

# **Papel da melatonina no estresse oxidativo do fígado e sangue de ratos cirróticos**

DARLAN PASE DA ROSA<sup>1</sup>

SILVIA BONA<sup>2</sup>

NORMA ANAIR POSSA MARRONI<sup>3</sup>

## **RESUMO**

*A cirrose é uma hepatopatia crônica e progressiva que constitui um estágio irreversível de disfunção hepática. Este trabalho teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo no fígado e sangue de ratos cirróticos e tratados com antioxidante Melatonina (MEL). A cirrose foi induzida através da inalação de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos machos Wistar. Observou-se redução nas provas de integridade hepática nos animais tratados com MEL, aumento da lipoperoxidação nos ratos cirróticos, e redução das mesmas medidas nos animais tratados com MEL, em fígado e eritrócitos, diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx nos cirróticos e aumento da SOD nos animais tratados com MEL, aumento dos metabólitos do óxido nítrico e da deposição de colágeno nos fígados dos cirróticos e uma diminuição do colágeno nos ratos que receberam MEL. Podemos concluir que a Melatonina pode ser considerada hepatoprotetora e sugerimos que a análise do estresse oxidativo sistêmico pode ser um indicador de dano oxidativo.*

**Palavras-chaves :** Estresse oxidativo, cirrose hepática, eritrócitos, tetracloreto de carbono e melatonina.

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA - Bolsista FAPERGS

<sup>2</sup> Aluna Pós-Graduação em Ciências Médicas/UFRGS

<sup>3</sup> Orientadora - Professora do Curso de Biologia/ULBRA e PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA e Genética e Toxicologia/ULBRA (nmarroni@terra.com.br)

## ABSTRACT

*Cirrhosis is a progressive chronic hepatopathy which constitutes an irreversible stage of liver dysfunction. This work was designed to evaluate the oxidative stress in the blood of cirrhotic rats treated with the antioxidant melatonin (MEL). Cirrhosis was induced through inhalation of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). A significant impairment in the Liver Integrity of MEL-treated animals as compared to cirrhotic animals was observed. In rat erythrocytes and liver, lipoperoxidation was significantly increased in the cirrhotic rats as compared to controls and significantly decreased in MEL-treated animals as compared to cirrhotic ones. In blood, a decrease in SOD and GPx enzymes was detected in the cirrhotic group as compared to the control group, with increased SOD activity when MEL was administered. As for hepatic collagen, we found a significant increase in the CCl<sub>4</sub> group as compared to the controls and a regression of these values in the treated group. In histology, the rats in the CCl<sub>4</sub> group showed fibrosis and formation of fibrotic nodules, characterizing liver cirrhosis; there was reduction of nodules and fibrosis in the MEL treated group. The data allow us to suggest that the observed oxidative stress is related to the damages caused by CCl<sub>4</sub> and that the use of MEL can minimize these damages.*

**Key words:** Oxidative stress, liver cirrhosis, erythrocytes, carbon tetrachloride, melatonin.

## INTRODUÇÃO

O fígado tem uma função importante no metabolismo, incluindo a síntese e o armazenamento do glicogênio, gliconeogênese e o metabolismo de lipídios e proteínas. O fígado é também responsável pela produção de bile, da síntese de proteínas do plasma, e de detoxicação de drogas. Certamente o fígado tem interações importantes com cada sistema do organismo (HUFFMYER E NEMERGUT, 2007).

A cirrose hepática é uma doença crônica que, em sua história natural, determina inúmeras complicações com elevada morbidade e mortalidade, sendo portanto, um problema de saúde mundial. Como doença crônica progressiva, apresenta um estágio inicial de disfunção hepática, lenta e irreversível, e caracteriza-se pela formação de nódulos hepáticos em consequência da fibrose. Tais alterações estruturais constituem-se nas principais respostas do tecido hepático às inúmeras agressões de natureza inflamatória, viral, tóxica, metabólica ou congestiva (BERTELLI e CONCI, 1997).

Os três maiores mecanismos envolvidos na geração de cirrose são: morte celular, grande deposição de matriz extracelular no fígado (fibrose), e reorganização celular. O acúmulo de matriz extracelular é observada na fibrose e cirrose devido à ativação de fibroblastos, adquirindo a forma de miofibroblastos. Essas células estão ausentes em fígado normal. Elas são produzidas pela ativação de precursores celulares, como as células estreladas hepáticas (LOTERSZTAJN et al., 2005; GUYOT et al., 2006).

