



## ACÇÃO DA MELATONINA NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE EM RATOS

Victoria Figueiredo Leivas dos Santos<sup>1</sup>  
Jeferson de Oliveira Salvi<sup>2</sup>  
Elizângela Gonçalves Schemitt<sup>3</sup>  
Norma Possa Marroni<sup>4</sup>

### Resumo

A Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) uma síndrome com elevada mortalidade e de baixa prevalência, que compromete a estrutura e a função hepática. A tioacetamida é um conhecido hepatotóxico que provoca lesões de diferentes graus, de acordo com a dose e o tempo de exposição. Como a produção excessiva de EROs parece ter um papel importante na fisiopatologia da IHAG, experimentos com antioxidantes podem ser uma opção para novas terapias. A melatonina é um hormônio indolamínico com capacidade antioxidante e fotoprotetora. O objetivo do trabalho foi avaliar o estresse oxidativo em fígado de ratos com IHAG tratados com melatonina. Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, divididos em 4 grupos: Controle; Melatonina; Tioacetamida; Tioacetamida + Melatonina. Após 24 horas, os animais foram anestesiados, mortos e retirado o fígado para análises. Foram avaliadas a lipoperoxidação (TBARS) a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) e a análise histológica. A análise estatística foi ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls, sendo significativo  $P < 0,05$ . A lipoperoxidação apresentou-se aumentada nos grupos TAA e diminuída nos grupos tratados com melatonina. Foi observada uma alteração na atividade enzimática nos grupos TAA em relação aos grupos controles e uma restauração na atividade nos grupos tratados com melatonina. Foi observado a presença de infiltrato inflamatório e necrose no tecido hepático dos animais do grupo TAA e uma diminuição desses parâmetros nos animais tratados com melatonina. O uso da melatonina foi capaz de atenuar os danos ocasionados pela tioacetamida neste modelo experimental.

**Palavras-chaves:** estresse oxidativo; hepatotoxicidade; antioxidantes

### INTRODUÇÃO

A insuficiência hepática aguda grave (IHAG) é a situação que ocorre quando há lesão súbita, com necrose da maioria dos hepatócitos sem regeneração evidente e rápida, em fígado previamente normal, e que determina alterações graves de coagulação do metabolismo, com quadro clínico de encefalopatia e coma (LEE et al., 2003).

O Estresse Oxidativo (EO) está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo a IHAG. O EO é um estado de desequilíbrio no qual substâncias oxidantes excedem os sistemas de proteção antioxidantes proporcionando a formação de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais livres (RL). Estes últimos são moléculas instáveis por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados em seu subnível de energia mais externo, desta forma, buscam reagir com outras moléculas para o reequilíbrio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984).

As substâncias antioxidantes podem ser compreendidas, de maneira ampla, como quaisquer substâncias que em reduzida concentração, comparada a um substrato oxidável, conseguem inibir ou atrasar significativamente a oxidação do mesmo (Jones, 2006).

A Tioacetamida (TAA),  $C_2H_5NS$ , é um composto organo-sulfuroso cuja administração crônica levava à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (DAVID et al., 2011). Após a administração, a TAA é rapidamente convertida em acetamida e tioacetamida-S-óxido (TASO) que é metabolizada, posteriormente, à tioacetamida-S-dióxido (TASO<sub>2</sub>) (PORTER &

1 Aluna do curso de Fisioterapia – Bolsista PROBIC/FAPERGS – victorialeivas21@gmail.com

2 Aluno no PPGBioSaúde – ULBRA - jefersonsalvi@hotmail.com

3 Aluna no PPGCiências Médicas – UFRGS – elizschemitt@yahoo.com.br

4 Professora Orientadora do PPGBioSaúde – nmarroni@terra.com.br

NEAL, 1978). A TAA é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (ERO) e necrose (MANGIPUDY et al., 1995).

A melatonina (Mel - N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina lipofílica, sintetizada através da serotonina e derivada do aminoácido triptofano. É citada em diferentes estudos como potente antioxidante com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (ACUÑA-CASTROVIEJO, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo em fígado de ratos com Insuficiência Hepática Aguda Grave tratados com melatonina.

