

MARILDA DA SILVA BRASIL

**A MELATONINA REVERTE OS DANOS NO FÍGADO E NO DNA INDUZIDOS  
POR DIETILNITROSAMINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Possa Marroni

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Brasil, Marilda da Silva  
A MELATONINA REVERTE OS DANOS NO FÍGADO E NO DNA  
INDUZIDOS POR DIETILNITROSAMINA EM RATOS / Marilda da  
Silva Brasil. -- 2022.  
90 f.  
Orientador: Norma Anair Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Cirrose. 2. Melatonina. 3. Dietilnitrosamina. 4.  
Estresse Oxidativo. 5. Danos ao DNA. I. Marroni, Norma  
Anair Possa, orient. II. Título.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis!

*Fernando Pessoa*

## **Dedicatória**

Luís Josino, meu amor querido,  
meu companheiro e amigo. Este  
é o resultado da minha  
dissertação de mestrado.  
Obrigada por acreditar em mim,  
sem tua presença, teu incentivo e  
tua ajuda, não teria sido possível.

## AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização da minha dissertação de mestrado, meu muito obrigada. Em especial:

À minha amada filha Luísa, que despertou em mim um sentimento único que é o amor de mãe, um propósito e um desejo de me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Você é o meu orgulho. Te amo muito mais do que possas imaginar!

Aos meus pais, José Bertolino Oliveira da Silva e Marilene Belem da Silva, pelo exemplo de dedicação e por terem me ensinado o valor da educação.

Ao meu tio amado, Alfredo Santos Dias de Oliveira (*in memoriam*), uma das pessoas mais generosas que conheci, pelo exemplo de retidão, fé e amor incondicional.

À Sandielly Fonseca Benitez, pelo acolhimento quando cheguei ao laboratório, pela disponibilidade e pela paciência para me atualizar da rotina de trabalho. Houve momentos de silêncio, quando era hora de trabalhar, e houve preciosos momentos de convivência, na saída do laboratório, quando compartilhamos boas risadas e conversas descontraídas. Esses momentos, consolidaram a certeza de que você é uma pessoa generosa, comprometida e correta. Foi um privilégio tê-la conhecido nessa trajetória.

À Dra. Elizângela G. Schemitt e à Dra. Silvia Bona pelas preciosas opiniões e conhecimentos compartilhados, os quais foram fundamentais na concretização desse estudo.

Ao prof. Luís Josino Brasil, meu marido, pelas inúmeras revisões dos materiais, pelas sugestões e explicações sempre oportunas. Também, como marido, por sempre me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, pela paciência e compreensão nos momentos em que necessitei ausentar-me da convivência familiar mesmo em meio a uma pandemia.

Às minhas colegas e aos colaboradores do Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação – HCPA, Aline Felício, Gabriela Martins e Millena Engeroff, pelo carinho, pela convivência e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Ao Laboratório de Genética Toxicológica da ULBRA, na pessoa da Dra. Jaqueline Nascimento Picada, pela parceria na realização das técnicas para avaliar os danos ao DNA (micronúcleos e cometas).

Ao prof. Cláudio Augusto Marroni, pelo apoio científico, pela disponibilidade, pelo incentivo e pela revisão desta pesquisa.

À querida professora, amiga e orientadora Norma Possa Marroni, pela oportunidade profissional que me proporcionou no caminho de pesquisadora. A elaboração do mestrado aconteceu graças a sua presença constante, sempre incentivando, apoiando e criticando, e graças à sua permanente boa vontade e energia mantida, tarefa difícil durante a pandemia com a perda sofrida de pessoas amadas. Foram dois anos e meio de convivência, em sua maior parte a distância. Espero ter a oportunidade de desfrutar mais de sua companhia presencial nos próximos anos. A senhora me proporcionou ensinamentos recheados pelas experiências vividas, contagiando o ambiente de trabalho com sua competência, dedicação e paixão pelo que faz. Professora, certamente levarei para minha vida seu exemplo de mulher, mãe, esposa, amiga e professora, que não tem medo de “arregaçar” as mangas e trabalhar junto proporcionando inspiração para a formação de pesquisadores comprometidos.

Às agências financiadoras, CAPES e FIPE/HCPA que fomentaram esta dissertação, sendo possível realizar todas as análises previstas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela excelente base científica, a qual contribuiu para a minha formação acadêmica.

