



ACÇÃO DA MELATONINA NO MODELO DE CIRROSE BILIAR SECUNDARIA INDUZIDA PELA LIGADURA DE DUCTO BILIAR.

Tayná Oliveira Mendes¹
Josieli Raskopf Colares²
Norma Possa Marroni³

Resumo

A cirrose biliar secundária é uma complicação da obstrução das vias biliares que leva a alterações estruturais e funcionais do fígado. O estresse oxidativo (EO) parece estar relacionado com inúmeras doenças hepáticas, este é definido como um desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes. A melatonina (Mel) é o principal produto da síntese da glândula pineal. O presente estudo avaliou os efeitos da Mel no modelo de ligadura de ducto biliar (LDB). Foram utilizados 36 ratos machos Wistar, divididos em 4 grupos: CO (simulação da LDB e administração do veículo), LDB (LDB e administração de veículo), CO+Mel (simulação da LDB e administração de Mel) e LDB+Mel (LDB e administração de Mel). A Mel foi administrada na dose de 20mg/Kg por via i.p. Avaliou-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione total (GSH), glutathione-S-transferase (GST) e lipoperoxidação (TBARS). Análise estatística foi ANOVA seguida do t de Student. Na avaliação da lipoperoxidação observamos um aumento no grupo LDB em relação aos grupos controles e uma diminuição no grupo LDB+Mel quando comparado ao grupo LDB. Na avaliação das enzimas antioxidantes observamos uma diminuição da SOD no grupo LDB em relação aos grupos controles e um aumento no grupo LDB+Mel quando comparado ao cirrótico. Na avaliação das demais enzimas, todas apresentaram-se diminuídas no grupo LDB em relação aos grupos controles e apresentaram um aumento no grupo LDB+Mel quando comparadas ao grupo LDB. Os resultados sugerem um efeito protetor da Mel quando administrada em ratos com cirrose biliar secundária induzida por LDB.

Palavras chave: Estresse Oxidativo; radicais livres; antioxidante.

INTRODUÇÃO

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas. O dano hepático colestático é característico da cirrose biliar secundária. Em casos em que 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 estresse oxidativo (EO) parece estar relacionado com inúmeras doenças hepáticas (TIEPPO et al., 2005; VERSELINO et al., 2010). O EO é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes, a favor dos oxidantes (SIES e MURPHY, 1991).

1 Aluno do curso de Enfermagem – Bolsista PROBIC/FAPERGS – tayna.om@gmail.com

2 Aluno do PPGBioSaúde - ULBRA – jozy.ma@hotmail.com

3 Professor do curso de Odontologia e PPGBioSaúde – ULBRA – nmarroni@terra.com.br

Vários antioxidantes (AOX) tem sido referidos como eficazes para diminuir o dano em modelos animais de cirrose biliar secundária à ligadura de ducto biliar, de cirrose por álcool ou por administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) (MURIEL e GONZÁLEZ, 1994).

A melatonina (Mel - N-acetil-5-metoxitriptamina) é citada em diferentes estudos como potente antioxidante (AOX), atuando na diminuição de radicais livres (RL) bem como, seus efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores (REITER et al., 2000). Também apresenta propriedades oncostáticas observadas no estudo de diversos tumores (CUI et al., 2012).

Levando-se em consideração estes dados, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da Mel sobre marcadores de estresse oxidativo em ratos com cirrose biliar secundária, induzida pela ligadura de ducto biliar comum.

METODOLOGIA

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, com peso ± 350 gramas, divididos em 4 grupos experimentais:

- CO: submetido a simulação da cirurgia de LDB e tratado com veículo NaCl 0,9%;
- CO+Mel: submetido a simulação da cirurgia de LDB e tratado com Mel;
- LDB: submetido a cirurgia de LDB e tratado com veículo NaCl 0,9%;
- LDB+Mel: submetido a cirurgia de LDB e tratado com Mel.

O modelo utilizado para o desenvolvimento de cirrose biliar secundária, foi o estabelecido por Kountouras et al. 1984, através da ligadura de ducto biliar comum.

A cirurgia de ligadura de ducto biliar (LDB) iniciou com a anestesia dos animais mediante a administração de uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg i.p. e posicionamento para cirurgia.