## METODOLOGIA

Os procedimentos com os animais foram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética da ULBRA Canoas (protocolo 2015-1P) e seguem as normas da Lei 11.794 sobre procedimentos em animais de pesquisa.

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, com peso médio de 300 gramas provenientes do Biotério da ULBRA. Os animais foram divididos em 4 grupos (Controle, Melatonina, Tioacetamida e Tioacetamida + Melatonina) com sete ratos cada (baseado em cálculo amostral).

A tioacetamida foi administrada via intraperitoneal na dose de 400 mg/kg no início do experimento e 8 horas após. A melatonina (dose de 5 mg/Kg) foi administrada meia hora após a segunda dose de TAA.

Decorridas 24 horas do início do experimento, os ratos foram anestesiados com Cetamina (95 mg/Kg) e Xilasina (8 mg/Kg) e em seguida o fígado foi coletado para a avaliação da lipoperoxidação, atividade das enzimas antioxidantes e histologia. Após, foram mortos por exsanguinação sob anestesia profunda.

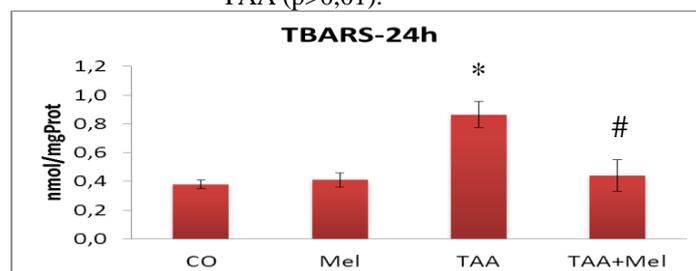
Uma porção do fígado foi imediatamente congelada para posteriores análises de lipoperoxidação através da técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes SOD (MIRSA & FRIDOVICH, 1972), GPx (FLOHE & GUNZLER 1984), CAT (BOVERIS & CHANCE, 1973) e GST (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981). Outra porção do fígado foi imersa em formol 10% para posterior avaliação histológica através de lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

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

## RESULTADOS

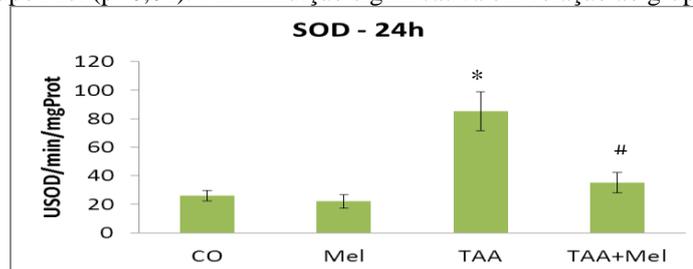
Ao avaliar os níveis de TBARS, técnica que avalia a lipoperoxidação, foi demonstrado na figura 1, um aumento significativo no grupo TAA em relação aos grupos controles (CO e Mel) e uma diminuição significativa no grupo TAA+Mel em relação ao grupo TAA.

Figura 1: Avaliação da lipoperoxidação. Os dados são expressos como média±erro padrão. \* Aumento significativo em relação ao grupo CO e grupo Mel ( $p > 0,001$ ). # Diminuição significativa em relação ao grupo TAA ( $p > 0,01$ ).



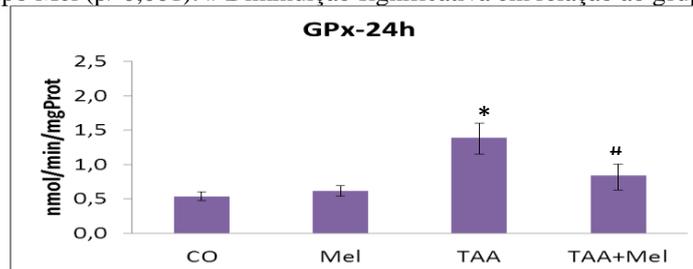
Na figura 2 são apresentados os valores da atividade da enzima Superóxido Dismutase (USOD/mg prot) nos diferentes grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo no grupo TAA em relação aos controles (CO e Mel) e uma diminuição significativa no grupo TAA+Mel quando comparado ao grupo TAA.

