



## A MELATONINA PROTEGE O FÍGADO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSE HEPÁTICA.

Mariana do C. Soares<sup>1</sup>

Silvia Bona<sup>4,5</sup>

Graziela Rodrigues<sup>4</sup>

Andrea J. Moreira<sup>2,4</sup>

Thêmis R. Da S.<sup>4</sup>

Cláudio A. Marroni<sup>3,4</sup>

Norma P. Marroni<sup>2,4,6</sup>

### RESUMO

As doenças hepáticas são um importante problema de saúde pública, sendo responsáveis por um número significativo de internações hospitalares e uma crescente taxa de mortalidade. A melatonina (MLT), poderosa molécula antioxidante, tem se mostrado benéfica em várias condições, incluindo doenças hepáticas. **Objetivo:** Avaliar o efeito da MLT na cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos. **Métodos:** Foram utilizados 20 ratos Wistar machos (230-250 g) divididos em 4 grupos: I: Controle (CO); II: CO+MLT; III: CCl<sub>4</sub>; e IV: CCl<sub>4</sub>+MLT. Foram administradas 27 doses i.p. de CCl<sub>4</sub>: 10 doses com intervalo de 5 dias cada, 10 doses com intervalo de 4 dias, e 7 doses com intervalo de 3 dias. MLT foi administrada via i.p (20 mg/kg) a partir da 10<sup>a</sup> semana, diariamente até o final do experimento (16<sup>a</sup> semana). **Resultados:** No grupo CCl<sub>4</sub>+MLT, o uso da MLT diminuiu no fígado os níveis de F2-isoprostanos comparado ao grupo CCl<sub>4</sub>. A análise histológica do fígado com coloração HE mostrou que os animais do grupo CCl<sub>4</sub> tiveram alterações histológicas, como presença de infiltrado inflamatório. No grupo CCl<sub>4</sub>+MLT, a presença de infiltrado inflamatório foi menor comparado ao grupo CCl<sub>4</sub>. Os

animais do grupo CCl<sub>4</sub>, também aumentaram significativamente a expressão do NF-κB/p65 e da iNOS comparado aos grupos controle. O uso de MLT diminuiu significativamente a expressão destas proteínas do grupo CCl<sub>4</sub>+MLT, comparado ao grupo CCl<sub>4</sub>. CCl<sub>4</sub> aumentou significativamente a expressão de TGF-β1 e α-SMA. Em contraste, o grupo que recebeu MLT, reduziu significativamente a expressão destas proteínas comparando ao grupo CCl<sub>4</sub>, sugerindo, um efeito inibitório na ativação de células estreladas hepáticas e na deposição de MEC pela MLT. No grupo CCl<sub>4</sub>+MLT, a coloração por picrossírius, mostrou redução significativa da fibrose, com septos e nódulos fibróticos incompletos. A fibrose hepática muda a arquitetura vascular, criando um ambiente hipóxico. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que a MLT possui potente efeito antifibrogênico, modulando parâmetros de estresse oxidativo, angiogênese e inflamação.

Palavras-chave: Dano Oxidativo. Antioxidantes. Cirrose Hepática.

---

<sup>1</sup> Aluna do curso de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Bolsista PROBIC/FAPERGS HCPA – mari.soares@brturbo.com.br

<sup>2</sup> PPG Fisiologia – UFRGS

<sup>3</sup> Professor –Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – (UFCSPA)

<sup>4</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre – (HCPA)

<sup>5</sup> Técnica de Laboratório - Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)

<sup>6</sup> Professora Orientadora do PPGBioSaúde – ULBRA; Professora aposentada - UFRGS – nmarroni@terra.com.br

## INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo, comprometendo não só o bem-estar social do indivíduo como também a economia do país. Neste contexto, a cirrose hepática representa a manifestação patológica mais comum e figura entre as maiores causas de morte (BONA, 2014). Em virtude do grande problema mundial que a cirrose representa, muitas pesquisas acerca desta doença são realizadas em todo mundo, objetivando testar substâncias e técnicas que possam converter-se em tratamento ou, ao menos, aumentar a sobrevivência de pacientes cirróticos até o momento do transplante, evitando a progressão da doença.

