



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

Tayná O Mendes^{1,2}

Josieli R Colares^{1,2,3}

Elizângela G Schemitt^{1,2,4}

Renata M Rartmann^{1,2,4}

Francielli Licks^{1,2,4}

Mariana C Soares^{1,2,4}

Norma P Marroni^{1,2,3,4}

¹Laboratório de estresse oxidativo e antioxidante – ULBRA

²Laboratório de hepatologia e gastroenterologia experimental –HCPA

³PPGBioSaúde - ULBRA

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Resumo

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia 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), glutationa peroxidase (GPx), glutationa total (GSH), glutationa-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 apresentara-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).

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.

Ao longo do experimento os animais foram avaliados quando ao ganho de peso e submetidos à avaliação do ângulo de fase a partir da técnica de bioimpedância elétrica (BIA) no primeiro e último dia de experimento.

O fígado e o baço foram coletados, sendo estes pesados para realização das relações hepatossomática (RHS) e esplenossomática (RES) após, uma porção do fígado foi armazenada em formol para análise histológica e o restante armazenado em *freezer* a -80°C para posteriores análises.

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

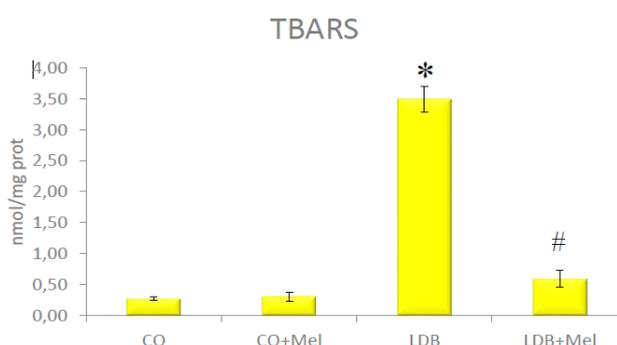
Os estudos obedeceram à Legislação Brasileira e do Código Estadual de Proteção aos Animais, (Lei 11.794/2008), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática.

Os animais foram provenientes e mantidos no Biotério da ULBRA de Canoas, mediante aprovação do projeto de número 2015-2P. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas de 30cmx20cmx12cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18°C e 22°C. A água e a ração foram administradas *ad libitum*.

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

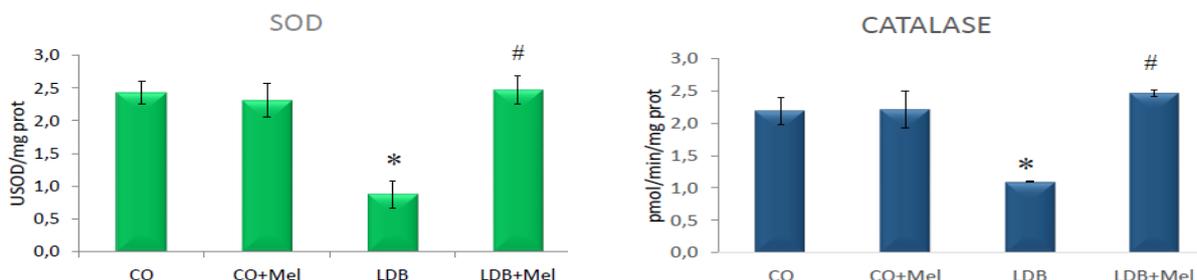


* Aumento significativo em relação aos grupos CO e CO+Mel.

