



ACÇÃO DA MELATONINA NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE EXPERIMENTAL

Maria Eduarda Gonçalves Trindade¹
Elizângela Gonçalves Schemitt²
Norma Possa Marroni³

Resumo

A Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) é 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. Como a produção excessiva de EROs possui um papel importante na fisiopatologia da IHAG, experimentos com antioxidantes podem ser uma opção para novas terapias. A melatonina é citada em estudos como antioxidante com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. 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: CO, Mel, TAA e TAA+Mel. Após 48 horas, os animais foram anestesiados, mortos e coletado o sangue para as provas de integridade hepática (AST, ALT e FA) e o fígado para avaliação de lipoperoxidação (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GST), níveis de nitritos e nitratos, análise histológica (HE) e Imunohistoquímica (iNOS). A análise estatística foi ANOVA+Student-Newman-Keuls, sendo significativo $P < 0,05$. A lipoperoxidação e as enzimas antioxidantes aumentaram nos grupos TAA e diminuíram nos grupos tratados com melatonina. Os níveis de nitritos e nitratos aumentados no grupo TAA e diminuídos no grupo tratado. Na histologia observou-se a presença de infiltrado inflamatório e necrose no tecido hepático dos animais do grupo TAA e uma redução nos animais tratados com melatonina. A expressão da iNOS estava reduzida no grupo tratado com melatonina em relação ao grupo TAA. O uso da melatonina foi capaz de atenuar os danos ocasionados pela tioacetamida neste modelo experimental.

Palavras-chaves: estresse oxidativo; hepatotoxicidade; antioxidante.

INTRODUÇÃO

A insuficiência hepática aguda grave (IHAG) ocorre quando há lesão súbita, com necrose da maioria dos hepatócitos sem regeneração evidente e rápida, em fígado previamente normal (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) que são moléculas instáveis por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). As substâncias antioxidantes são definidas 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), é um composto organo-sulfuroso cuja administração crônica leva à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (DAVID et al., 2011). A TAA é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (ERO) e necrose.

A melatonina (Mel) é um hormônio sintetizado através da serotonina e derivada do aminoácido triptofano. É citada em diferentes estudos como potente antioxidante com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores.

1 Aluna do curso de Ciências Biológicas – Bolsista PROBIC/CNPQ – mariaeduardakisner@gmail.com

2 Aluna no PPG Ciências Médicas – UFRGS – elizschemitt@yahoo.com.br

3 Professora Orientadora do PPG BioSaúde – ULBRA – nmarroni@terra.com.br

O objetivo do trabalho foi avaliar o estresse oxidativo e o processo inflamatório 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 nº 2016.120).

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, (± 300 gramas) provenientes do Biotério da ULBRA. Os animais foram divididos em 4 grupos: Controle (CO), Melatonina (Mel), Tioacetamida (TAA) e Tioacetamida + Melatonina (TAA+Mel) com sete ratos cada. A TAA foi administrada via intraperitoneal (i.p.) na dose de 400 mg/kg no início do experimento e 8 horas depois. A primeira administração da Melatonina (dose de 20 mg/Kg via i.p.) foi meia hora após a segunda dose de TAA, a segunda e a terceira dose foram administradas 24 horas e 36 horas após o início do experimento.

Decorridas 48 horas do início do experimento, os ratos foram anestesiados com Cetamina (95 mg/Kg) e Xilasina (8 mg/Kg). Foi coletado sangue do plexo retro orbital para análise das provas de integridade hepática (AST, ALT e FA) e o fígado foi coletado para a avaliação da lipoperoxidação (TBARS), atividade as enzimas antioxidantes (SOD e GST), avaliação histológica (HE) e imunohistoquímica (iNOS). Após, foram mortos por exsanguinação sob anestesia profunda. Para análise estatística foi utilizada ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls, sendo considerado significativo quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

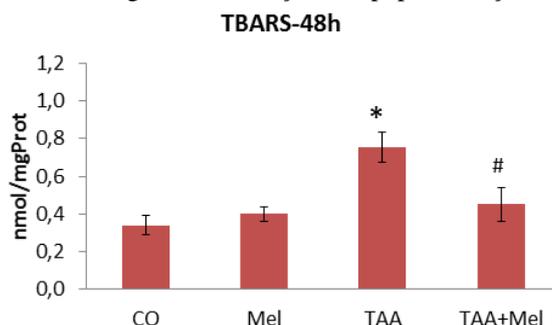
Os resultados das provas de integridade hepática são apresentados na tabela 1. Os níveis séricos de todas as enzimas no grupo TAA foram significativamente superiores ($p < 0,001$) em relação aos grupos CO e Mel. No grupo TAA+Mel, observou-se uma diminuição ($p < 0,05$) na concentração das enzimas.

Tabela 1. Concentrações séricas das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alaninaaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), * Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+MLT ($p < 0,001$). # Diminuição significativa com relação ao grupo SHP ($p < 0,001$).