O fígado, por ser o principal órgão responsável pelo metabolismo de medicamentos e produtos químicos é, portanto, também o principal órgão-alvo para a maioria destes compostos tóxicos (LEE et. al., 2013; RASHID et. al., 2013).

O modelo experimental de cirrose hepática pela administração de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento deste processo patológico e para pesquisas alternativas do seu tratamento. Nesse modelo, a fibrose hepática e os nódulos regenerativos são proeminentes e o padrão histológico é semelhante ao da cirrose em humanos (PEREZ, 1983; DA ROSA et. al., 2010). No fígado, o mecanismo de ação do CCl<sub>4</sub> dá-se através da produção de radicais livres que exercem efeitos tóxicos sobre as células hepáticas, promovendo o processo inflamatório, a esteatose, a fibrose, a cirrose e finalmente, a morte celular (necrose centrolobular), além de causar alterações no mecanismo de defesa antioxidante e consequente alteração na homeostase redox celular ( RASHID et. al., 2013; BASU, 2003).

O aumento das EROs / ERNs e a teoria da ativa participação do estresse oxidativo na progressão da doença hepática crônica fortalecem as evidências da importância do equilíbrio redox celular, que pode ser alcançado através de uma eficiente barreira antioxidante celular (SHANCHES-VALE et. al.,2012;). O uso de antioxidantes tem sido proposto como agentes terapêuticos, bem como de medicamentos coadjuvantes, para compensar os danos ao fígado (PEREIRA-FILHO et. al., 2008; DA ROSA et. al., 2010; , VITAGLIONE et. al., 2004; MOREIRA et. al.,2004).

A n-acetil-5-metoxitriptamina que é o nome científico da melatonina (MLT), é um neurohormônio de natureza indólica, derivada do triptofano. Foi considerada, por muito tempo, uma substância produzida apenas pela glândula pineal como hormônio, porém recentemente foi detectada em muitos outros tecidos (FEVRE-MONTANGE, 1985; BRZOZOWSKI, 2014).

A MLT é o primeiro composto biologicamente ativo sintetizado pela glândula pineal. Sua produção ocorre ao longo de certos períodos do dia, inibida pela luz

e estimulada na fase escura, é descrita como de secreção rítmica, exercendo efeitos cronobiológicos e atuando como relógio biológico mestre em mamíferos (PALOMO, 2013).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com peso médio de 250 gramas, provenientes do Biotério da Unidade de experimentação animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais foram mantidos no biotério durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C.

Os animais tiveram alimentação controlada, 16g de ração ao dia para cada animal. A restrição alimentar associada à toxicidade do CCL<sub>4</sub> é descrita como um fator importante para o estabelecimento da cirrose hepática em modelos experimentais (CREMONESE et al., 2001). A água, foi acrescida de fenobarbital (0,3 g/L) e fornecida em mamadeira de vidro com bico de inox e rolha de borracha, sendo essa *ad libitum*.

Foi utilizado um modelo experimental de cirrose, o qual se dá através da administração de tetracloreto de carbono via intraperitoneal (i.p.).

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, com n=5:

Grupo Controle - 0,5 ml de óleo mineral (i.p.);

Grupo Controle + melatonina - 0,5 ml de óleo mineral (i.p.) + e melatonina (20mg/kg/dia, i.p.) a partir da 10<sup>a</sup> semana do experimento;

Grupo CCl<sub>4</sub>; estes animais receberam 0,5 ml de CCl<sub>4</sub> dissolvido em óleo mineral na proporção de 1:6 (i.p.);

Grupo CCl<sub>4</sub> + melatonina: 0,5 ml de CCl<sub>4</sub> dissolvido em óleo mineral na proporção de 1:6, (i.p.) e melatonina (20mg/kg/dia, i.p.) a partir da 10<sup>a</sup> semana do experimento.

O grupo cirrótico (CCl<sub>4</sub>) e o grupo cirrótico + melatonina receberam vinte e sete doses de injeções de CCl<sub>4</sub> + óleo mineral, sendo as dez primeiras doses de cinco em cinco dias, as dez doses seguintes de quatro em quatro dias e as sete últimas doses de três em três dias (PAVANATO, 2003).

