



AÇÃO DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, FIBROSE E ALTERAÇÕES HEPÁTICAS NA CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

Tayná Oliveira Mendes¹

Josieli Raskopf Colares²

Norma Possa Marroni³

Resumo

A melatonina (Mel) vem sendo muito estudada e citada em diferentes estudos como potente antioxidante. A obstrução prolongada do ducto biliar é um modelo experimental eficaz para indução de cirrose biliar secundária. **Objetivo:** Avaliar a ação da Mel na cirrose biliar secundária induzida pela ligadura de ducto biliar (LDB). **Métodos:** Foram utilizados 36 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: CO, CO+Mel, LDB e LDB+Mel. A Mel (20 mg/kg) foi administrada a partir do 14º dia da LDB até o 28º dia. No 29º dia, foi coletado sangue para análise da integridade hepática, fígado e baço para a avaliação da relação hepatossomática e esplenossomática, tecido hepático para análise histológica e de estresse oxidativo. **Resultados:** Na avaliação das enzimas AST, ALT e FA observa-se um aumento no grupo LDB quando comparado aos grupos controles ($p < 0,001$) e uma diminuição com o uso da Mel ($p < 0,001$). A relação hepatossomática e esplenossomática apresentaram um aumento no grupo LDB quando comparados aos grupos controles ($p < 0,001$), e uma diminuição no grupo LDB+Mel ($p < 0,001$). Na avaliação da lipoperoxidação, observou-se diferença do grupo LDB quando comparados aos grupos controles ($p < 0,001$) e uma redução no grupo LDB+Mel ($p < 0,001$). As enzimas catalase e superóxido dismutase, apresentam redução no grupo LDB com relação aos controles ($p < 0,01$) e um aumento no grupo LDB+Mel ($p < 0,001$). Na análise histológica do tecido hepático pode-se observar um parênquima hepático normal em animais dos grupos controles, no grupo LDB observa-se desorganização tecidual, presença de infiltrado inflamatório e fibrose. No grupo LDB+Mel, observa-se uma restauração do parênquima hepático. **Conclusão:** Os resultados sugerem um efeito protetor da Mel quando administrada em ratos com cirrose biliar secundária induzida por LDB.

Palavras-chave: Antioxidantes; radical livre; ligadura de ducto biliar.

INTRODUÇÃO

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas. A ligadura de ducto biliar (LDB) mimetiza a cirrose biliar secundária em humanos. A colestase de longa duração representa a principal causa de dano hepático, o acúmulo de ácidos biliares tóxicos exerce um papel fundamental na determinação da necrose e, com isso, da fibrose hepática (ORELLANA et al., 2000).

O EO é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes, a favor das oxidantes (SIES; MURPHY, 1991), e parece estar relacionado com as doenças hepáticas (TIEPPO et al., 2005; VERCELINO et al., 2010).

Atualmente inúmeros estudos vêm demonstrando as propriedades antioxidantes da Mel em diferentes modelos experimentais. Dentre seus diversos efeitos atribuídos, podemos salientar sua capacidade AOX, bem como seus efeitos anti-inflamatório, imunomodulador e

1 Aluna do curso de graduação Enfermagem – Bolsista PROBIC/Fapergs – tayna.om@gmail.com

2 Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada à saúde pela ULBRA – Bolsista CNPq – jozy.ma@hotmail.com.

3 Professora do curso de graduação odontologia e PPGBioSaúde da ULBRA – nmarroni@terra.com.br

associados à resistência à insulina (MACCHI e BRUCE, 2004; ROSA et al, 2010; BONA et al., 2012).

A melatonina ((Mel) N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina lipofílica, sintetizada a partir da serotonina, é citada em diferentes estudos como potente antioxidante, atuando na diminuição da formação de radicais livres, com efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores e oncostático (REITER et al., 2000; MOREIRA et al., 2015.).

Levando-se em consideração estes dados, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação da Mel sobre os marcadores de EO, fibrose e alterações hepáticas em ratos com cirrose biliar secundária, induzida pela LDB.

METODOLOGIA

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, com peso ± 300 gramas, divididos em 4 grupos experimentais:

- CO: submetido à simulação da cirurgia de LDB e tratado com veículo NaCl;
- CO+Mel: submetido à simulação da cirurgia de LDB e tratado com Mel;
- LDB: submetido à cirurgia de LDB e tratado com veículo NaCl;
- LDB+Mel: submetido à cirurgia de LDB e tratado com Mel.

A LDB foi realizada conforme estabelecido por Kountouras et al. 1984. A cirurgia de iniciou com a anestesia dos animais mediante a administração de uma mistura de Cloridrato de Xilazina 8 mg/Kg e Cloridrato de Cetamina 95 mg/Kg i.p, após realizou-se laparotomia ventral média e posterior dissecação do ducto biliar, ligando-se por meio de dois nós.

O tratamento com veículo NaCl ou Mel iniciou no 14º dia após a LDB em todos os grupos. A Mel foi administrada diariamente na dose de 20 mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal e foi preparada utilizando etanol 1% em NaCl 0,9% (GRIGOROV et al., 2014).