A intervenção cirúrgica iniciou com tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média e posterior dissecação do ducto biliar, ligando-se estes por meio de dois nós e posterior secção entre eles. Após a cavidade abdominal, o peritônio e a camada muscular abdominal foram fechados.

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

Após 28 dias os animais foram novamente pesados e anestesiados mediante a administração de fármacos anestésicos.

O sangue foi coletado, através da técnica de punção do plexo veno retro-orbital com tubo capilar de vidro (HALPERN e PACAUD, 1951) e colocado em tubo de ensaio com heparina, para evitar a coagulação. O fígado e o baço foram coletados, sendo estes pesados

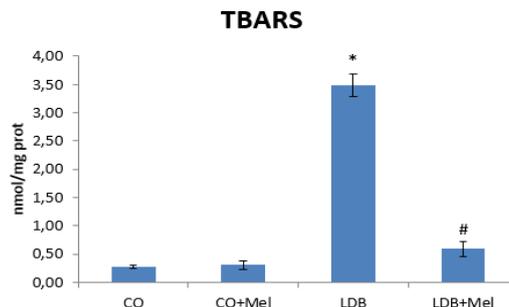
para realização das relações hepatossomática e esplenossomática, sendo posteriormente, o fígado, separado em partes e congelado a -80°C , para as análises posteriores.

O destino das carcaças foi de acordo com o preconizado pelo CONCEA.

RESULTADOS

Na análise da lipoperoxidação (LPO) hepática realizada através da técnica de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico se observou um maior dano no grupo LDB quando comparado aos grupos controles, e uma diminuição da lipoperoxidação quando os animais submetidos a LDB receberam tratamento com Mel.

Figura 1: Dados de lipoperoxidação.

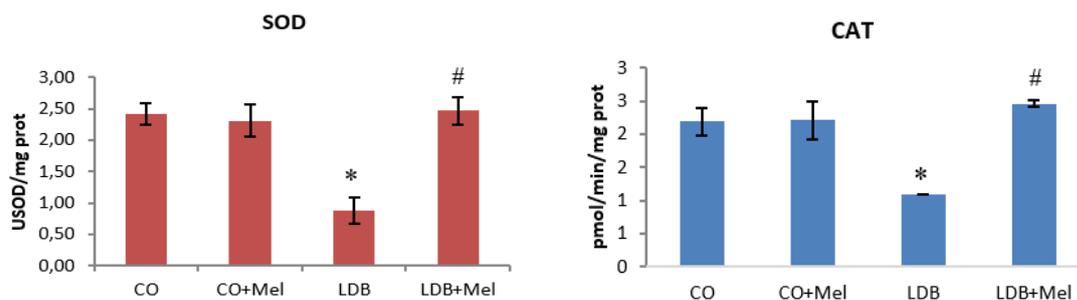


* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+Mel.

Diminuição significativa com relação ao grupo LDB.

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram uma menor atividade no grupo LDB quando comparada aos grupos CO e CO+Mel. No grupo LDB+Mel é possível observar um aumento destas quando comparadas ao grupo LDB.

Figura 2: Atividade da enzima Superóxido Dismutase e Catalase.

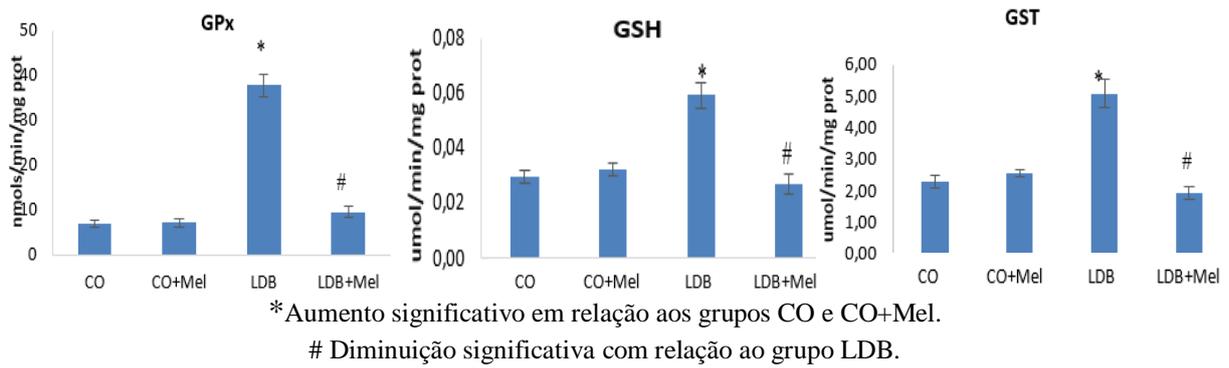


* Diminuição significativa em relação aos grupos CO e CO+Mel.

