



## ACÇÃO DA MELATONINA NA SÍNDROME HEPATOPULMONAR EM RATOS

Jayne Torres de Sousa<sup>1</sup>  
Josieli Raskopf Colares<sup>2</sup>  
Norma Possa Marroni<sup>3</sup>

### Resumo

A Melatonina (MLT) vem sendo muito estudada e citada em diferentes estudos como potente antioxidante. O modelo experimental de Ligadura de Ducto Biliar (LDB) é capaz de simular a Síndrome Hepatopulmonar (SHP) experimental. **Objetivo:** Avaliar as alterações pulmonares, diafragmáticas de animais submetidos à LDB, assim como a ação do antioxidante Melatonina. **Métodos:** Foram utilizados 36 ratos Wistar, divididos em quatro grupos: CO, CO+MLT, SHP e SHP+MLT. A MLT (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, tecido hepático e pulmonar para análise histológica e o diafragma para análise de estresse oxidativo. **Resultados:** Na avaliação das enzimas AST, ALT e FA observa-se um aumento no grupo SHP quando comparado aos grupos controles e uma diminuição com o uso da MLT. Na avaliação da lipoperoxidação, observou-se aumento do grupo SHP quando comparados aos grupos controles e uma redução no grupo SHP+MLT. As enzimas catalase e superóxido dismutase, apresentam redução no grupo SHP com relação aos controles e um aumento no grupo SHP+MLT. Na análise histológica do fígado pode-se observar uma destruição do parênquima hepático e infiltrado inflamatório ao avaliar o pulmão pode-se observar vasodilatação e quando administrado MLT verificou-se diminuição na vasodilatação. **Conclusão:** A MLT se mostrou eficaz na redução das enzimas de integridade hepática e dos danos oxidativo no diafragma, bem como das alterações teciduais no fígado e no pulmão.

Palavras chave: Antioxidantes; ligadura de ducto biliar; estresse oxidativo.

### INTRODUÇÃO

A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) é uma complicação importante da cirrose hepática, caracterizada por alterações funcionais da oxigenação arterial, em contexto de doença hepática, resultantes de uma marcada dilatação das arteríolas e capilares pulmonares – vasodilatação pulmonar – induzida por mediadores liberados pelo fígado lesado (FREIRE et al., 2007).

A consequência das dilatações vasculares intrapulmonares observadas na SHP é a impossibilidade das moléculas de O<sub>2</sub> presentes no ar inspirado, se difundirem até a porção central dos vasos dilatados, o grau de dilatação dos vasos pulmonares determina a gravidade das anormalidades nos gases arteriais (PAROLIN et al., 2002).

O estresse oxidativo (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, com consequências também no pulmão (TIEPPO et al., 2005; VERCELINO et al., 2010).

Atualmente, inúmeros estudos vêm demonstrando as propriedades antioxidantes da Melatonina (MLT) em diferentes modelos experimentais. Dentre seus diversos efeitos

---

1 Aluna do curso de graduação Ciências Biológicas – Bolsista Fapergs – jtdsousa13@gmail.com

2 Doutoranda do PPG em Medicina: Ciências Médicas – UFRGS - Bolsista CAPES - jozy.ma@hotmail.com.

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

atribuídos, podemos salientar sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora, bem como seus efeitos oncostáticos (MACCHI; BRUCE, 2004; ROSA et al, 2010; BONA et al., 2012).

A MLT, 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 (REITER et al., 2000; MOREIRA et al., 2015. ).

Levando-se em consideração estes dados, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação da MLT sobre os marcadores de EO no diafragma e as alterações histológicas hepáticas e pulmonares em ratos submetidos à Ligadura de Ducto Biliar.

## **METODOLOGIA**

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

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

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 MLT iniciou no 14<sup>o</sup> dia após a LDB em todos os grupos. A MLT 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 pulmão foram coletados para a análise histológica e o diafragma para as análises de TBARS (BUEGE; AUST, 1978), SOD (MIRSA; FRIDOVICH, 1972) e CAT (BOVERIS; CHANCE, 1973).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguido do teste *Student-Newman-Keuls* para múltiplas comparações significativo quando  $p < 0,05$ .