O Tetracloroeto de Carbono (CCl<sub>4</sub>) é um conhecido hepatotóxina muito usado na indução de lesão hepática tóxica em animais de laboratório (BUTLER, 1961; LEE et al., 2007; PAVANATO et al., 2007; PEREIRA-FILHO et al., 2008). Sua hepatotoxicidade acredita-se ser oriundo de duas fases. A fase inicial que envolve o metabolismo do CCl<sub>4</sub> pelo Citocromo P-450 à radical triclorometil (-CCl<sub>3</sub>•), parte do radical triclorometil gera o radical triclorometil-peroxil (OCCl<sub>3</sub>•), que conduz a peroxidação lipídica (BUTLER, 1961; POYER et

al., 1980; EDWARDS et al., 1993; PAVANATO et al., 2007). A segunda fase envolve a ativação das células de Kupfer, que é acompanhada pela produção de mediadores pró-inflamatórios (NAKAHIRA et al., 2003). O modelo experimental de indução de cirrose por  $\text{CCl}_4$  inalatório é o modelo clássico que mimetiza as alterações encontradas em pacientes cirróticos (JIMENEZ e CLARIÁ, 1992; CREMONESE et al., 2001; PEREIRA-FILHO et al., 2008).

Na cirrose, têm sido descritas alterações nos mecanismos oxidantes/antioxidantes, que se encontram em desequilíbrio e contribuem em grande parte para a necrose hepática (CREMONESE et al., 2001; PEREIRA-FILHO et al., 2008; VIERA, 2008). Recentemente, o estresse oxidativo tem sido sugerido como uma das principais causas de lesão tecidual em diversas doenças (CESARATTO et al., 2004; PADHY et al., 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é considerado o principal mecanismo patogênico no dano hepático alcoólico (HAGYMASI et al., 2001). Diversos ERO são formadas no hepatócito, através da ativação das células de Kupffer e células inflamatórias (MCCLAIN et al., 1999).

A cirrose é associada a alterações na circulação sistêmica. As hemácias são expostas ao estresse oxidativo durante suas funções aeróbicas normais. Em pessoas saudáveis, esse estresse é equilibrado por um poderoso sistema antioxidante enzimático e não enzimático, o que não acontece com pacientes cirróticos, em cujas hemácias há um aumento do estresse oxidativo (GEETHA et al., 2007).

Níveis de antioxidantes no plasma ou eritrócitos são parâmetros atrativos e de fácil acesso para obtenção de informação sobre reparo de dano hepático oxidativo (ROCCHI et al., 1991; LEO

et al., 1993; LECOMTE et al., 1994; HAGYMASI et al., 2001).

O uso de antioxidante pode auxiliar a minimizar o estresse oxidativo, contribuindo com a intervenção terapêutica de fígados cirróticos (MURIEL et al., 1994; PERES et al., 2000; PAVANATO et al., 2003; PAVANATO et al., 2007; TIEPPO et al., 2007; VIERA, 2008). Entre os vários antioxidantes, a MEL (N-acetil-metoxitriptamina), uma indolamina derivada do triptofano é citada por diversos autores como “varredor” de radicais livres de oxigênio (REITER et al., 1997; MUNOZ-CASTANEDA et al., 2008).

A MEL é produzida pela glândula pineal, como um hormônio, mas atualmente foi detectada em outros tecidos. Sabe-se que esse hormônio, além da sua ação contra os radicais livres, também regula o ritmo circadiano, a atividade do sistema imune e do sono (KUCUKAKIN et al., 2008). Após a sua administração, ela passa livremente através das membranas e distribui-se pelos compartimentos de todo o corpo. A MEL em muitos estudos tem se mostrado mais eficaz do que alguns antioxidantes “clássicos” (exemplo: vitamina E e C) na proteção contra estresse oxidativo/nitrosativo (PIERI et al., 1994; TAN et al., 1998; GITTO et al., 2001; BAYDAS et al., 2002; MARTINEZ-CRUZ et al., 2002).

Com isso, realizamos a indução de cirrose hepática através do modelo experimental induzida pelo  $\text{CCl}_4$  inalatório para avaliar o fígado através das enzimas séricas, colágeno e histologia e os eritrócitos, para procurar relacionar esses danos do tecido hepático com a expressão de danos oxidativos séricos.

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito do tratamento com antioxidante Melato-

nina em ratos cirróticos através de marcadores de estresse oxidativo no fígado e no sangue.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Os procedimentos experimentais observaram as normas estabelecidas pela “Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais”, de acordo com a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GOLDIN, 1997).

Foram utilizados quinze ratos Wistar machos, pesando em média de 250g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante o experimento, em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas) e temperatura de  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . Os ratos recebiam 16g por animal/dia de ração (Purina-Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e a água era administrada “*ad libidum*”.