10 primeiras doses de CCl<sub>4</sub> de 5 em 5 dias (50 dias)

10 segundas doses de CCl<sub>4</sub> de 4 em 4 dias (40 dias)

7 terceiras doses de CCl<sub>4</sub> de 3 em 3 dias (21 dias)

Após os animais foram mortos por exsanguinação sob anestesia profunda, e o fígado foi coletado para posteriores análises.

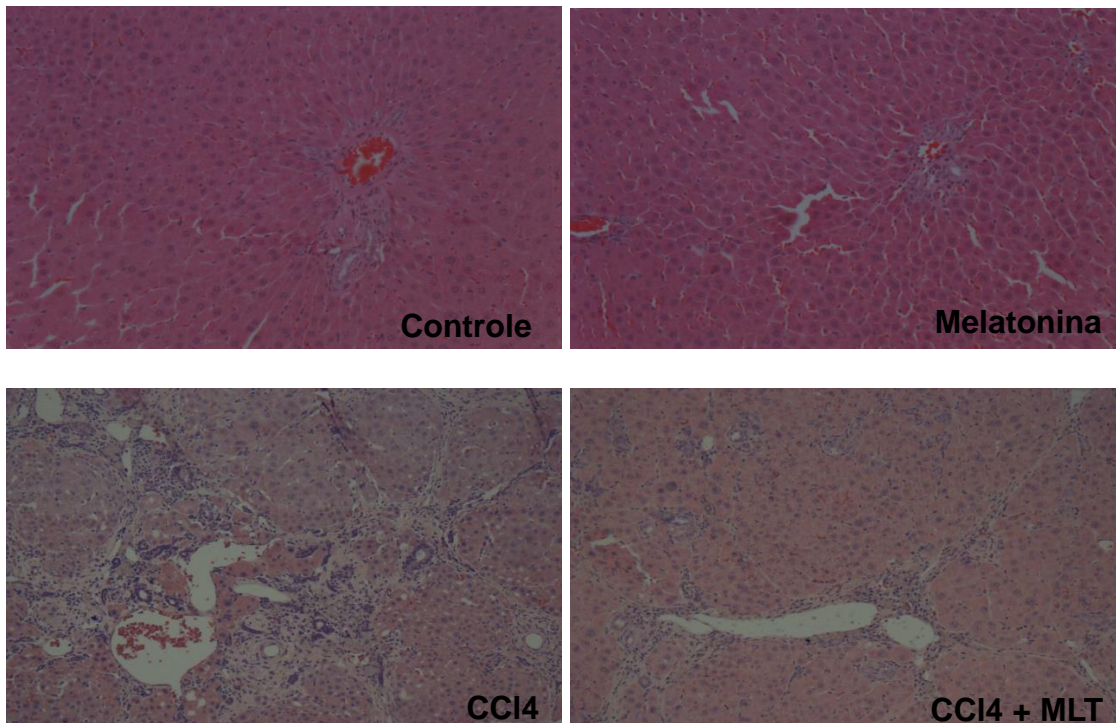
- 1) Análise Histológica, através das colorações de hematoxilina e eosina e picrossirius;
- 2) Avaliar o estresse oxidativo através da medida da LPO, realizada através da medida da concentração de F2-isoprostanos (Kit de ELISA) e das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD).
- 3) Expressão de proteínas através da técnica de Western blot. Foram avaliadas proteínas relacionadas com o processo inflamatório porção p65 do fator nuclear-kappaB (NF-kB) e através da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS); e proteínas relacionadas ao processo fibrogênico fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) e da alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).