Após 28 dias os animais foram novamente pesados e anestesiados. O sangue foi coletado, através da técnica de punção do plexo veno retro-orbital (HALPERN; PACAUD, 1951), para avaliar a integridade hepática através da AST, ALT e FA. O fígado e o baço foram coletados, sendo estes pesados para realização das relações hepatossomática (RHS) e esplenossomática (RES). Uma porção do fígado foi congelada a -80 °C para posteriores análises de TBARS, SOD e CAT e outra para as análises histológicas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguido do teste Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações ($p < 0,01$).

O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal conforme estabelecido pela Legislação Brasileira (Lei 11.794/2008) e do Código Estadual de Proteção aos Animais. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), da ULBRA mediante aprovação dos protocolos de número 2015 – 2P e obedeceu às diretrizes mínimas para o uso de animais.

RESULTADOS

Podemos observar, na tabela 1, os valores das enzimas de integridade hepáticas, um aumento significativo de todas as enzimas no grupo LDB com relação aos grupos controles ($p < 0,001$), e uma diminuição significativa destes valores no grupo LDB+Mel em comparação com o grupo LDB ($p < 0,001$).

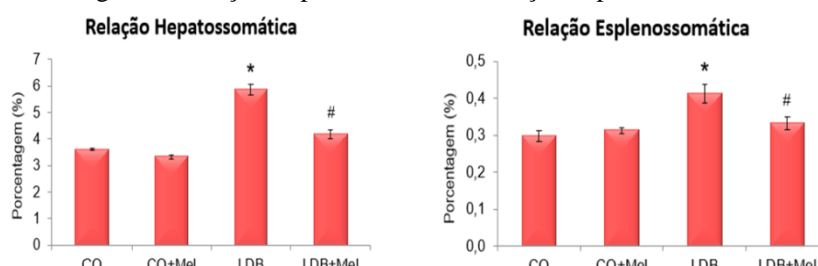
Tabela 1: Valores das enzimas de integridade hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e fosfatase alcalina (FA) em plasma, nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)
CO	88,8 ± 10,9	37,0 ± 1,9	122,4 ± 13,5
CO+Mel	90,4 ± 8,4	38,8 ± 3,2	111,6 ± 8,1
LDB	425,8 ± 46,6*	105,8 ± 13,5*	381,2 ± 35,5*
LDB+Mel	117,5 ± 18,8#	42,0 ± 3,4#	104,3 ± 11,0#

* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+Mel (p<0,001).
Diminuição significativa em relação ao grupo LDB (p<0,001).

Nos resultados de RHS e RES observa-se um aumento significativo destas no grupo LDB, quando comparados aos grupos controles (p<0,001) e uma diminuição significativa no grupo LDB+Mel em comparação com o grupo LDB (p<0,001).

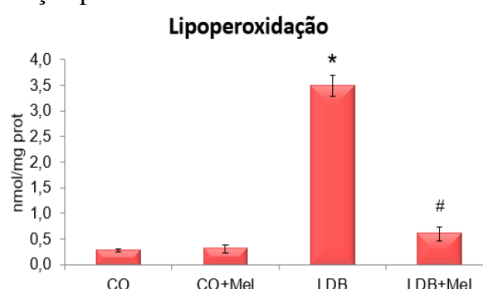
Figura 1: Relação Hepatosomática e Relação Esplenossomática.



* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+Mel (p<0,001).
Diminuição significativa em relação ao grupo LDB (p<0,001).

Analisando a lipoperoxidação hepática realizada através da técnica de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (BUEGE; AUST, 1978) observou-se um maior dano no grupo LDB quando comparado aos grupos controles, e uma diminuição nos animais do grupo LDB+Mel.

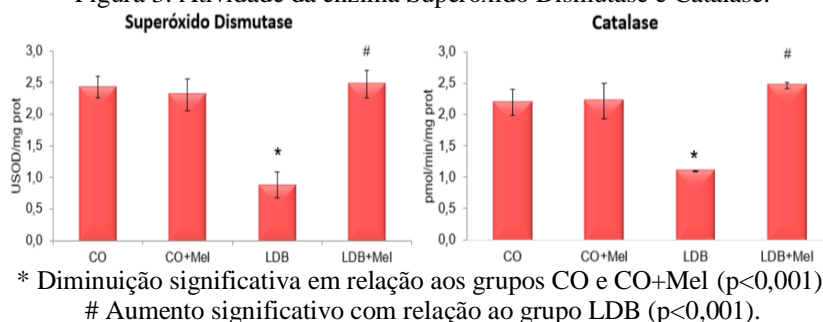
Figura 2: Avaliação da lipoperoxidação pela técnica de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).



* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+Mel (p<0,001).
Diminuição significativa com relação ao grupo LDB (p<0,001).