Figura 2: Atividade da SOD. Os dados são expressos como média±erro padrão. \* Aumento significativo em relação ao grupo CO e grupo Mel ( $p>0,01$ ). # Diminuição significativa em relação ao grupo TAA ( $p>0,01$ ).



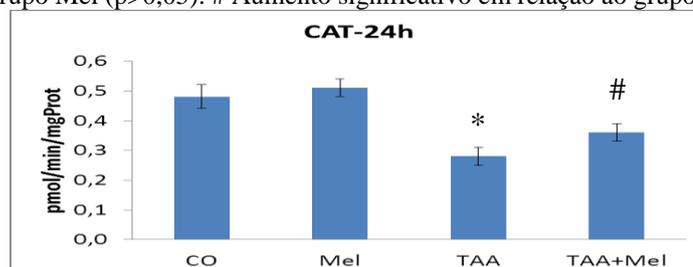
Na figura 3 são apresentados os valores da Glutaciona Peroxidase (nmoles/mg prot) nos diferentes grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo no grupo TAA em comparação com os grupos CO e Mel e uma diminuição significativa no grupo TAA+Mel quando comparado com o grupo TAA.

Figura 3: Atividade da GPx. Os dados são expressos como média±erro padrão. \* Aumento significativo em relação ao grupo CO e grupo Mel ( $p>0,001$ ). # Diminuição significativa em relação ao grupo TAA ( $p>0,05$ ).



Ao avaliar a atividade da enzima catalase (nmoles/mg prot) nos diferentes grupos experimentais foi observado um aumento significativo nos animais do grupo TAA quando comparado com o grupo CO e grupo Mel. No grupo que recebeu a melatonina como tratamento, observa-se uma redução significativa em relação ao grupo TAA, conforme demonstrado na figura 4.

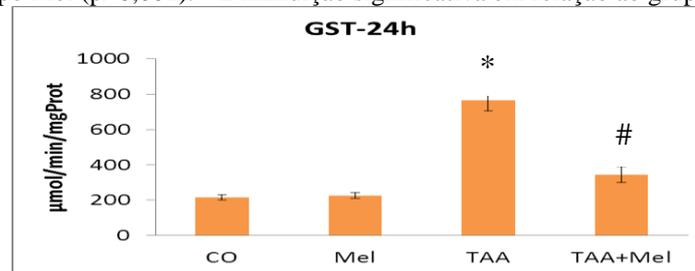
Figura 4: Atividade da CAT. Os dados são expressos como média±erro padrão. \* Diminuição significativa em relação ao grupo CO e grupo Mel ( $p>0,05$ ). # Aumento significativo em relação ao grupo TAA ( $p>0,05$ ).



Ao avaliar a atividade da enzima detoxificadora Glutaciona S-Tranferase ( $\mu\text{mol/min/mg prot}$ ) nos diferentes grupos experimentais, observa um aumento no grupo

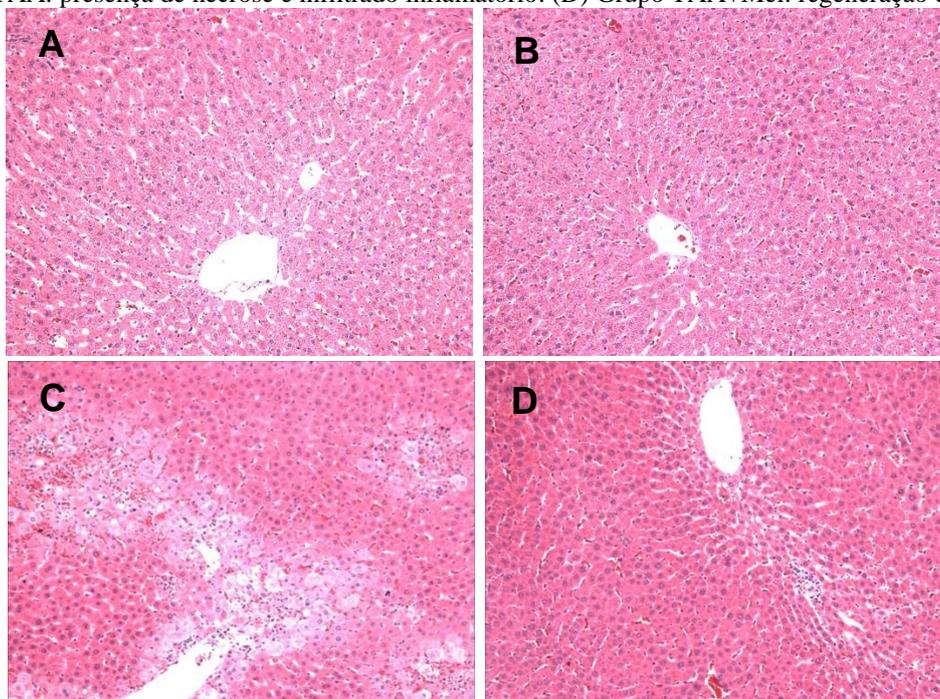
TAA em relação aos grupos CO e Mel e no grupo TAA+Mel ocorre uma diminuição significativa em comparação ao grupo TAA, conforme é possível verificar na figura 5.