A análise estatística foi ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls, sendo considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Análise Histológica**

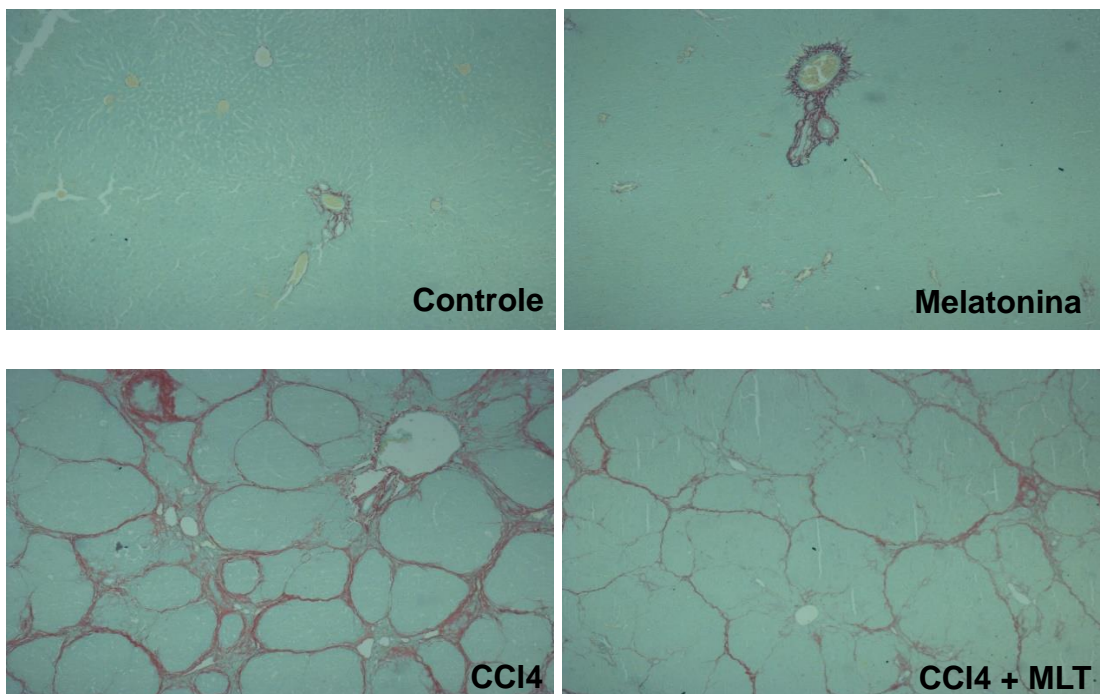
Na análise histológica através da coloração por Hematoxilina e Eosina, nos animais controles observamos uma arquitetura hepática normal, onde podemos identificar os cordões de hepatócitos bem definidos. No grupo que recebeu o CCl<sub>4</sub>, observamos uma desestruturação na arquitetura hepática normal, com presença de necrose e infiltrado inflamatório, evidenciado assim o dano causado pela administração da droga. No grupo que recebeu o tratamento com a Melatonina, podemos observar uma reestruturação do parênquima hepático, com uma diminuição da necrose, bem como no infiltrado inflamatório, sugerindo assim uma proteção da melatonina no fígado destes animais.



Hematoxilina e Eosina. Aumento de 20x

Na coloração por picrossírius, no grupo controle e melatonina, podemos observar uma arquitetura hepática normal. No grupo que recebeu o CCl<sub>4</sub>, podemos observar um aumento na deposição de colágeno, bem como a presença de nódulos bem definidos, evidenciando o dano tecidual causado pela droga administrada. No grupo CCl<sub>4</sub> que recebeu o tratamento com a melatonina, podemos observar uma diminuição dos nódulos antes presentes,

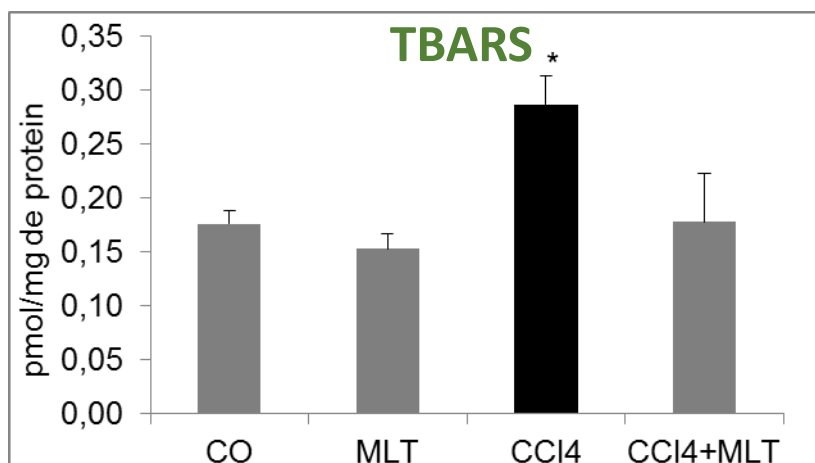
bem como uma diminuição na deposição de colágeno, sugerindo um possível reparo ocasionado pela melatonina administrada.