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

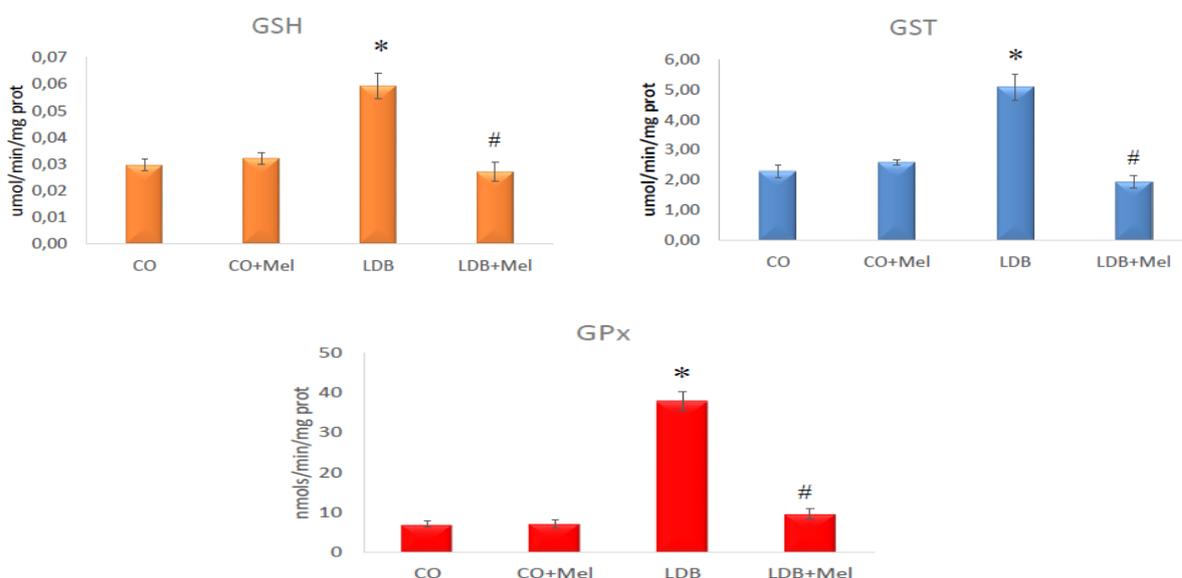


* Diminuição significativa em relação aos grupos CO e CO+Mel.

Aumento significativo com relação ao grupo LDB.

Quando avaliadas as enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona (GSH) e glutathiona 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



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

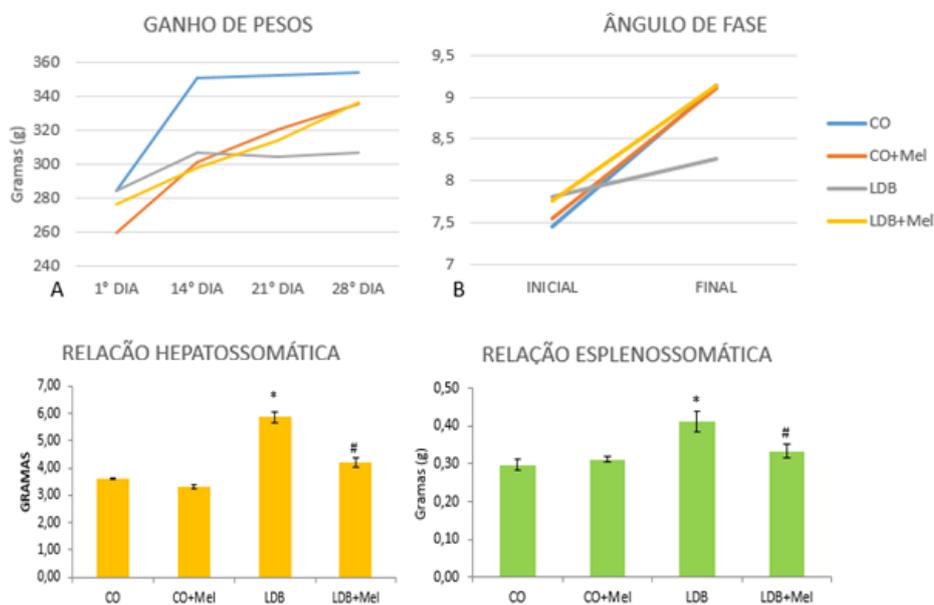
Diminuição significativa com relação ao grupo LDB.

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.

Na avaliação por BIA observamos um maior ângulo de fase aumentado nos grupos CO, CO+Mel e LDB+Mel, já o grupo LDB apresentou um aumento de apenas 5,9% ao longo do experimento.