## RESUMO

A cirrose apresenta prevalência crescente e alta mortalidade em nosso meio e representa a fase final comum das lesões hepáticas crônicas. Essa doença é caracterizada pela presença de fibrose e formação nodular difusa com perda da arquitetura hepática e grave alteração funcional sistêmica. A dietilnitrosamina (DEN) é um agente hepatotóxico capaz de produzir cirrose com padrão histológico similar ao da cirrose em humanos por meio da produção de espécies reativas de oxigênio. Existem evidências crescentes, na literatura, que consolidam a melatonina (MLT) como um potente antioxidante. Esse hormônio é capaz de interagir com o complexo transportador de elétrons na cadeia respiratória, aceitando ou doando elétrons e inibindo a lipoperoxidação (LPO). Este estudo teve como objetivo investigar a ação da MLT sobre o estresse oxidativo (EO), o processo inflamatório e fibrogênico e o dano ao DNA no modelo experimental de cirrose induzido por DEN. Foram utilizados 32 ratos machos *Wistar* com peso aproximado de 180g, os quais foram submetidos ao modelo experimental de cirrose hepática induzida por DEN e divididos em quatro grupos: 1) Controle (CO); 2) Controle+Melatonina (CO+MLT); 3) Dietilnitrosamina (DEN); 4) Dietilnitrosamina+Melatonina (DEN+MLT). Foi administrada DEN 50 mg/kg de peso do animal por via i.p. (intraperitoneal), duas vezes por semana, durante sete semanas, nos grupos DEN e DEN+MLT. A MLT foi administrada por via i.p. na dose de 20 mg/Kg diariamente a partir da quinta semana de experimento até a sétima semana nos grupos CO+MLT e DEN+MLT sempre às 19 horas, ao abrigo da luz. Foi monitorado o ganho de peso durante o experimento. Ao término da sétima semana, após um jejum de 12h, os animais foram anestesiados. A seguir, foi realizada a remoção do fígado, o qual foi pesado e avaliado em seus aspectos anatômicos. A coleta de sangue em torno de 3 ml foi feita por meio de punção cardíaca, sendo a amostra transferida imediatamente para um frasco devidamente preparado para análises séricas posteriores. O tecido hepático foi dissecado para as análises histológica, bioquímica e molecular. Por fim, os animais foram eutanasiados por exsanguinação. As análises histológicas foram realizadas por meio da coloração hematoxilina e Eosina (HE) e Picosirius. O sangue coletado foi utilizado para análise das

enzimas de integridade hepática: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA). O homogeneizado de tecido foi utilizado para análise de EO por meio da técnica de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As análises moleculares das proteínas a seguir foram feitas por Western Blot: superóxido dismutase (SOD), alfa actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de transcrição nuclear Kappa B/porção 65 (NF $\kappa$ B/p65). Finalmente, os danos ao DNA foram analisados por meio do ensaio cometa (EC) e do teste de micronúcleos (MN). O modelo de cirrose hepática induzida por DEN foi eficaz em produzir as lesões hepáticas, e a MLT mostrou-se capaz de restaurar as provas de integridade hepática (ALT, AST e FA) para os níveis semelhantes ao do grupo CO. A MLT também restaurou o parênquima hepático diminuindo, a fibrose hepática e, conseqüentemente, os nódulos instalados o que ficou evidenciado pela diminuição na expressão de  $\alpha$ -SMA. A MLT também diminuiu a LPO e aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD. Observou-se diminuição do processo inflamatório evidenciada pela queda nos níveis de iNOS e NF $\kappa$ B/p65, e diminuição dos danos ao DNA, evidenciada pela técnica de EC. Os resultados sugerem que a MLT tem uma potente ação antioxidante e anti-inflamatória, podendo ser considerada, no futuro, como uma nova alternativa terapêutica.