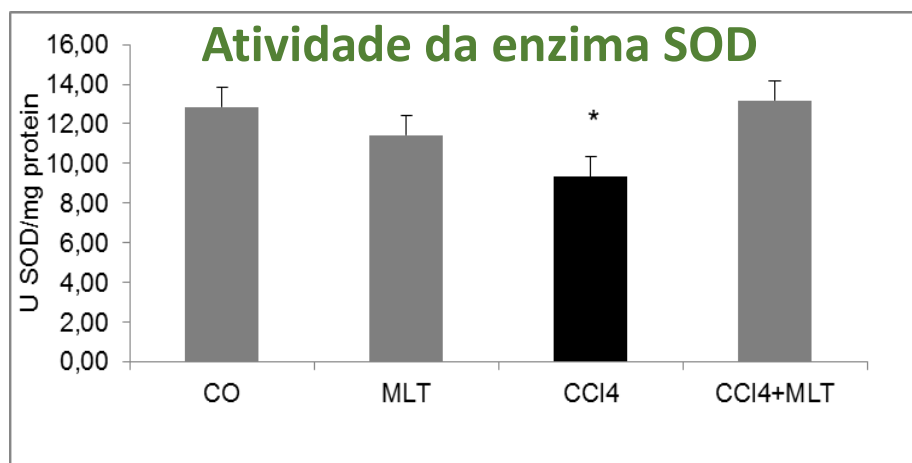
Coloração por picrossírius. Aumento de 10x.

## Lipoperoxidação

No gráfico abaixo, foi realizada a técnica de substâncias que reagem ao Ácido tiobarbitúico (TBARS) para a verificação da lipoperoxidação no tecido hepático. Podemos observar que no grupo CCl<sub>4</sub> há um aumento significativo quando comparado aos demais grupos. Já no grupo CCl<sub>4</sub>+MLT, observa-se uma diminuição significativa em comparação ao grupo CCl<sub>4</sub>.



## Superóxido Dismutase

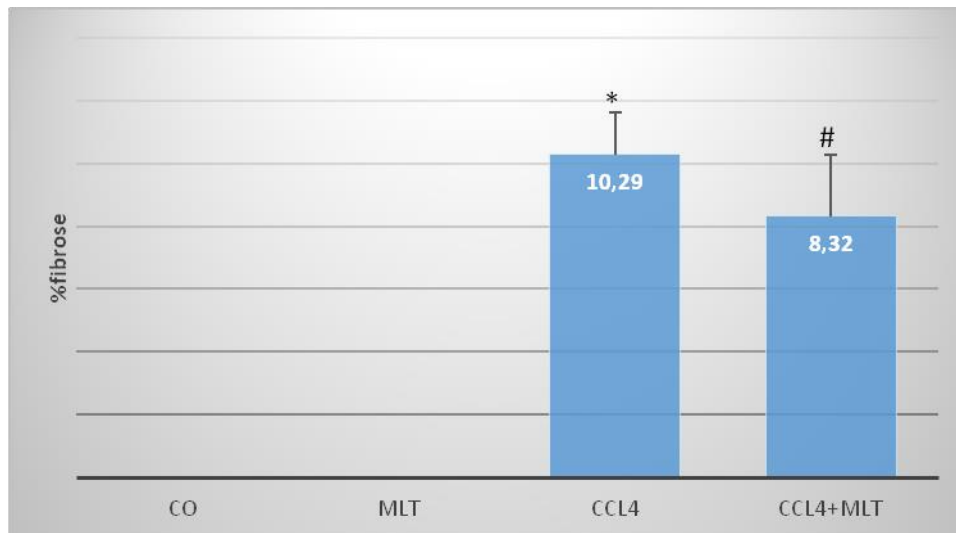


Avaliamos a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no tecido hepático. No grupo CCl<sub>4</sub> podemos observar uma diminuição significativa