### Grupos e tratamentos

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: **I**-Controle; **II**-Cirrótico; **III**-Cirrótico + MEL. O grupo Controle + MEL não foi realizado porque em trabalhos anteriores, constatamos não haver diferença significativa com os ratos controles.

A MEL (Sigma®) foi injetada intraperitonealmente na dose de 20mg/Kg de peso do animal,

diluída em 1mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e etanol a 8%. Ela foi administrada diariamente a partir da 10<sup>o</sup> semana de inalação de  $\text{CCl}_4$ , momento em que histologicamente temos fibrose e dano hepático nesses animais, não sendo interrompido a inalação, até a 16<sup>o</sup> semana.

### Indução da cirrose

Para diminuir o tempo de desenvolvimento de cirrose, foi administrado Fenobarbital na água de beber, para todos os ratos, como um indutor enzimático, para aumentar a metabolização do  $\text{CCl}_4$  à seus metabolitos ativos como o triclorometil. Iniciou-se a administração uma semana antes da primeira inalação e perpetuou-se até o fim do experimento, na concentração de 0,3g/L. O grupo cirrótico foi exposto ao  $\text{CCl}_4$  duas vezes por semana (segundas-feiras e sextas-feiras) em uma câmara de inalação padrão de 65x26x21cm. O  $\text{CCl}_4$  era colocado em um recipiente de vidro (umidificador), ligado a um compressor de ar com vazão de 1L/min, durante todo o experimento, de acordo com Jimenez e Clariá (1992).

Nas três primeiras sessões, o tempo de exposição ao gás foi de meio minuto, permanecendo os ratos no interior da câmara por mais meio minuto, com o compressor desligado. Nas próximas três sessões, o tempo de gaseamento aumentava para um minuto, seguido de outro um minuto com compressor desligado. Posteriormente, a exposição ao gás e o subsequente período de permanência na câmara aumentavam de meio minuto a cada três sessões, alcançando-se o tempo máximo de cinco minutos de gaseamento com  $\text{CCl}_4$  e cinco minutos com o compressor desligado. Este procedimento de induzir cirrose tem um tempo total de dezesseis semanas (JIMENEZ e CLARIÁ, 1992; CREMONESE et al., 2001; PEREIRA-FILHO et al., 2008)..

## **Análises Bioquímicas**

Na décima sexta semana foi feita a morte dos animais, primeiro anestesiava-se com cloridato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilasina (50mg/kg) ip. Com o auxílio de um capilar heparinizado o sangue era coletado através do plexo retro-obital (HALPERN e PACAUD, 1951), a qual era dividida em três frações: para a realização das provas de integridade hepática (PIH), para a análise da medidas que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e para as análises das enzimas antioxidantes. A seguir realizava-se a tricotomia seguida de uma laparotomia média, e retirava-se o fígado desses animais. Esse fígado foi dividido em duas partes: para a realização dos blocos de parafina e posteriormente a montagem das laminais histológicas e outra parte foi congelada -80°C para as posteriores análises.

### **Homogeneizado**

Os fígados foram cortados com tesoura e pesados, adicionou-se 9mL de tampão fosfato (KCL 140mM, fosfato 20mM e pH 7,4) por grama de tecido e homogeneizou-se em Ultra Turrax (IKA-WERK) por quarenta segundos a temperatura de 4°C. A seguir foi centrifugado em centrífuga refrigerada por dez minutos a quatro mil rpm (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuged). O sobrenadante foi pipetado em “eppendorfs” e o precipitado foi desprezado. As amostras foram acondicionadas novamente à temperatura de -80°C para posteriores análises.

### **Proteína**

Foi utilizado o método de solução de albumina bovina (SIGMA) na concentração de 1mg/mL, de acordo com Lowry et al.(1951). As amostras eram medidas

espectrofotometricamente a 625nm, sendo expressos valores em mg/mL, utilizado para calcular TBARS no fígado e valores das enzimas antioxidantes.

### **Lipoperoxidação no fígado**

A quantidade de produtos de aldeídos gerados pela peroxidação lipídica é quantificada pela reação do ácido tiobarbitúrico usando 3mg de proteínas por amostra. Resultado referente a TBARS. As amostras foram incubadas a 90°C por trinta minutos, após foi adicionado 500µL de ácido tiobarbitúrico 0,37% no ácido tricloroacético 15% e centrifugado a 4°C por 2000 x g por quinze minutos. Sendo determinada a absorvancia, espectrofotometricamente a 535nm (BUEGE e AUST, 1978).