Aumento significativo com relação ao grupo LDB.

Quando avaliadas as enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH) e glutathione S-transferase (GST), todas apresentaram-se aumentadas nos animais cirróticos quando comparados aos animais submetidos a simulação da cirurgia de LDB. Os animais cirróticos que receberam tratamento com Mel apresentaram uma restauração no nível destas enzimas quando comparados ao grupo LDB.

Figura 3: Atividade das enzimas GPx, GSH e GST



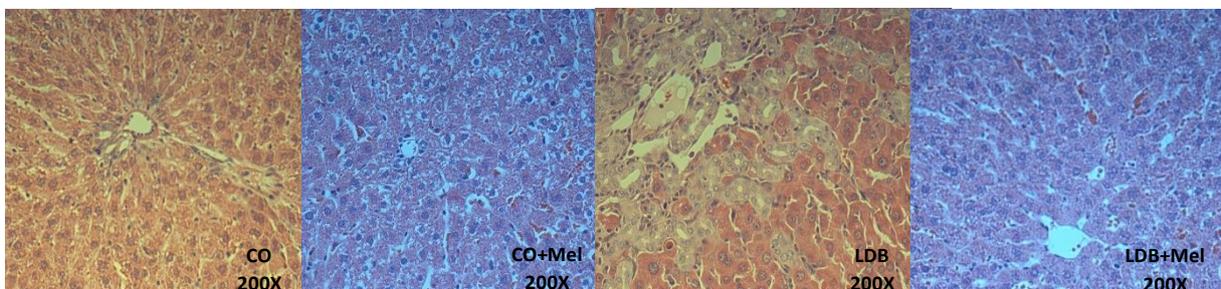
Quando avaliados quanto ao ganho de peso ao longo do experimento, se observou que os animais do grupo CO tiveram um ganho de peso de 24,6%. O grupo CO+Mel teve seu peso aumentado em 29,3%. Já no grupo LDB se observou um ganho de peso de apenas 8% ao longo do experimento, enquanto que os animais do grupo LDB+Mel tiveram seu peso aumentado em 21,7% do início ao final do experimento.

Figura 4: Ganho de peso.



Na análise histológica dos diferentes grupos avaliados, se observou que os grupos CO e CO+Mel apresentam uma arquitetura normal do fígado. No grupo LDB se evidencia uma destruição do parênquima hepático e no grupo LDB+Mel se observa uma restauração do parênquima hepático, aproximando-se da estrutura dos grupos CO e CO+Mel.

Figura 5: Análise por HE dos diferentes grupos.



CONCLUSÕES

O modelo de LDB apresenta os sinais clínicos da cirrose biliar secundária em pacientes, sendo desta forma eficaz para o estudo de alterações decorrentes da doença e

possibilitando sua investigação para o estudo de possíveis AOX que possam minimizar estas alterações aumentando assim a qualidade de vida dos pacientes.

A Mel mostrou ser um AOX eficaz neste modelo experimental diminuindo o EO e restaurando as estruturas hepáticas.

REFERÊNCIAS

American Veterinary Medical Association, A. AVMA releases updated euthanasia guidelines. **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association** [S.I.]. v.231, n.6, p.827, 2007.

CUI, P. et al. Melatonin prevents human pancreatic carcinoma cell PANC-1-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration by inhibiting vascular endothelial growth factor expression [S.I.]. **J Pineal Res.**, v.52, n.2, p.236-43, 2012.

GRIGOROV, I. et al. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Physiol Biochem**, 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.

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.

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.

MURIEL, P. et al. Protective effect of Sadenosylmethionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical study. **J Hepatol.**, v.21, p.95-102, 1994.

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. **Ann N Y Acad Sci.**, v.917, p.376-86, 2000.

SIES, H.; MURPHY, M. E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **J Photochem Photobiol B.**, v.8, n.2, p.211-8, 1991.

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.