**Palavras-chave:** cirrose, dietilnitrosamina, melatonina, estresse oxidativo, inflamação, danos ao DNA.

## ABSTRACT

Cirrhosis presents increasing prevalence and high mortality in our environment and represents the common final stage of chronic liver injury. This disease is characterized by the presence of fibrosis and diffuse nodular formation with loss of liver architecture and severe systemic functional alteration. Diethylnitrosamine (DEN) is a hepatotoxic agent capable of producing cirrhosis with a histological pattern similar to that of cirrhosis in humans through the production of reactive oxygen species. There is growing evidence in the literature that consolidates melatonin (MLT) as a potent antioxidant. This hormone is able to interact with the electron transporter complex in the respiratory chain, accepting or donating electrons and inhibiting lipid peroxidation (LPO). This study aimed to investigate the action of MLT on oxidative stress (OE), inflammatory and fibrogenic process, and DNA damage in the experimental model of cirrhosis induced by DEN. We used 32 male Wistar rats weighing approximately 180g which were subjected to the experimental model of liver cirrhosis induced by DEN and divided into four groups: 1) Control (CO); 2) Control+Melatonin (CO+MLT); 3) Diethylnitrosamine (DEN); 4) Diethylnitrosamine+Melatonin (DEN+MLT). DEN was administered 50 mg/kg of animal weight via i.p., twice a week, for seven weeks, in the DEN and DEN+MLT groups. MLT was administered i.p. at a dose of 20 mg/Kg daily from the fifth week of the experiment until the seventh week in the CO+MLT and DEN+MLT groups, always at 7 pm, protected from light. Weight gain was monitored during the experiment. At the end of the seventh week, after a 12 h fast, the animals were anesthetized. Then, the liver was removed, weighed, and its anatomical aspects were evaluated. A blood sample of about 3ml was collected by cardiac puncture and the sample was immediately transferred into a flask properly prepared for further serum analysis. The liver tissue was dissected for histological, biochemical, and molecular analyses. Finally, the animals were euthanized by exsanguination. Histological analyses were performed by Hematoxylin and Eosin (HE) and Picrosirius staining. The collected blood was used for the analysis of liver integrity enzymes: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (AP). The tissue homogenate was used for oxidative stress (OS) using the thiobarbituric acid-

reacting substances technique (TBARS). Molecular analyses of the following proteins were done by western Blot: superoxide dismutase (SOD), smooth muscle alpha-actin ( $\alpha$ -SMA), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nuclear transcription factor Kappa B/portion 65 (NFB/p65). Finally, DNA damage was analyzed using the comet assay (CA) and the micronucleus test (MN). The DEN-induced liver cirrhosis model was effective in producing the liver lesions, and MLT was shown to restore the liver integrity tests (ALT, AST, and AP) to levels similar to that of the CO group. MLT also restored the liver parenchyma by decreasing liver fibrosis and consequently the nodules installed which was evidenced by the decrease in  $\alpha$ -SMA. MLT also decreased lipoperoxidation and increased the activity of the antioxidant enzyme SOD. It was observed a decrease in the inflammatory process, evidenced by a decrease in iNOS and NF $\kappa$ B/p65 levels, and a decrease in DNA damage, evidenced by the CA technique. The results suggest that MLT has a potent antioxidant and anti-inflammatory action, and may be considered a new therapeutic alternative in the future.