Com relação as avaliações RHS e RES pode-se observar um aumento significativo destas no grupo LDB quando comparados aos grupos controles (CO e CO+Mel) bem como, uma diminuição significativa no grupo LDB+Mel em comparação com o grupo cirrótico (LDB).

Figura 4: Ganho de peso, Ângulo de fase, RHE e RES



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

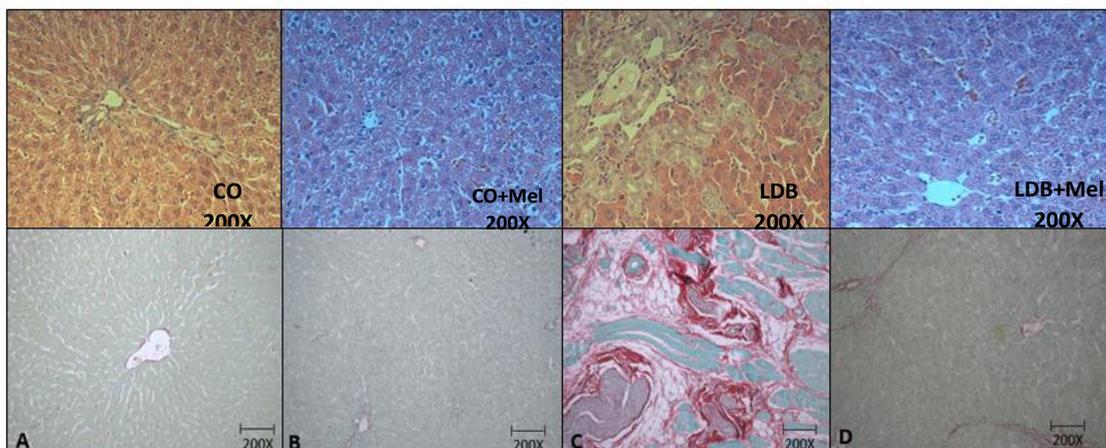
Diminuição significativa com relação ao grupo LDB.

Na análise histológica dos diferentes grupos avaliados, se observou a partir de coloração por hematoxilina e eosina (HE) que os grupos CO e CO+Mel apresentam uma arquitetura normal do fígado. No grupo LDB se evidencia uma destruição do parênquima hepático com e no grupo LDB+Mel se

observa uma restauração do parênquima hepático, aproximando-se da estrutura dos grupos CO e CO+Mel.

Na avaliação da fibrose hepática a partir da coloração por picrossírius pode-se observar um parênquima hepático normal nos grupos controles, sem presença de septos fibróticos. Nos animais submetidos a LDB se observa uma perda da arquitetura hepática com presença de fibrose, em contraste, a fibrose foi mínima nos animais do grupo LDB+Mel.

Figura 5: Análise por HE e picrossírius dos diferentes grupos



CONCLUSÕES

O modelo de LDB reflete os sinais clínicos da cirrose biliar secundária em pacientes, sendo desta forma eficaz para o estudo de alterações decorrentes da doença e possibilitando sua utilização para o estudo de possíveis AOX que possam minimizar estas alterações aumentando assim a qualidade de vida dos pacientes.

A Mel demonstrou-se 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.)*. 2007a; 231(6): 827.

Cui P, Yu M, Peng X, 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. *J Pineal Res*. 2012; 52(2): 236-43.

Grigorov I, Bogojevic D, Jovanovic S, et al. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2014.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, et al. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arquivos de gastroenterologia*. 2005; 42(4): 244-8.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *British journal of experimental pathology*. 1984; 65(3): 305.

Muriel P, Suárez OR, González PM, et al. Protective effect of Sadenosylmethionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical study. *J Hepatol*. 1994;21: 95-102.

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*. 2000; 126(2): 105-11.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 917: 376-86.

Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B*. 1991;8(2): 211-8.

Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, et al. S-nitroso-N-acetilcisteína atenua a fibrose hepática em ratos cirróticos. *Journal of Molecular Medicine*. 2010; 88(4): 401-11.