O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal conforme estabelecido pela Legislação Brasileira (Lei 11.794/2008). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), da ULBRA (protocolo 2015 – 2P).

## **RESULTADOS**

Na tabela 1, mostra-nos os valores das enzimas de integridade hepáticas onde observamos um aumento significativo no grupo SHP com relação aos grupos controles ( $p < 0,001$ ), e ocorreu uma diminuição significativa destes valores no grupo SHP+MLT.

Analisando a lipoperoxidação diafragmática realizada através da técnica de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) observou-se um maior dano no grupo SHP quando comparado aos grupos controles, e uma diminuição significativa nos animais do grupo SHP+MLT

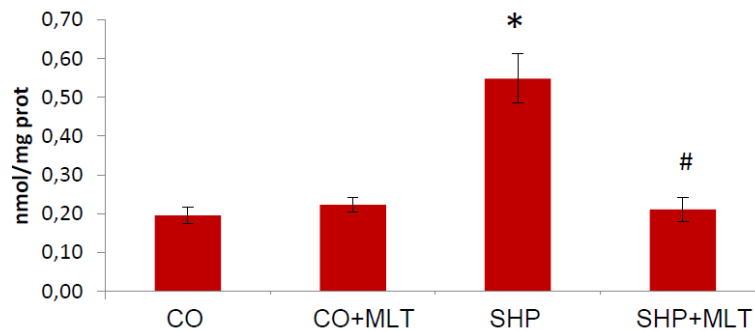
Tabela 1: Valores das enzimas de integridade hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT), e fosfatase alcalina (FA) em plasma, nos diferentes grupos experimentais

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

\* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+MLT (p<0,001). # Diminuição significativa com relação ao grupo SHP (p<0,001).

Figura 1: Avaliação da lipoperoxidação pela técnica de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

### TBARS - DIAFRAGMA

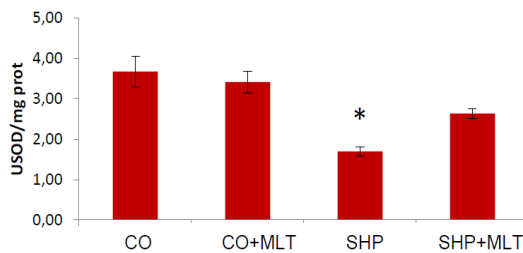


\* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+MLT (p<0,001).  
# Diminuição significativa com relação ao grupo SHP (p<0,001).

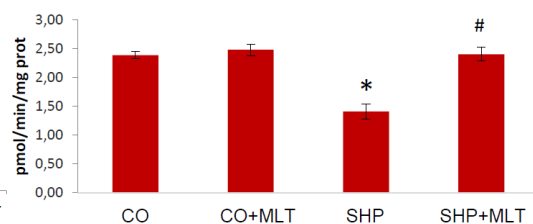
As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram uma menor atividade no grupo SHP quando comparada aos grupos controle (p<0,01). No grupo SHP+MLT observou-se um aumento destas quando comparadas ao grupo SHP.

Figura 2: Atividade da enzima Superóxido Dismutase e Catalase.

### SOD - DIAFRAGMA



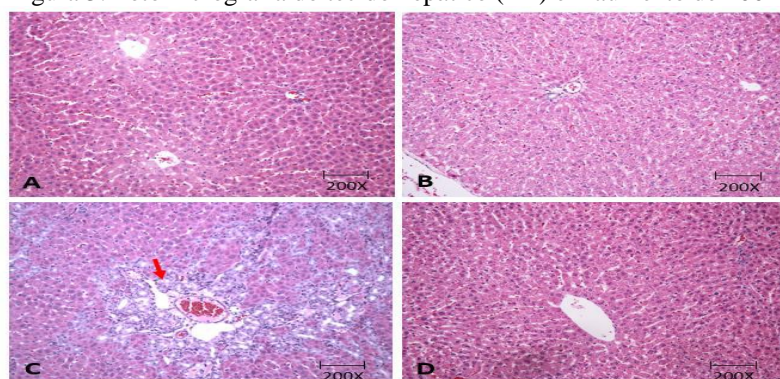
### CAT - DIAFRAGMA



\* Diminuição significativa em relação aos grupos CO e CO+MLT (p<0,001).  
# Aumento significativo com relação ao grupo SHP (p<0,001).