**Keywords:** cirrhosis, diethylnitrosamine, melatonin, oxidative stress, inflammation, DNA damage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do fígado normal. ....	20
Figura 2 - Lóbulo hepático.....	22
Figura 3 - Arquitetura sinusoidal e células que compõem o fígado normal.. ....	23
Figura 4 - Miofibroblastos hepáticos.....	25
Figura 5 - Vias de eliminação das CEHs.....	26
Figura 6 - Alterações celulares na cirrose hepática.....	28
Figura 7 - Fórmula estrutural.....	30
Figura 8 - Biotransformação da DEN.....	31
Figura 9 - Representação do estresse oxidativo.....	33
Figura 10 - Fontes de radicais livres.....	34
Figura 11 - Formação de espécies reativas de oxigênio e radical livre.....	35
Figura 12 - Reação de Fenton e reação de Haber-Weiss.....	36
Figura 13 - Etapas da LPO.....	37
Figura 14 - Metabolismo do NO.....	39
Figura 15 - Ativação de NFκB/p65.....	40
Figura 16 - Diferentes classes de danos celulares.....	42
Figura 17 - Fonte de ERO e antioxidantes.....	44
Figura 18 - Sistema antioxidante enzimático.....	45
Figura 19 - Molécula de melatonina: características químicas.....	46
Figura 20 - Controle, síntese e secreção da MLT.....	47
Figura 21 - Delineamento experimental.....	52
Figura 22 - Avaliação do ganho de peso.....	59
Figura 23 - Análise histológica do tecido hepático - HE.....	60
Figura 24 - Análise histológica do tecido hepático - Picrosirius.....	61
Figura 25 - Avaliação da LPO.....	62
Figura 26 - Efeitos da administração de DEN na expressão da enzima SOD..	63
Figura 27 - Análise por Western Blot da α-SMA.....	64
Figura 28 - Análise por Western Blot da iNOS.....	65
Figura 29 - Análise por Western Blot do NFκB/p65.....	66
Figura 30 - Avaliação de danos ao DNA – Ensaio cometa.....	67
Figura 31 - Análise de danos ao DNA - Teste de micronúcleos.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas ERO biologicamente importantes.....	36
Tabela 2 - <i>Score</i> indicando o grau de lesão presente nas lâminas histológicas .....	54
Tabela 3 - Níveis plasmáticos das enzimas de integridade hepática nos diferentes grupos experimentais. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu$ l	Microlitro
ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
AOX	Antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CEHs	Células estreladas hepáticas
CO	Controle
Cu <sup>+</sup>	Íon cobre
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Ensaio cometa
ENC	Eritrócitos normocromáticos
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
EPC	Eritrócitos policromáticos
FA	Fosfatase alcalina
FD	Frequência de danos
GAPD	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
g/L	Gramas por litro
g/mol	Gramas por mol
HE	Hematoxilina e Eosina
CEHs	Células estreladas hepáticas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ID	Índice de danos
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
LPO	Lipoperoxidação
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MLT	Melatonina
MN	Micronúcleos
mM	Milimol
MSCs	Células tronco mesenquimais
NaCl	Cloreto de sódio (soro fisiológico)
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NF $\kappa$ B/p65	Fator de transcrição nuclear Kappa B/porção 65

Nm	Nanômetro
Nmol/ml	Nanomol/ml
nNOS	Óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOCs	Composto N-nitroso
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlet
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxil
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OXI	Oxidante
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
RL	Radical livre
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TAA	Tiocetamida
U/L	Unidades por litro
α-SMA	Alfa actina do músculo liso

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
1.1 FÍGADO .....	20
1.1.1 Fibrose hepática .....	24
1.1.2 Cirrose .....	27
1.1.3 Modelo experimental de indução de cirrose .....	29
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO .....	32
1.2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio .....	33
1.2.2 Lipoperoxidação .....	36
1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	37
1.3.1 Óxido Nítrico .....	38
1.3.2 Fator de transcrição nuclear kappa B .....	39
1.4 DANOS AO DNA.....	41
1.5 ANTIOXIDANTES .....	43
1.5.1 Antioxidantes enzimáticos .....	44
1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos .....	45
1.6 MELATONINA.....	46
<b>2 OBJETIVOS DO ESTUDO</b> .....	<b>49</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	50
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	50
3.2.1 Considerações éticas.....	50
3.2.2 Animais e cálculo amostral .....	50
3.2.3 Grupos experimentais.....	51
3.2.4 Procedimentos experimentais.....	51
3.2.4.1 Peso dos animais.....	51
3.2.4.2 Administração da melatonina.....	51
3.2.4.3 Desenvolvimento do modelo experimental .....	52
3.2.4.4 Morte dos animais e obtenção das amostras .....	53
3.3 ANÁLISES .....	53
3.3.1 Avaliações histológicas.....	53
3.3.2 Avaliações bioquímicas .....	54
3.3.2.1 Enzimas de integridade hepática.....	54
3.3.2.2 Preparação do homogeneizado .....	54
3.3.2.3 Quantificação de proteínas .....	55

3.3.2.4 Técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	55
3.3.3 Avaliações moleculares .....	56
3.3.3.1 Western Blot .....	56
3.3.4 Danos ao DNA .....	56
3.3.4.1 Ensaio cometa .....	56
3.3.4.2 Teste de Micronúcleos .....	57
3.3.5 Análise Estatística .....	58
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
4.1 PESO DOS ANIMAIS .....	59
4.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS .....	59
4.3 ENZIMAS DE INTEGRIDADE HEPÁTICA .....	61
4.4 AVALIAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO POR TBARS .....	62
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA ENZIMA ANTIOXIDANTE SOD .....	63
4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA A-SMA .....	63
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA iNOS .....	64
4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO NF $\kappa$ B/P65 .....	65
4.9 ENSAIO COMETA .....	66
4.10 TESTE DE MICRONÚCLEOS .....	67
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>76</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>10 ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão fundamental na homeostase corporal. Ele desempenha funções imunológicas, regula o metabolismo, gera produtos e nutrientes utilizados sistemicamente, armazena proteínas, ferro e é responsável pela inativação de drogas e toxinas. Assim, seu adequado funcionamento é essencial para a vida (Rosa *et al.*, 2021; Ramachandran *et al.*, 2020).