Enzimas	CO	CO+Mel	TAA	TAA+Mel
AST (U/L)	35,42 ($\pm 6,98$)	39,46 ($\pm 4,66$)	564,92 ($\pm 78,45$)*	284,23 ($\pm 53,48$)#
ALT U/L)	24,57 ($\pm 3,954$)	29,48 ($\pm 3,62$)	294,36 ($\pm 15,39$)*	62,34 ($\pm 9,45$)#
FA (U/L)	16,45 ($\pm 1,55$)	18,64 ($\pm 1,36$)	65,34 ($\pm 3,46$)*	25,64 ($\pm 1,79$)#

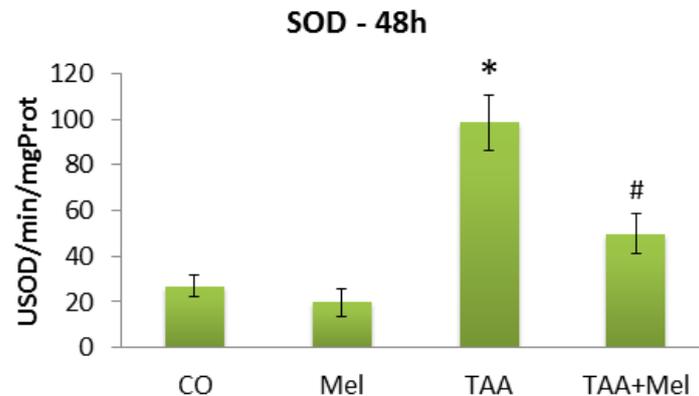
Ao observar-se os níveis de TBARS (nmol/mg prot), foi demonstrado na figura 1, um aumento significativo no grupo TAA em relação aos grupos controles (CO e Mel) e uma diminuição significativa no grupo TAA+Mel em relação ao grupo TAA.

Figura 1: Avaliação da lipoperoxidação.



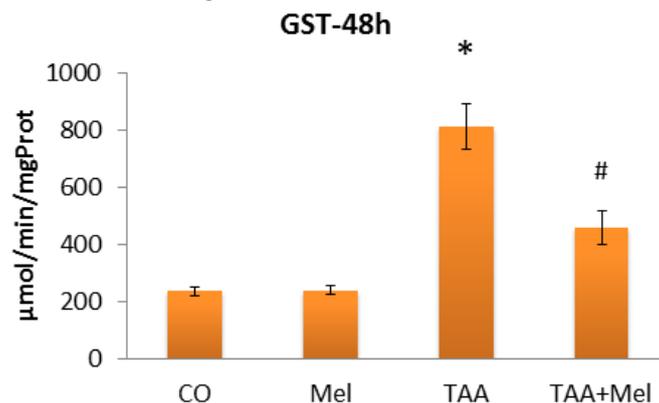
Na figura abaixo, são apresentados os valores da atividade da enzima Superóxido Dismutase (USOD/mg prot) nos diferentes grupos experimentais. Observa-se um aumento significativo no grupo TAA em relação aos controles (CO e Mel) e uma diminuição significativa no grupo TAA+Mel quando comparado ao grupo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

Figura 2: Atividade da SOD.



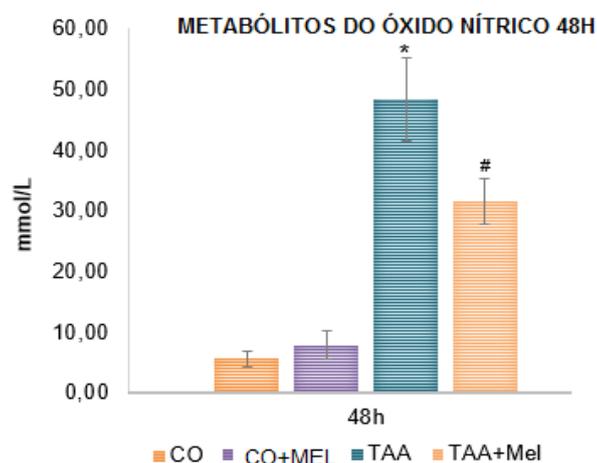
Ao avaliar a atividade da enzima detoxificadora Glutathione S-Transferase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) nos diferentes grupos experimentais, observa um aumento no grupo TAA em relação aos grupos CO e Mel e no grupo TAA+Mel ocorre uma diminuição significativa em comparação ao grupo TAA, conforme é possível verificar na figura 3.

Figura 3: Atividade da GST.