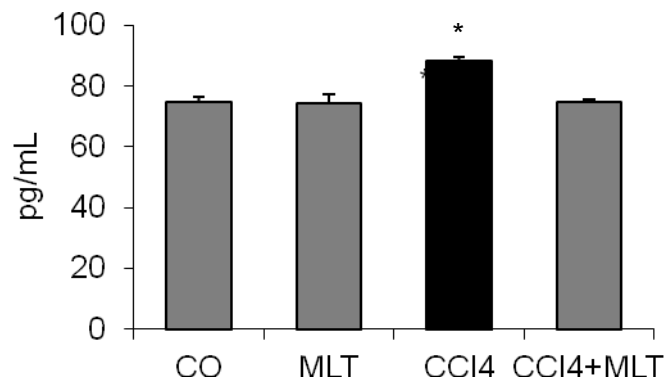
quando comparada aos demais grupos. Já no grupo CCl<sub>4</sub>+MLT observamos uma diminuição significativa quando comparada ao grupo CCl<sub>4</sub>.

### Percentual de fibrose - picrossirius



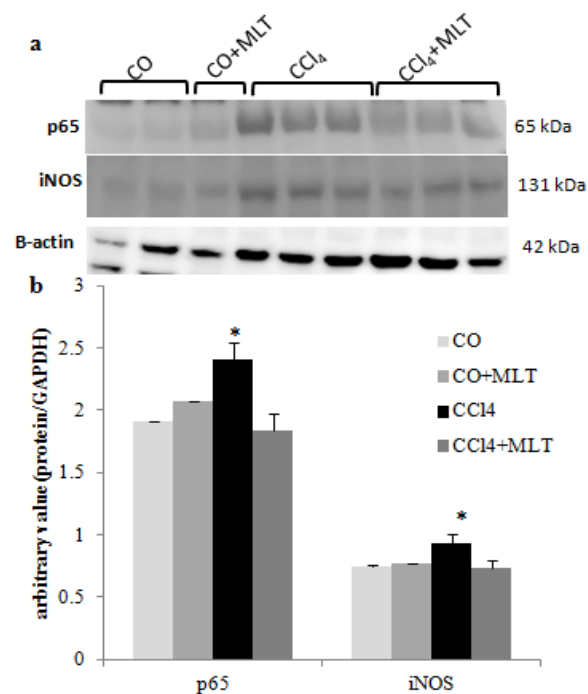
As imagens histológicas coradas com picrossirius, foram submetidas a contagem de pixels para avaliar a porcentagem de fibrose. No grupo CCl<sub>4</sub> houve um percentual de 10,29%, sendo significativamente maior quando comparado aos demais grupos. No grupo CCl<sub>4</sub>+MLT houve um percentual de 8,32%, sendo significativamente menor quando comparado ao grupo CCl<sub>4</sub>, demonstrando uma melhora no quadro de fibrose quando é administrada a melatonina.

## F2-isoprostanos



Utilizou-se a avaliação de F2-isoprostanos para avaliar a lipoperoxidação no tecido hepático, complementando a técnica de TBARS. No gráfico acima, podemos observar que houve um aumento de isoprostanos no grupo que recebeu apenas o CCl<sub>4</sub> quando comparados aos demais grupos, demonstrando o efeito tóxico da droga administrada.