A cirrose altera a fisiologia hepática, desencadeando complicações orgânicas com alta mortalidade. Essa doença representa a via final de muitas doenças hepáticas e, infelizmente, apresenta prevalência crescente no Brasil e no mundo. Essa doença tem característica crônica, com formação nodular fibrótica difusa e perda da arquitetura hepática, provocando grave alteração morfofuncional do fígado. As doenças hepáticas crônicas ocorrem com destruição progressiva do parênquima hepático e acúmulo da matriz extracelular (MEC) (Colares *et al.*, 2016).

O EO foi avaliado em diversos modelos experimentais. Ele atua como determinante na fisiopatologia das doenças hepáticas devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), oxidação de proteínas, lipoperoxidação (LPO) e dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (Brasil *et al.*, 2007; Schemitt *et al.*, 2016; Souza, 2021; Colares *et al.*, 2022). O fígado sofre lesão oxidativa por meio do aumento das ERO, o que leva a um processo inflamatório. O fator de transcrição nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B), por sua porção p65 (Proteína Rel A classe II família NF $\kappa$ B), é um importante sinalizador da resposta inflamatória. Quando ativado, estimula a expressão de genes de moléculas de adesão e de mediadores inflamatórios (Moreira *et al.*, 2017). O aumento da síntese de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), especialmente a induzível (iNOS), amplifica o processo inflamatório hepático. A produção excessiva de iNOS pode levar a uma resposta tóxica maciça, implicando em uma série de processos destrutivos teciduais agudos ou crônicos (Schemitt *et al.*, 2019). O aumento mantido das ERO e da inflamação provoca fibrogênese excessiva e incapacidade de promover sua degradação, resultando em demasiada fibrose, que pode evoluir para cirrose hepática. A  $\alpha$ -SMA é um marcador que indica a ativação das células estreladas hepáticas (CEHs) promotoras de fibrose. (Bona

*et al.*, 2018). O EO também pode influenciar na ativação de CEHs causando danos ao DNA. O EC é um método que detecta várias formas de danos primários ao DNA, como quebras de fita simples e dupla, lesões álcali-lábeis, dano oxidativo à base do DNA e ligações cruzadas. Esse ensaio tem sido amplamente aplicado como o primeiro parâmetro para avaliar a genotoxicidade em células eucarióticas (Bolognesi *et al.*, 2004; Villela *et al.*, 2006). O teste de micronúcleo (MN) está entre os biomarcadores amplamente estudados para avaliar danos ao DNA e instabilidade cromossômica em humanos (Fenech *et al.*, 2020; Miguel *et al.*, 2022).

Neste estudo, utilizamos um modelo experimental de cirrose induzida por DEN em ratos. A DEN é um agente hepatotóxico que induz a produção de ERO, ocasionando EO, apoptose e necrose com padrão histológico semelhante ao da cirrose em humanos. O modelo induz alterações celulares em apenas sete semanas, fato que acrescenta aspectos éticos e econômicos desejáveis ao estudo (Bingül *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2017).

A primeira etapa da bioativação da DEN é a  $\alpha$ -hidroxilação mediada pelo Citocromo P450, produzindo  $\alpha$ -hidroxilnitrosamina. A DEN é hidrolisada em nitrosamina, gerando o radical etila, responsável por aumento do EO (Verna, Whysner e Williams, 1996).

O EO desempenha papel central na patogênese e na progressão de doenças crônicas como a cirrose (Fernandes *et al.*, 2016; Marroni *et al.*, 2016). Quando os radicais livres (RL) e as ERO encontram-se em concentrações excessivas, podem causar reações de LPO, danos em proteínas e danos ao DNA. A SOD faz parte do sistema antioxidante enzimático. Ela desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo e catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (Moreira *et al.*, 2017). Os antioxidantes (AOX) têm sido usados no tratamento dos danos hepáticos e sistêmicos provocados pela cirrose (Colares *et al.*, 2016).