### **Lipoperoxidação nos eritrócitos**

O sangue foi coletado com heparina e centrifugado a três mil rpm por cinco minutos a 4°C. Foi descartado o plasma e, os eritrócitos foram lavados três vezes com igual volume de solução salina (NaCl 0,9%), sendo descartado o sobrenadante a cada lavagem e reservado os glóbulos. Pipetou-se 10µL dos glóbulos lavados para a dosagem da hemoglobina através da técnica de Drabkin e Austin (1932). Pipetou-se outros 100 µL dos glóbulos lavados para a determinação de produtos gerados pela peroxidação lipídica através da técnica de TBARS, que foi medida espectrofotometricamente a 535nm, de acordo com Yagi (1984).

### **Análises das enzimas antioxidantes**

Para armazenagem da amostra para as análise das enzimas antioxidantes, 150 µL dos glóbulos

lavados foram diluídos em 1,5mL de ácido acético 1mM e MgSO<sub>4</sub> 4mM e posteriormente congelados em freezer -80°C.

Para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, essas misturas foram descongeladas e centrifugadas a 1200 rpm durante trinta segundos, e foi utilizado o sobrenadante.

A análise das atividades das superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos é baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina, sendo de acordo com Misra e Fridovich (1972). A análise da atividade da enzima Catalase (CAT) em eritrócitos é baseada em medir a diminuição de peróxido de hidrogênio, de acordo com Aebi (1984). E a atividade da enzima Glutathione peroxidase (GPx) é baseada no consumo de NADPH na reação de redução da Glutathione oxidada e reduzida, de acordo com Flohé e Guntzler (1984).

A medida do Óxido nítrico, no fígado, foi realizada através das medidas de nitritos e nitratos, consistindo na transformação de nitratos e nitritos por meio da nitrato redutase e lido posteriormente a 550nm (GRANGER, 1999). A concentração de colágeno foi determinada através da medida da hidroxiprolina contida na digestão ácida do fígado, que foi lida espectrofotometricamente em 560nm e os resultados expressos em µg/mg de proteína (ROJKIND, 1974).

Para avaliar o material histológico, uma parte do fígado foi deixado em formol 10% durante vinte e quatro horas e após foi feito bloco de parafina com esse material, que após, com auxílio de micrometro, foi cortado em fatias de 6µm. A técnica de picrossirius consiste de uma coloração que destaca a presença de colágeno na amostra.

Os resultados são expressos em valor da média ± erro padrão. Foi utilizado ANOVA para análise

de variância e o teste de Studen-Newmann-Keuls para comparação entre grupos, sendo adotado o percentual de significância de 5% (p<0,05).

## RESULTADOS

### Análises Bioquímicas

As análises das enzimas hepáticas transferases (AST e ALT), marcadores de dano hepático, mostraram que o grupo cirrótico apresentaram níveis significativamente aumentados (p<0,05), já nos do grupo cirrótico mais tratamento com Melatonina houve uma diminuição significativa desse mesmo parâmetro em comparação com os cirróticos (p<0,05) (Tabela 1).

**Tabela 1 - Valores das enzimas de integridade hepática AST e ALT.**

	CO	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + MEL
AST <sub>(U/L)</sub>	132,4±15,44	530,4±64,1 <sup>a</sup>	381,8±66,6 <sup>b</sup>
ALT <sub>(U/L)</sub>	37,4±2,8	304,2±33,7 <sup>a</sup>	173,0±27,4 <sup>c</sup>

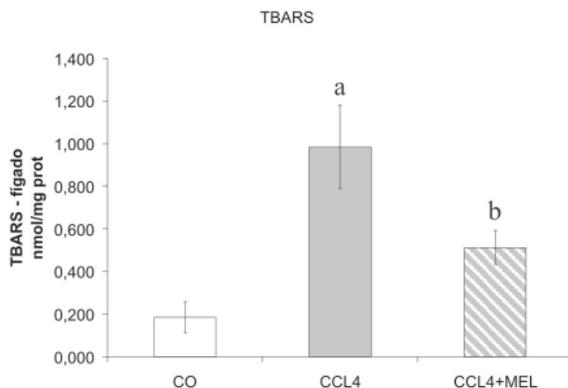
a – p<0,001 vs CO; b – p<0,01 vs CCl<sub>4</sub>; c – p<0,001 vs CCl<sub>4</sub>

CO – grupo controle; CCl<sub>4</sub> – grupo cirrótico; CCl<sub>4</sub>+MEL – grupo cirrótico tratado com Melatonina

AST – aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase.

