisiopatología de la formación de ascitis en la enfermedad hepática crónica. **Gastroenterología y Hepatología**, v.15, p. 171-182, 1992.

CREMONESE, R. V.; PEREIRA FILHO, A. A.; MAGALHÃES, R.; MATTOS, A. A.; MARRONI, C. A.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, N. P. Cirrose experimental induzida pela inalação de tetracloreto de carbono: adaptação da técnica e avaliação da peroxidação lipídica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n.1, p.40-47, jan/mar. 2001.

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

PACKER, Lester; CADENAS, Enrique. **Handbook of Synthetic Antioxidants**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. p.24-28.

PASTOR, A.; COLLADO, P. S.; ALMAR, M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. **Journal of Hepatology**, v.27, p.363-370, 1997.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. International edition. New York: McGraw Hill, 2001.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

LLESUY, S.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damaged induced by adrimycin and 4'-epiadramycin in mice. **Tumori**, v.71, p.241-249, 1985.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In:METHODS in Enzimology, n.52, p.302-309, 1978.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxidiniated Chemiluminescence: on Assay for Oxidative Stress in Biopsis of Heatr, Liver, and Muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v.10, p.93-100, 1991.

SIMILE, M. M.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; DE MIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; CALVISI, D. F.; CARRU, A.; PASCALE, R. M.; FEO, F. 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, v.34, p.386-394, 2001.

HERNANDEZ-MUÑOZ, R.; DIAZ-MUÑOZ, M.; SUÁREZ-CUENCA, J. A.;

TREJO-SOLÍZ, C.; LÓPEZ, V.; SÁNCHEZ-SEVILLA, L.; YÁÑES, L.; SÁNCHEZ, V. C. Adenosine Reverses a Preestablished CCl4 – Induced Micronodular Cirrhosis Through Enhencing Collagenolytic Activity and Stimulating Hepatocyte Cell Proliferation in Rats. **Hepatology**, v.34, p.677-687, 2001.

PASTOR, A.; COLLADO, P. S.; ALMAR, M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Microsomal function in biliary obstructed rats: effects of S-adenosyl-methionine. **Journal of Hepatology**, v.24, p.353-359,1996.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. São Paulo: Manole, 1999. p.253-267.

BRUCK, R.; SHIRIN, H.; AEED, H.; MATAS, Z.; HOCHMAN, A.; PINES, M.; AVNI, Y. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. **Journal of Hepatology**, v.35, p.457-464, 2001.

WHALEN, R.; ROCKEY, D. C.; FRIEDMAN, S. L.; BOYER, T. D. Activation of rat hepatic stellate cells leads to loss of glutathione S-transferase and their enzymatic activity against products of oxidative stress. **Hepatology**, v.30, p.927-933, 1999.