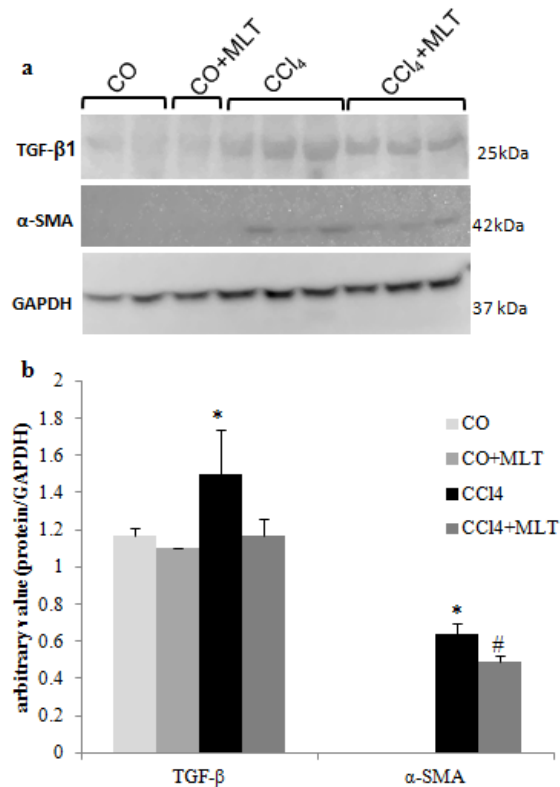
## Expressão e quantificação p65 e iNOS



Na expressão e quantificação da iNOS e do fator de transcrição p65, podemos observar um aumento de ambos no grupo CCl<sub>4</sub>, quando comparado aos

demais grupos. No grupo CCl<sub>4</sub>+MLT observamos uma diminuição da iNOS e do fator de transcrição p65 significativa quando comparados ao grupo CCl<sub>4</sub>.

### Expressão e quantificação do TGF- $\beta$ e $\alpha$ -SMA



Na expressão e quantificação do TGF- $\beta$  e  $\alpha$ -SMA podemos observar um aumento significativo no grupo CCl<sub>4</sub> quando comparado aos demais grupos. Na expressão e quantificação da  $\alpha$ -SMA podemos observar uma diminuição significativa no grupo CCl<sub>4</sub>+MLT quando comparado ao grupo CCl<sub>4</sub>.

### CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que ao administrar a melatonina ela foi capaz de modular os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, evidenciando assim um potente efeito antifibrótico e sugerindo uma possível utilização na profilaxia de pacientes com cirrose hepática.

## AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: FINANCIAL SUPPORT: CNPq, FIPE-HCPA, CAPES, FAPERGS.

CEP/HCPA: 10-0316

## REFERÊNCIAS

BONA S, MOREIRA A J, RODRIGUES G, DA SILVEIRA TR, CERSKI CT, MARRONI Cláudio Augusto , MARRONI Norma Possa. **Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study.** Protoplasma. 2014 Nov 5. [Epub ahead of print].

BRZOZOWSKI T, JAWOREK J. Editorial: basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. **New advancements and future perspectives.** Curr Pharm Des. 2014;20(30):4785-7.

DA ROSA D. P, BONA S, SIMONETTO D, ZETTIER Z, MARRONI C.A., MARRONI N.P., **Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats** Arquivos de Gastroenterologia. 2010;47.

FEVRE-MONTANGE M. [**Melatonin**]. Presse Med. 1985;14(31):1659-63.

LEE IC, KIM SH, BAEK HS, MOON C, KIM YB, YUN WK, et al. **Protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity through activation of Nrf2.** Environ Toxicol. 2013.

MOREIRA AJ, FRAGA C, ALONSO M, COLLADO PS, ZETTLER C, MARRONI C, et al. **Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats.** Biochemical pharmacology. 2004;68(10):1939-46.

PALOMO AG. **Análisis in vitro del efecto oncostático de la melatonina en hepatocitos tumorales de la línea HepG2** Espanha: Universidad de León; 2013.

PAVANATO, A., et al., **Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis.** Dig Dis Sci, 2003. 48(4): p. 824-9.

PEREIRA-FILHO G, FERREIRA C, SCHWENGBER A, MARRONI C, ZETTLER C, MARRONI N. **Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats.** Arquivos de gastroenterologia. 2008;45(2):156-62.

PEREZ T. R. **Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 and adequate model of human cirrhosis?** Hepatology (Baltimore, Md. 1983;3(1):112-20.

RASHID K, SINHA K, SIL PC. **An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology.** Food Chem Toxicol. 2013;62:584-600.

SÁNCHEZ-VALLE V, CHÁVEZ-TAPIA NC, URIBE M, MÉNDEZ-SÁNCHEZ N. **Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review.** Curr Med Chem. 2012;19(28):4850-60.

VITAGLIONE P, MORISCO F, CAPORASO N, FOGLIANO V. **Dietary antioxidant compounds and liver health.** Critical reviews in food science and nutrition. 2004;44(7-8):575-86.