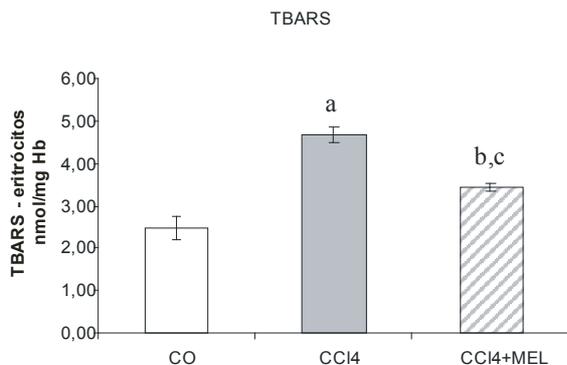
### Lipoperoxidação

Os resultados obtidos através do método de TBARS, no sangue e fígado, mostram que ocorreu aumento da lipoperoxidação no grupo cirrótico, quando comparado com o controle (>180%), já no grupo tratado com MEL esses valores retornam para próximo dos valores do controle, tanto no tecido hepático como nos eritrócitos (Figura 1 e 2).



**Figura 1** - Efeito do tetracloreto de carbono inalatório e da administração de Melatonina na lipoperoxidação, analisada pelo método de TBARS nos fígados.

Média ± erro padrão (n=5).  
 a -  $p < 0,01$  vs CO; b -  $p < 0,05$  vs CCl<sub>4</sub>.  
 CO – grupo controle; CCl<sub>4</sub> – grupo cirrótico; CCl<sub>4</sub>+MEL – grupo cirrótico tratado com Melatonina.



**Figura 2** - Efeito do tetracloreto de carbono inalatório e da administração de Melatonina na lipoperoxidação, analisada pelo método de TBARS nos eritrócitos.

Média ± erro padrão (n=5).  
 a -  $p < 0,001$  vs CO; b -  $p < 0,001$  vs CCl<sub>4</sub>; c -  $p < 0,01$  vs CO;  
 CO – grupo controle; CCl<sub>4</sub> – grupo cirrótico; CCl<sub>4</sub>+MEL – grupo cirrótico tratado com Melatonina

## Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase (GPx), nos eritrócitos, do grupo cirrótico estão diminuídos em comparação aos do grupo controle. No grupo que recebeu MEL, a atividade da GPx não houve diferença com o grupo CCl<sub>4</sub>, já na atividade da SOD houve aumento significativo nos ratos que receberam MEL em comparação aos cirróticos. Na avaliação da atividade da Catalase (CAT), não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos (Tabela 2).

**Tabela 2** - Avaliação da atividade das enzimas SOD, GPx e CAT.

	CO	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + MEL
SOD (USOD/mg prot)	31,15±2,88	12,65±2,33 <sup>a</sup>	22,11±1,58 <sup>b,c</sup>
GPx (nmoles/min/mg prot)	1,46±0,34	0,72±0,03 <sup>b</sup>	0,67±0,03 <sup>b</sup>
CAT (moles/mg de prot)	0,011±0,002	0,008±0,001	0,007±0,001

a -  $p < 0,01$  vs CCl<sub>4</sub>; b -  $p < 0,05$  vs CO; c -  $p < 0,05$  vs CCl<sub>4</sub>;  
 Média ± erro padrão (n=5).  
 CO – grupo controle; CCl<sub>4</sub> – grupo cirrótico; CCl<sub>4</sub>+MEL – grupo cirrótico tratado com Melatonina

## Óxido nítrico

Na medida do óxido nítrico (NO) no fígado, observamos uma diminuição significativa dos metabólitos no NO nos ratos cirróticos em comparação aos controles, e a MEL não foi capaz de reverter essa situação (Tabela 3).

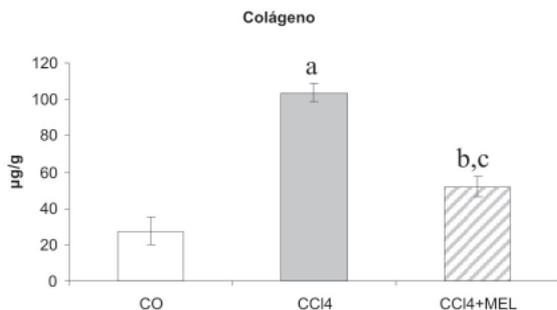
**Tabela 3** - Avaliação do NO no tecido através da medida dos metabólitos Nitritos e Nitratos totais.

