



## EFEITOS DA MELATONINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA

Gabriela dos Santos Martins<sup>1</sup>

Fabiano Morais Miguel<sup>2</sup>

Norma Possa Marroni<sup>3</sup>

### Resumo

A Melatonina (MLT) vem sendo muito estudada e citada em diferentes estudos como potente antioxidante. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é o acúmulo excessivo de lipídios nos hepatócitos, sem a presença da ingestão de álcool. O modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) é realizado com dieta deficiente dos aminoácidos metionina e colina (MCD). **Objetivo:** Avaliar o efeito da MLT sobre o tecido hepático em camundongos com EHNA, induzida por dieta MCD. **Métodos:** Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem C57BL6, divididos em quatro grupos: CO, CO+MLT, EHNA, EHNA+MLT. Os animais dos grupos EHNA e EHNA+MLT receberam dieta MCD por 4 semanas. A MLT (20 mg/kg) foi administrada intraperitoneal (I.P) a partir do 15º dia do início do experimento, diariamente, durante 2 semanas. Após foi coletado tecido hepático para análises histológicas e de estresse oxidativo. **Resultados:** Na avaliação da lipoperoxidação, observou-se aumento do grupo EHNA quando comparados aos grupos controles e uma redução no grupo EHNA+MLT. A enzima catalase (CAT) teve um aumento significativo do grupo EHNA em relação aos grupos controle e uma diminuição do grupo EHNA+MLT, já as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), apresentam redução no grupo EHNA com relação aos controles e um aumento no grupo EHNA+MLT. Na análise histológica do fígado pode-se observar uma destruição do parênquima hepático e infiltrado inflamatório. **Conclusão:** A MLT se mostrou eficaz na redução e dos danos oxidativo, bem como das alterações teciduais no fígado.

Palavras chave: Antioxidantes; Esteato-hepatite não alcoólica; estresse oxidativo.

### INTRODUÇÃO

O termo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) compreende um largo espectro de condições associadas ao acúmulo excessivo de lipídios no fígado, variando da esteatose à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), podendo progredir para formas mais graves como fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A EHNA é definida pela presença de

---

1 Aluna do curso de graduação Ciências Biológicas – Bolsista PIBIC/CNPq – gabriela\_martins96@hotmail.com

2 Doutorando do PPG em Biologia molecular e celular aplicada à saúde –ULBRA– profabianomiguel@gmail.com

3 Professora do Curso de odontologia e do PPGBioSaúde – ULBRA– nmarroni@terra.com.br

esteatose hepática e infiltrado inflamatório, com lesão hepatocelular (balonização) com ou sem fibrose (CHALASANI et al., 2012).

O estresse oxidativo (EO) é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes, a favor das oxidantes (SIES; MURPHY, 1991), e parece estar relacionado com as doenças hepáticas.

Atualmente, inúmeros estudos vêm demonstrando as propriedades antioxidantes da Melatonina (MLT) em diferentes modelos experimentais. Dentre seus diversos efeitos atribuídos, podemos salienta sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora (MACCHI; BRUCE, 2004; ROSA et al, 2010; BONA et al., 2012).

A MLT é citada em diferentes estudos como potente antioxidante, atuando na diminuição da formação de radicais livres (REITER et al., 2000). É o principal produto de síntese da glândula pineal, que produz MLT de maneira rítmica, sendo que a sua produção é inibida pela luz, portando, sua síntese ocorre durante a fase escura.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação da MLT sobre os marcadores de EO no fígado e nas alterações histológicas hepáticas em camundongos submetidos à esteato-hepatite não alcoólica.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizados 32 camundongos machos da linhagem C57BL6, com peso médio no início dos experimentos de 15 a 25g, com 8 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPe). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

**CO:** Os camundongos receberam a ração controle (com a adição de metionina e colina).

**CO+MLT:** Os camundongos receberam a ração controle (com adição de metionina e colina). Nas duas últimas semanas receberam além da ração, uma dose diária de 20 mg/kg intraperitoneal (IP) de MLT.

**EHNA:** Os camundongos receberam a dieta MCD nas quatro semanas do experimento.

**EHNA+MLT:** Os camundongos receberam a dieta MCD nas quatro semanas do experimento. Nas duas últimas semanas receberam além da ração, uma dose diária de 20 mg/kg (IP) de MLT.

A indução da EHNA foi realizada através da oferta *ad libitum* da ração MCD durante 4 semanas. Os animais dos grupos controle receberam a mesma ração, porém com a inclusão de metionina e colina nas concentrações descritas em sua composição.

O tratamento com MLT iniciou a partir do 15º dia diariamente, durante 2 semanas. A dose da MLT foi 20 mg/kg de peso corporal, e preparada utilizando etanol 1% em NaCl 0,9% (GRIGOROV et al., 2014).

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados, e após foi retirado o tecido hepático para análise histológica, avaliação da lipoperoxidação por TBARS e atividades das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguido do teste *Student-Newman-Keuls* para múltiplas comparações e foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal conforme estabelecido pela Legislação Brasileira (Lei 11.794/2008). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA), da ULBRA (protocolo 2015 – 4P).