Figura 5: Atividade da GST. Os dados são expressos como média±erro padrão. \* Aumento significativo em relação ao grupo CO e grupo Mel ( $p>0,001$ ). # Diminuição significativa em relação ao grupo TAA ( $p>0,001$ ).



A avaliação histológica do tecido hepático (figura 6) foi realizada através de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina e observadas em um aumento de 200x. No tecido hepático de animais dos grupos CO (6-A) e Mel (6-B) é possível observar um parênquima hepático normal, com cordões de hepatócitos bem definidos e núcleos celulares bem corados. Na fotomicrografia de um animal do grupo TAA (6-C) é observado uma destruição do parênquima hepática, presença de necrose maciça e infiltrado inflamatório. Já no fígado de um animal que recebeu a melatonina como tratamento (6-D) é possível observar uma reestruturação do parênquima hepático com redução do infiltrado inflamatório e uma menor área de necrose.

Figura 6: Fotomicrografia do tecido hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais. Coloração HE. Aumento 200x. (A) Grupo CO: parênquima hepático normal. (B) Grupo Mel: semelhante ao grupo controle. (C) Grupo TAA: presença de necrose e infiltrado inflamatório. (D) Grupo TAA+Mel: regeneração do tecido.



## CONCLUSÃO

A tioacetamida desenvolve insuficiência hepática aguda grave a julgar pela avaliação da lipoperoxidação, análise da atividade das enzimas antioxidantes e avaliação histológica. A melatonina na dose utilizada restaura a função hepática e o parênquima hepático. A melatonina parece ser benéfica nesse modelo experimental.

## AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: ULBRA; FAPERGS; CNPq; CAPES.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO D, et al. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci.** v.71, n.16, p. 2997-3025. 2014.
- BOVERIS A, CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J.** v.134, n.707, p.16. 1973.
- DAVID C, RODRIGUES G, BONA S, MEURER L, GONZÁLEZ-GALLEGO J, TUÑÓN MJ, MARRONI NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology Pathology**, v.39, n.6, p.949-57, 2011.
- FLOHE L, GUNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** v.105, n.114, p.21. 1984
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4<sup>o</sup>ed., Oxford University Press Inc, New York, 2007.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal and Disease. **Biochem J**, n.219 v.1-14, 1984.
- JONES D.P. Redefining Oxidative Stress Antioxidants & Redox Signaling. **Forum Review**, v.8, n.9-10, p.1865-79, 2006.
- LEE, W.M. Acute liver failure in the United States. **Semin. Liver Dis**, v.23, n.3, p.217-26, 2003.
- LIU Y,et al. Melatonin attenuates intermittent hypoxia-induced lipid peroxidation and local inflammation in rat adrenal medulla. **Int J Mol Sci.** v.15, n.10, p.18437-52. 2014.
- MANGIPUDY R.S.; et al. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. **Environ Health Perspect**, v.103, n.260, p.7, 1995.
- MANNERVIK B, GLUTHENBERG C. Glutathione Transferase. **Methods Enzymol.** v.77, n.731, p.5. 1981.
- MIRSA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.** v.247, n.3170, p.5. 1972.
- PORTER W.R.; NEAL R.A. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. **Drug Metab Dispos**, v.6, n.4, p.379-88. 1978.