	CO	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> + MEL
NITRITOS (µmol/L)	6,14±0,94	2,60±0,23 <sup>a</sup>	3,29±0,52 <sup>a</sup>
NITRATOS TOTAIS (µmol/L)	0,274±0,012	0,130±0,010 <sup>b</sup>	0,100±0,009 <sup>b</sup>

a -  $p < 0,01$  vs CO; b -  $p < 0,001$  vs CO;  
 Média ± erro padrão (n=5).  
 CO – grupo controle; CCl<sub>4</sub> – grupo cirrótico; CCl<sub>4</sub>+MEL – grupo cirrótico tratado com Melatonina

## Colágeno

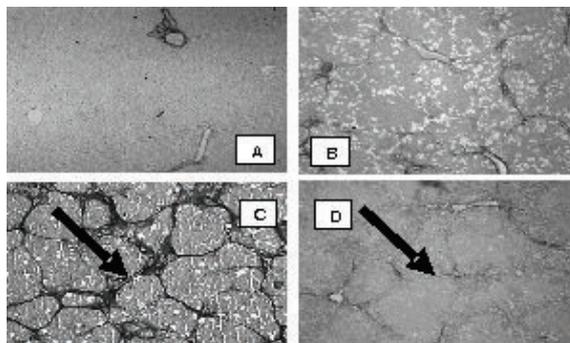
Na medida da concentração de colágeno, observamos um aumento significativo nos animais do grupo cirrótico em comparação aos do grupo controle, já nos do grupo tratado com MEL, observamos uma diminuição desses valores quando comparado aos cirróticos (Figura 3).



**Figura 3 -** Efeito do CCl<sub>4</sub> inalatório e da administração de Melatonina na concentração de colágeno no fígado.

## Histologia

A histologia dos animais CCl<sub>4</sub> na décima semana apresentou presença de fibrose nodular (Figura 4B), quando comparado com controle (Figura 4A). Na décima sexta semana, os ratos desse mesmo grupo apresentavam cirrose severa, com grande concentração de fibrose nodular e colágeno (Figura 4C), já nos animais tratado com Melatonina mostraram uma regressão nesse quadro, com moderada fibrose (Figura 4D).



**Figura 4 -** Fotomicrografia de fígado de ratos. **A.** fígado de rato controle; **B.** fígado de rato cirrótico na décima semana de inalação; **C.** fígado de rato cirrótico na décima sexta semana de inalação; **D.** fígado de rato cirrótico tratado com MEL. Coloração de picrossírius (40x).

## DISCUSSÃO

A indução de cirrose hepática através da inalação de tetracloreto de carbono é um efetivo modelo experimental para se avaliar as lesões oxidativas causadas pela formação de radicais livres (CREMONESE, 2001; PEREIRA-FILHO, 2008).

Tem-se reconhecido que os radicais livres triclorometil (CCl<sub>3</sub>•) e triclorometilperoxil (OOCCL<sub>3</sub>•), formados após a metabolização do CCl<sub>4</sub> pelo citocromo p-450, desestruturam os hepatócito (BOVERIS, 1983), provocam alterações morfológicas envolvendo o retículo endoplasmático, complexo de golgi, a membrana plasmática e a mitocôndria destas células (CAMERON, 1936). Estas alterações lesam a célula, provocando sua morte/regeneração e conseqüentemente fibrose tecidual, que organizada em nódulos, caracterizará a cirrose hepática (RECKNAGEL, 1989).

As provas de integridade hepática (PIH) mostraram lesão tecidual nos ratos do grupo cirrótico, com o aumento de pelo menos 400 vezes, e apresentaram níveis diminuídos de lesão nos animais do grupo tratado com o antioxidante Melatonina, assim como foi observado em outros trabalhos com a administração de diferentes antioxidantes, como a N-acetilcisteína (PEREIRA-FILHO, 2008), e a quercetina (PAVANATO, 2007; VIERA, 2008), evidenciando a proteção ao dano hepático nesses animais.

A lipoperoxidação é um marcador de dano na membrana celular, e a medida de malondialdeído, que é um produto desse dano, é realizada através da técnica de TBARS. Nesse trabalho avaliamos a lipoperoxidação no tecido hepático e, também, nos eritrócitos. Obtivemos como resultado, um aumento importante e significativo desse marcador em ambas as amostras dos animais do grupo cirrótico em comparação aos controles e um decréscimo nos animais que receberam a MEL comparando-os com os CCl<sub>4</sub>. Esses dados mostram que há o dano oxidativo sobre os lipídios das membranas dessas células, e que a Melatonina diminui esse dano (GEETHA, 2007; PEREIRA-FILHO, 2008; PAVANATO, 2007; WU, 2007; VIERA, 2008).