Em função do que foi explanado até aqui, fica evidente a importância da pesquisa de novos tratamentos que impeçam a progressão da cirrose e proporcionem maior qualidade e expectativa de vida aos pacientes (Ramachandran *et al.*, 2020).

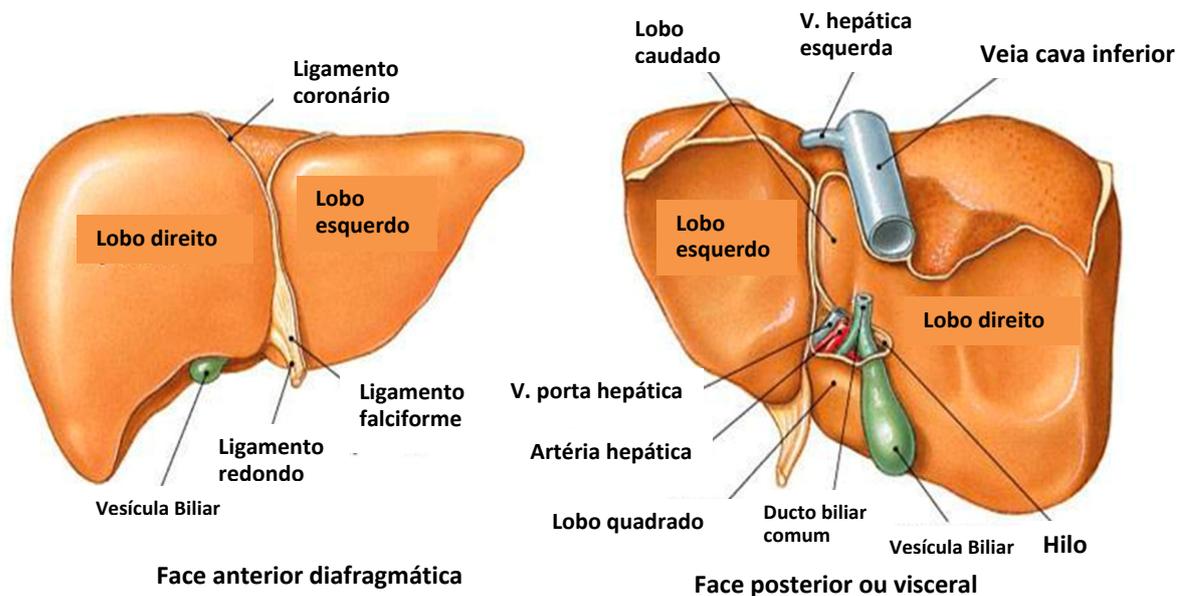
A MLT é uma molécula sintetizada a partir da serotonina, derivada do aminoácido triptofano e amplamente produzida e distribuída no organismo. Ela apresenta múltiplas funções, atuando, virtualmente, em todos os órgãos e sistemas. Atualmente, é considerada um potente AOX, modulando os parâmetros de EO, angiogênese, fibrose e inflamação no fígado (Bona *et al.*, 2018).

Tendo em vista inúmeros trabalhos experimentais realizados pelo grupo pretendemos com esse estudo investigar a ação da MLT na modulação da homeostase redox celular e os processos inflamatórios, fibrogênico e de dano ao DNA, utilizando o modelo experimental de cirrose hepática induzida por DEN.

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 FÍGADO

O fígado é o maior órgão interno, pesando em torno de 1,5 kg no adulto. Situa-se logo abaixo do diafragma, no quadrante superior direito da cavidade abdominal. Está envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, mais espessa na região do hilo, por onde entra a artéria hepática e a veia porta e por onde saem os vasos linfáticos e os ductos biliares (Guyton e Hall, 2016, p. 2550). Morfologicamente, o fígado é formado por quatro lobos, sendo o lobo o direito e o lobo esquerdo os dois grandes lobos principais (Figura 1). Os lobos hepáticos se dividem em estruturas ainda menores chamadas de lóbulos hepáticos (Figura 2), que apresentam uma estrutura hexagonal com alguns milímetros de comprimento e 0,8 a 2 milímetros de diâmetro e que são as unidades funcionais básicas do fígado (Coelho, 2012; Guyton e Hall, 2016, p. 2551 e 2552).