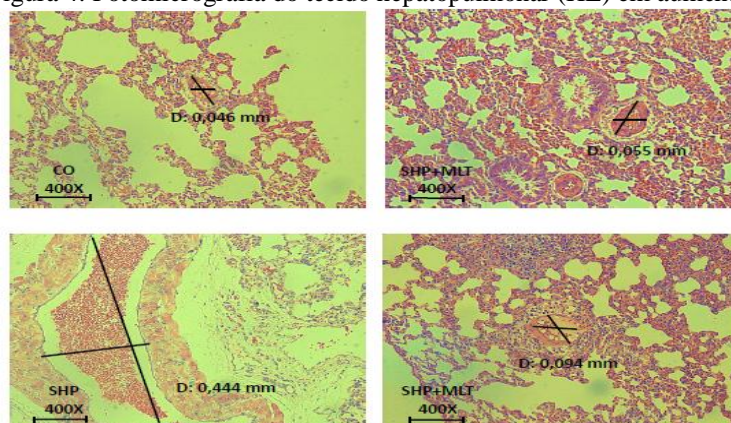
Na análise histológica hepática (figura 3) dos diferentes grupos avaliados, observou-se que os grupos CO e CO+MLT (figura A e B) apresentam uma arquitetura normal do fígado. No grupo SHP (figura C) evidenciou-se uma destruição do parênquima hepático e infiltrado inflamatório, observado pela coloração de HE. O uso da MLT no grupo SHP+MLT (figura D) restaurou o parênquima hepático.

Figura 3: Fotomicrografia do tecido hepático (HE) em aumento de 200X.



Na análise histológica do pulmão nos grupos CO e CO+MLT o diâmetro dos vasos pulmonares (mm) são semelhantes. No grupo SHP ocorreu um aumento significativo no diâmetro dos vasos comparado aos grupos controles, demonstrando a presença de vasodilatação nesse grupo. No grupo SHP + MLT ocorreu uma redução do diâmetro dos vasos permanecendo semelhante aos controles, como observado nas figuras 4.

Figura 4: Fotomicrografia do tecido hepatopulmonar (HE) em aumento de 400X.



O modelo de LDB apresentou características de cirrose a julgar pela prova de integridade hepática e do parênquima, e a melatonina foi capaz de atuar sobre os radicais livres atuando como antioxidante.

## CONCLUSÃO

A LDB mimetiza a cirrose biliar secundária em humanos, sendo um modelo eficaz para o estudo de alterações pulmonares decorrentes da mesma. A MLT parece ser um antioxidante eficaz neste modelo experimental uma vez que normaliza as provas de integridade hepática, diminui o estresse oxidativo no diafragma e restaura o parênquima pulmonar avaliado pelo diâmetro dos vasos pulmonares.

## AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: ULBRA/FAPERGS;CNPq;CAPES.

## 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, n.707, p.16, 1973.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Met Enz*. v.52, n.302, p.10, 1978.
- FREIRE, R. et al. Síndrome hepatopulmonar em doentes com cirrose hepática: importância da sua pesquisa sistemática e impacto no prognóstico. **J Port Gastrenterol**. v.14, n.4, p.176-183, 2007.
- 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 d'levement 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.
- MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of Melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v.25, 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, n5, 3170, 1972.
- MOREIRA, A.J. Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. **Plos One**. 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.
- PAROLIN, M.B. et al. Prevalência da síndrome hepatopulmonar em candidatos a transplante hepático. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.39, n.1, p.10-16, 2002.
- 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.