As enzimas antioxidantes endógenas são os principais responsáveis pela defesa do organismo frente a esses agentes oxidativos, sendo constituídos principalmente pelas enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione peroxidase (GPx). No presente trabalho, não foi encontrado diferença significativa de CAT, nos eritrócitos, entre os grupos, podendo ser justificada pela diminuição da SOD e conseqüentemente da GPx no grupo cirrótico, não alterando a atividade da CAT. Visto que o radical livre é primeiramente reduzido pela SOD, que formará o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que por sua vez será reduzido pela GPx ou pela CAT. Na avaliação

da GPx, houve uma redução significativa da sua atividade em animais cirróticos em comparação aos cirróticos. Na avaliação da atividade da SOD, podemos observar que houve uma diminuição de 40 % em comparação ao controle, já nos animais tratados com MEL, houve uma melhora nesses resultados, aumentando 57% em comparação aos cirróticos, podendo ser decorrente da ação indireta da MEL, a qual estimula a síntese de SOD.

As reduções das enzimas antioxidantes endógenas nos animais cirróticos, juntamente com os resultados de lipoperoxidação, classifica esses animais em um quadro de estresse oxidativo (OSMAN, 2007), já nos animais tratados com o antioxidante Melatonina reduziram a lipoperoxidação e aumentaram a atividade da enzima SOD, demonstrando uma melhora significativa do estresse oxidativo nesses animais e posteriormente tratados com MEL, possivelmente por sua ação varredora de radicais livres.

O óxido nítrico é um importante vasodilatador no sistema vascular. Na avaliação do óxido nítrico, através da medida dos metabólitos nitritos e nitratos totais, podemos observar que os ratos cirróticos apresentaram uma diminuição significativa em comparação aos do controle, mostrando um desequilíbrio no sistema vasodilatador/vasoconstritor intra-hepático (VIERA, 2008). Porém a Melatonina na dose que foi utilizada não foi capaz de restaurar esses níveis.

O colágeno é sintetizado através da ativação das células estreladas hepáticas, em uma medida fisiológica de regeneração tecidual. Na quantificação de colágeno nos fígados dos animais cirróticos, constatamos um aumento de 381 vezes em comparação ao controle, e uma redução, de 198 vezes, dos tratados comparando-os com animais cirróticos, assim como Pereira-Filho et al. observa-

ram com o tratamento com outro antioxidante, a N-acetilcisteína (2008).

A análise histológica mostrou através da técnica de coloração de picrossírius a presença de colágeno e formação de micro e macro nódulos fibróticos, caracterizando cirrose hepática e diminuição desses danos nos fígados dos animais tratados com a MEL, como observado em trabalhos com uso da NAC e quercetina em animais cirróticos (PEREIRA-FILHO, 2008; PAVANATO, 2007; TIEPPO, 2007; VIERA, 2008).

Esses dados nos fazem sugerir que a Melatonina diminui o estresse oxidativo, por sua ação de “scavenger” de radicais livres e proteção antioxidante de biomoléculas. A Melatonina reduz significativamente os níveis de lipoperoxidação no fígado e eritrócitos, diminui significativamente o colágeno no fígado e aumenta a atividade da enzima antioxidante SOD nos eritrócitos.

Os resultados encontrados no presente trabalho em sangue e tecido hepático são semelhantes aos encontrados por nosso grupo em outras avaliações no tecido hepático, utilizando outros modelos de cirrose e avaliando outros antioxidantes, como a N-acetilcisteína (NAC), e a quercetina (PEREIRA-FILHO, 2008; PAVANATO, 2007; VIERA, 2008), sugerindo desta forma a eficácia nas dosagens realizadas através de eritrócitos de ratos, para avaliação de estresse oxidativo sistêmico.

## CONCLUSÃO

A administração de Melatonina reduziu o dano hepático, a lipoperoxidação e elevou a atividade da enzima antioxidante SOD, demonstrando-se proteção hepática frente a esse agente agressor.

A dosagem do estresse oxidativo em sangue periférico parece ser eficaz para a análise de cirrose hepática, reproduzindo os danos oxidativos vistos no tecido hepático.

## REFERÊNCIAS

AEBI H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

BAYDAS, G. et al. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced *Diabetes mellitus*. **Journal of Pineal Research: molecular, biological, physiological and clinical aspects of melatonin**, v.32, n.4, p.225-230, 2002.

BERTELLI, M.S.; CONCI, F.M. Cirrose hepática. In: **ÁLCOOL e Fígado**. 1.ed. Caxias do Sul: Editora Universidade de Caxias do Sul, 1997. p. 88-94.

BOVERIS A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.227, n.2, p.534-541, 1983.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

BUTLER, T. C. Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissue constituents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.134, p.311-319, 1961.

CAMERON, T.W. Parasites of animals and the public health in North America. **American**

**Journal of Public Health and the Nation's Health**, v.26, n.1, p.46-50, 1936.

CESARATTO, L.C. et al. The importance of redox state in liver damage. **Annals of Hepatology**, v.3, n.3, p.86-92, 2004.