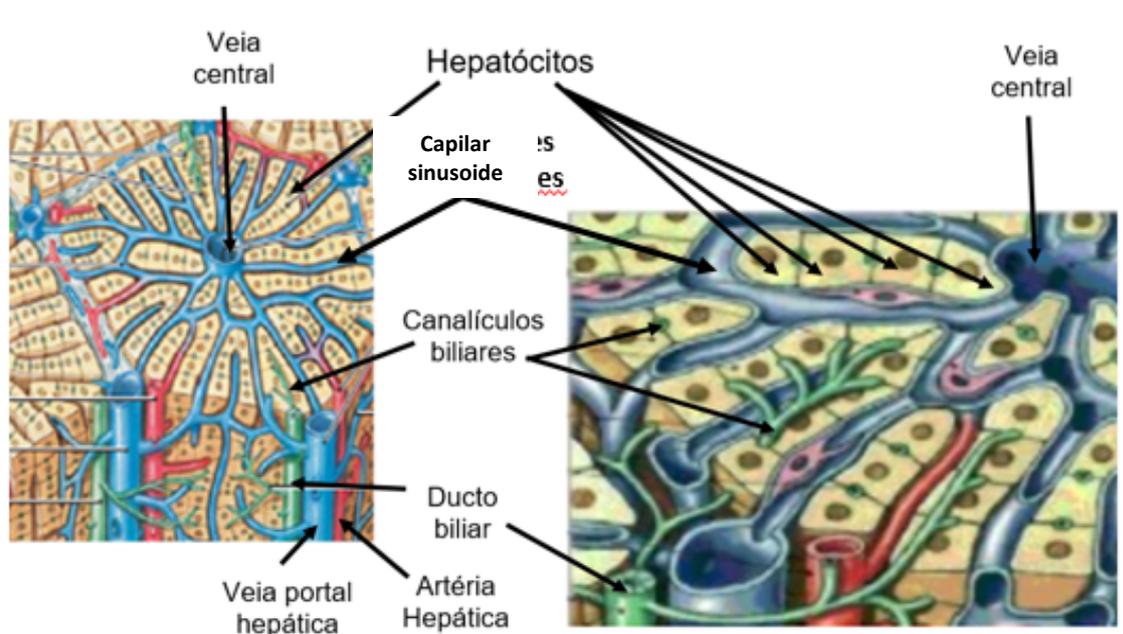
**Figura 1** - Anatomia do fígado normal.  
Fonte: Adaptada de Badiani, 2016.

O lóbulo hepático é constituído por células epiteliais, ou hepatócitos, que compreendem 60% do tecido hepático e que se dispõem enfileiradas em placas orientadas radialmente e arranjadas na forma hexagonal em torno de uma veia central que drena para as veias hepáticas e, em seguida, para a veia cava. Em geral, cada placa hepática, tem a espessura de duas células e, entre as células

adjacentes, situam-se os canalículos biliares, pelos quais a bile é secretada pelo fígado. Na periferia do lóbulo encontramos o trato portal (espaço porta) contendo o ducto biliar e ramos da veia porta e da artéria hepática (Guyton & Hall, 2016, p. 2551). Os hepatócitos duram cerca de 150 dias e têm grande capacidade de regeneração (Gardner, 1988).

O fígado está estrategicamente localizado, recebendo suprimento sanguíneo duplo: arterial, da artéria hepática, que representa 20% da sua perfusão; e sangue venoso, da veia porta, que representa 80% da perfusão hepática. Esse sangue venoso é proveniente do trato digestivo e é rico em nutrientes, hormônios pancreáticos e produtos da degradação da hemoglobina. (Coelho, 2012; Silverthorn, 2017).