## RESULTADOS

Na tabela 1, são demonstrados os valores das enzimas antioxidantes onde observamos na CAT um aumento significativo no grupo EHNA com relação aos grupos controles, e uma diminuição significativa destes valores no grupo EHNA+MLT. As enzimas SOD E GPx tiveram uma diminuição significativa do grupo EHNA em relação aos controles e um aumento no grupo EHNA+MLT.

Tabela 1: Valores das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), nos diferentes grupos experimentais.

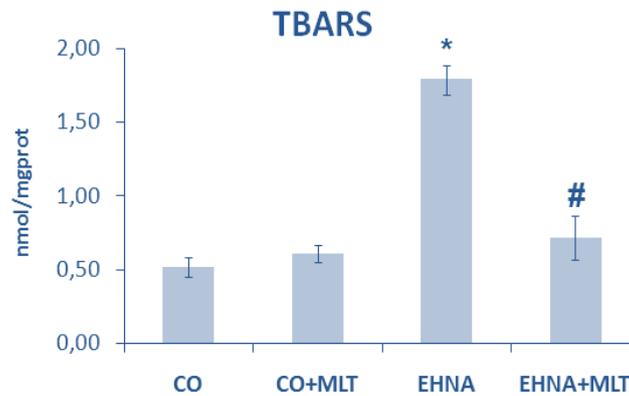
Grupos	CAT (µmol/mg Prot)	SOD (USOD/mg Prot)	GPx (nmol/mg Prot)
CO	4,27 ± 0,69	8,11 ± 1,06	11,092 ± 1,26
CO+MLT	4,51 ± 0,96	7,11 ± 0,60	11,88 ± 1,64
EHNA	7,55 ± 0,40*	4,13 ± 0,64*	6,44 ± 0,35*
EHNA+MLT	4,56 ± 0,90#	6,33 ± 0,38#	8,49 ± 1,19#

\* Diferença significativa entre o grupo EHNA x CO / CO+MLT ( $p < 0,001$ ).

# Diferença significativa entre o grupo EHNA+MLT x EHNA ( $p < 0,001$ ).

Na análise da lipoperoxidação, observou-se um maior dano no grupo EHNA quando comparado aos grupos controles, e uma diminuição significativa do dano nos animais do grupo EHNA+MLT.

Figura 1: Avaliação da lipoperoxidação pela técnica de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). nmol/mg Prot.

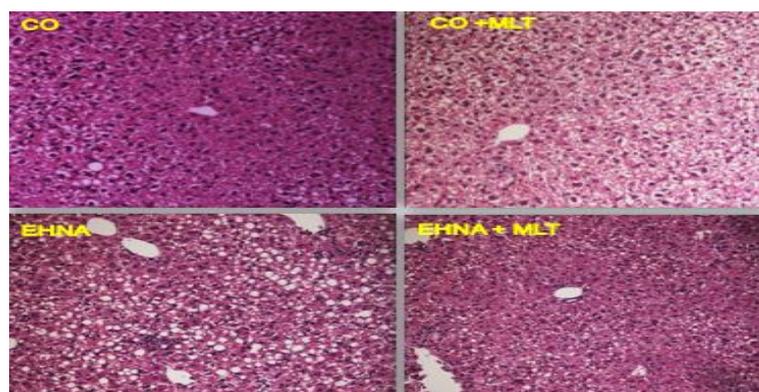


\* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+MLT ( $p < 0,001$ ).

# Diminuição significativa em relação ao grupo EHNA ( $p < 0,001$ )

Na análise histológica hepática (figura 2) pela coloração de eosina e hematoxilina (HE) nos diferentes grupos avaliados, observou-se que os grupos CO e CO+MLT apresentaram uma arquitetura normal do fígado. No grupo EHNA evidenciou-se uma destruição do parênquima hepático, acúmulo de lipídeos e infiltrado inflamatório. O uso da MLT no grupo EHNA+MLT restaurou o parênquima hepático, se assemelhando aos controles.

Figura 2: Fotomicrografia do tecido hepático (HE) em aumento de 200X



## CONCLUSÃO

A MLT se mostrou eficaz na redução dos danos oxidativos, bem como nas alterações teciduais do fígado, evidenciado pela reorganização do parênquima hepático e diminuição do infiltrado inflamatório. A MLT parece ser eficaz no tratamento de EHNA no modelo experimental em camundongos.

## REFERÊNCIAS

BONA, S. et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **ISRN Gastroenterology**, Article ID 7629202012, 2012

CHALASANI, N; YOUNOSSI, Z; LAVINE, JE; et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-23, 2012.

GRIGOROV, I. et al. Hepatoprotective effects of Melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 441-50, 2014.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 25, n.3, p.177-95, 2004.

REITER, R.J. et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.917, p.376-86, 2000.

ROSA, D.P.D. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.47, n.1, p.72-8, 2010.

SIES, H.; MURPHY, M.E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**. v.8, n.2, p.211-8, 1991.