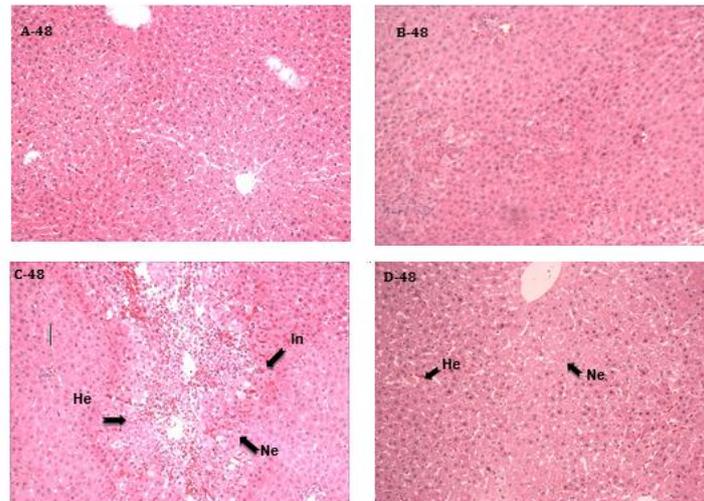
Na análise dos metabólitos do óxido nítrico – nitritos e nitratos – (NO_2/NO_3) é possível observar na figura 4 um aumento significativo no grupo TAA em relação aos grupos CO e Mel ($p < 0,001$) e quando os animais foram tratados com melatonina os níveis reduziram significativamente quando comparado o grupo TAA+Mel com o grupo TAA ($p < 0,001$).

Figura 4: Níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NO_2/NO_3).



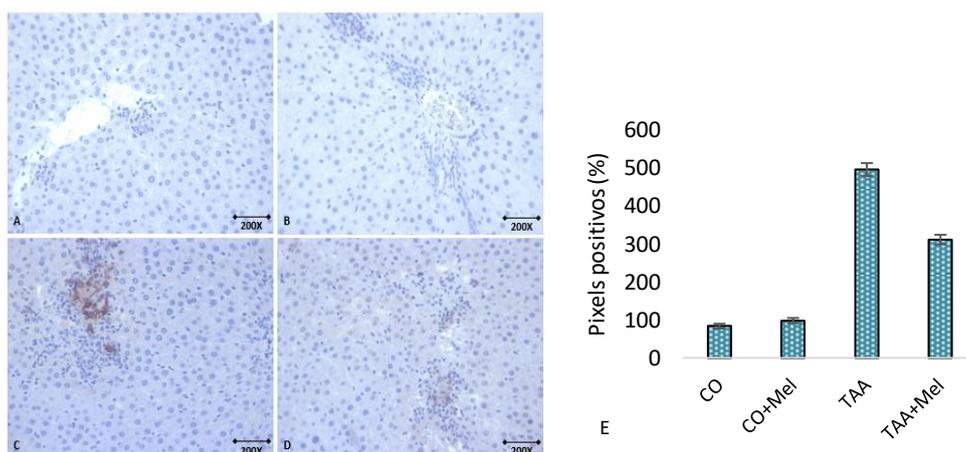
A avaliação histológica do tecido hepático (figura 5) foi realizada através de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina em um aumento de 200x. No tecido hepático de animais dos grupos CO (5-A) e Mel (5-B) é possível observar um parênquima hepático normal, com cordões de hepatócitos bem definidos e núcleos celulares bem corados. Na fotomicrografia de um animal do grupo TAA (5-C) é observado uma destruição do parênquima hepático, presença de necrose (NE), hemorragia (HE) infiltrado inflamatório (IN). Já no fígado de um animal que recebeu a melatonina como tratamento (5-D) é possível observar uma restauração do parênquima hepático com redução do infiltrado inflamatório e necrose.

Figura 5: Fotomicrografia do tecido hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais. Coloração HE. Aumento 200x. (A) Grupo CO, (B) Grupo Mel, (C) Grupo TAA, (D) Grupo TAA+Mel.



Ao avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína iNOS (Figura 6) é possível observar a marcação positiva de pixels (E) quando o resultado do grupo TAA (C) é comparado aos dos grupos CO (A) e CO+Mel (B), $p < 0,001$. Entretanto, registrou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando o resultado do grupo TAA+Mel é comparado ao do grupo TAA (D).

Figura 6: Expressão imunohistoquímica da iNOS. Aumento 200x. (A) grupo CO, (B) grupo Mel, (C) grupo TAA, (D) grupo TAA+Mel, (E) quantificação em % de pixels positivos (* $p < 0,001$).



A IHAG induzida pela TAA ocasionou uma série de lesões do parênquima hepático através dos radicais livres formados agindo sobre a membrana do hepatócito, evidenciado pela enzima de integridade hepática, TBARS e histologia.

A enzima GST detoxificante hepática está aumentada, bem como os metabólitos de óxido nítrico e a INOS.

A melatonina foi capaz de restaurar o parênquima hepático e proteger o fígado do estresse oxidativo através de sua ação antioxidante.

CONCLUSÃO

A melatonina foi capaz de reduzir as concentrações séricas das enzimas relacionadas à integridade hepática; reduzir a lipoperoxidação; diminuir a atividade das enzimas SOD, e GST; diminuir os níveis dos metabólitos do óxido nítrico; restaurar a integridade do tecido hepático e reduzir a expressão do marcador inflamatório iNOS no modelo experimental de IHAG induzida por tioacetamida.

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^{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.
- 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.