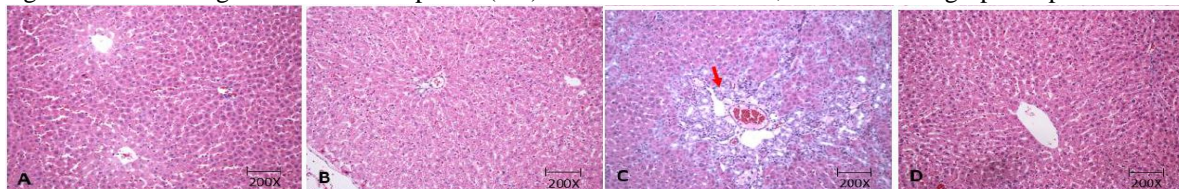
As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram uma menor atividade no grupo LDB quando comparada aos grupos controle (p<0,01). No grupo LDB+Mel observou-se um aumento destas quando comparadas ao grupo LDB. (MIRSA; FRIDOVICH, 1972; BOVERIS; CHANCE, 1973).

Figura 3: Atividade da enzima Superóxido Dismutase e Catalase.



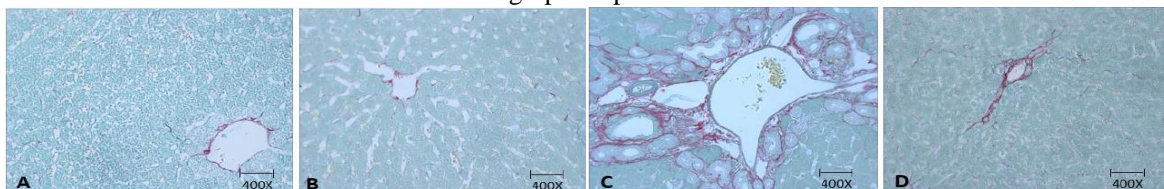
Na análise histológica dos diferentes grupos avaliados, observou-se que os grupos CO e CO+Mel apresentam uma arquitetura normal do fígado. No grupo LDB evidenciou-se uma destruição do parênquima hepático, infiltrado inflamatório e fibrose, observado pela coloração de HE e Picrosirius. O uso da Mel no grupo LDB+Mel restaurou o parênquima hepático, como observado nas figuras 4 e 5.

Figura 4: Fotomicrografia do tecido hepático (HE) em aumento de 200X, nos diferentes grupos experimentais.



Em A e B pode-se observar o parênquima hepático de animais dos grupos controle, respectivamente. Em C, observa-se em análise histológica do fígado de um animal do grupo LDB, alteração do parênquima e presença de infiltrado inflamatório (seta vermelha) e em D, pode-se observar, em animal do grupo LDB+Mel, uma reestruturação do parênquima.

Figura 5: Análise histológica do tecido hepático a partir da coloração picrosirius em aumento de 400X, dos diferentes grupos experimentais.



Observamos ausência de septos fibróticos em A e B. Em C, observa-se o grupo LDB com uma marcação positiva da coloração e em D, pode-se observar uma marcação mínima da coloração no grupo LDB+Mel.

CONCLUSÃO

A LDB mimetiza a cirrose biliar secundária em humanos, sendo um modelo eficaz para o estudo de alterações decorrente de alterações no parênquima hepático. A Mel parece ser um antioxidante eficaz neste modelo experimental uma vez que normaliza as provas de integridade hepática, diminui o estresse oxidativo e restaura o parênquima hepático a julgar pela histologia.

REFERÊNCIAS

BONA, S. et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **ISRN gastroenterology**. 2012.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal.**, v.134: p.707-16, 1973.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Met Enz.**, v. 52, p. 302-10, 1978.

GRIGOROV, I. et al. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 2014.

HALPERN, B.; PACAUD, A. Technique de pelevement dechantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophthalmique. **Comptes Rendus Des Seances de la societe de biologie et de ses filiales (S.I.)**. v.145, n.19-2, p.1465-6, 1951.

KOUNTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHEUER, P.J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **British journal of experimental pathology**. v.65, n.3, p.305, 1984.

LLESUY, S. Introducción y especies activas de oxígeno. In: ULBRA (ed). **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Canoas: Marroni NP (org),p.21-32,2002.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v25, n.3, p.177-95, 2004.

MIRSA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biology and Chemistry**, v.247, p.3170-5, 1972.

MOREIRA, A.J.; ORDOÑEZ, R.; CERSKI, C.T.; PICADA, J.N.; GARCÍA-PALOMO, A.; Marroni, N.P.; MAURIZ, J.L.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. **Plos One**. v. 10, p. e0144517, 2015.

ORELLANA, M.; RODRIGO, R.; THIELEMANN, L. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. v.126, n.2, p.105-11, 2000.

REITER, R.J. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.917, p.376-86, 2000.

ROSA, D.P.D. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.47, n.1, p.72-8, 2010.

SIES, H.; MURPHY, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**. v.8, n.2, p.211-8, 1991.

TIEPPO, J. et al. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. **Arquivos de gastroenterologia**. v.42, n.4, p.244-8, 2005.

VERCELINO, R. et al. S-nitroso-N-acetilcisteína atenua a fibrose hepática em ratos cirróticos. **Journal of Molecular Medicine**. v.88, n.4, p.401-11, 2010.