CREMONESE, R.V. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.38, n.1, p.40-47, 2001.

DRABKIN, D.L. Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v.98, p.719-733, 1932.

FLOHE, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-121, 1984.

GEETHA, A. et al. Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.126, n.3, p.204-210, 2007.

GITTO, E. et al. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, n.10, p.1393-1401, 2001.

GOLDIN JR, R.M.M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA. 1997.

GRANGER, D.L. Et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in Enzymology**, v.301, p.49-61, 1999.

GUYOT, C.S. et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, n.2, p.135-151, 2006.

HAGYMASI, K.A. et al. Oxidative damage in alcoholic liver disease. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.13, n.1, p.49-53, 2001.

HALPERN, B.N. ; PACAUD, A. Technique de prélèvement d'échantillon de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophthalmique. **Comptes Rendues de la Société Biologique**, Paris, v.145, p.1465-1467, 1951.

HUFFMYER, J.L.; NEMERGUT, E.C. Respiratory dysfunction and pulmonary disease in cirrhosis and other hepatic disorders. **Respiratory Care**, v.52, n.8, p.1030-1036, 2007.

JIMENEZ, W. et al. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.7, n.1, p.90-97, 1992.

KUCUKAKIN, B.I. et al. Oxidative stress in relation to surgery: Is there a role for the antioxidant melatonin? **Journal of Surgical Research**, v.152, n.2, p.338-347, 2008.

LECOMTE, E.B. et al. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.60, n.2, p.255-261, 1994.

LEE, C.H. et al. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.10, p.1898-1904, 2007.

- LEO, M.A. et al. Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. **Hepatology**, v.17, n.6, p.977-986, 1993.
- LOTERSZTAJN, S. et al. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.605-628, 2005.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MARTINEZ-CRUZ, F.D. et al. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. **Journal of Neuroscience Research**, v.69, n.4, p.550-558, 2002.
- MCCLAIN, C.J. et al. Cytokines in alcoholic liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v.19, n.2, p.205-219, 1999.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.
- MUNOZ-CASTANEDA, J.R. et al. Melatonin exerts a more potent effect than S-adenosyl-L-methionine against iron metabolism disturbances, oxidative stress and tissue injury induced by obstructive jaundice in rats. **Chemico-Biological Interactions: a Journal of Molecular, Cellular and Biochemical Toxicology**, v.174, n.2, p.79-87, 2008.
- MURIEL, P. et al. Protective effect of S-adenosyl-L-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach. **Journal of Hepatology**, v.21, n.1, p.95-102, 1994.
- NAKAHIRA, K.T. et al. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, v.66, n.6, p.1091-1105, 2003.
- OSMAN, H.G. et al. Serum levels of bcl-2 and cellular oxidative stress in patients with viral hepatitis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.25, n.4, p.323-329, 2007.
- PADHY, B.M. et al. Calotropis procera latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.3, p.498-502, 2007.
- PAVANATO, A.N. et al. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, n.10, p.2616-2621, 2007.
- PAVANATO, A.M.J. et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.48, n.4, p.824-829, 2003.
- PEREIRA-FILHO, G. et al. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.45, n.2, p.156-162, 2008.
- PERES, W.M.J. et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, v.33, n.5, p.742-750, 2000.
- PIERI, C.M. et al. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sciences: Molecular, Cellular, and Functional Basis of Therapy**, v.55, n.15, p.PL271-PL276, 1994.

POYER, J.L. et al. Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during <sup>13</sup>C-carbon tetrachloride metabolism *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.94, n.4, p.1154-1160. 1980.

RECKNAGEL, R.O. et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v.43, n.1, p.139-154, 1989.

REITER, R.L. et al. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences: Molecular, Cellular, and Functional Basis of Therapy**, v.60, n.25, p.2255-2271, 1997.

ROCCHI, E.A. et al. Carotenoids and liposoluble vitamins in liver cirrhosis. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.118, n.2, p.176-185, 1991.

ROJKIND, M.; GONZALEZ, E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-<sup>14</sup>C and hydroxyproline-<sup>14</sup>C in collagen and in noncollagenous proteins. **Analyti-**

**cal Biochemistry**, v.57, n.1, p.1-7, 1974.

TAN, D.X. et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.253, n.3, p.614-620, 1998.

TIEPPO, J.R. et al. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.42, n.4, p.244-248, 2005.

TIEPPO, J.R. et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.7, p.1140-1146, 2007.

VIERA, E.K. **O efeito da quercetina no estresse oxidativo sistêmico em ratos cirróticos**. 71f. 2008. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

YAGI, K. Assay for blood plasma or serum. **Methods in Enzymology**, v.105, p.328-331, 1984.