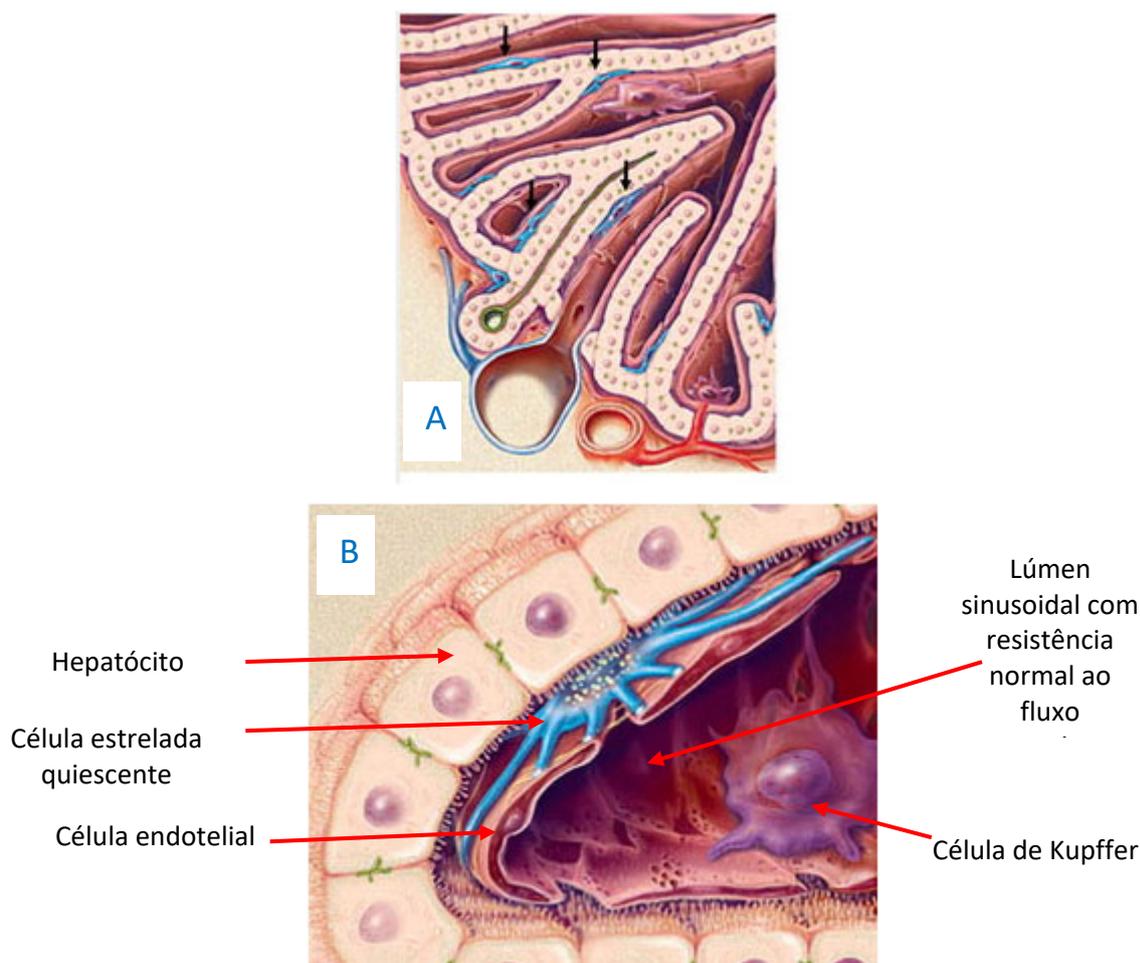
A confluência das veias esplênica e mesentérica superior forma a veia porta, que entra no hilo hepático e se divide em ramos direito e esquerdo no interior do fígado. Esse leito vascular venoso se dicotomiza em vasos menores, capilares, onde o sangue arterial se mistura ao venoso e desemboca no leito sinusoidal, estrutura formada pela justaposição de células endoteliais, fenestradas, por onde flui o sangue. Os sinusoides situam-se paralelamente aos cordões de hepatócitos, separados pelo espaço de Disse. Os sinusoides são fundamentais, pois pelas suas fenestrações ocorrem as trocas metabólicas entre o sangue e o hepatócito, com a transferência de nutrientes, oxigênio, hormônios, substâncias proteicas, fármacos e xenobióticos (Coelho, 2012; (Hernandez-Gea e Friedman, 2011).



**Figura 2** - Lóbulo hepático.  
 Fonte: Adaptada de Silverthorn, 2017.

Os sinusoides são formados por células endoteliais típicas que revestem suas paredes pelas células de Kupffer que ocupam o lúmen sinusoidal. As células de Kupffer são macrófagos residentes que têm respostas rápidas à lesão hepática e que contêm grande quantidade de lisossomos com enzimas necessárias para realizar a digestão intracelular das substâncias fagocitadas e a remoção, por endocitose, de bactérias e vírus, parasitas e células tumorais e outras partículas estranhas no sangue dos sinusoides hepáticos. O espaço de Disse, que separa os hepatócitos dos sinusoides, abriga as CEHs (Guyton e Hall, 2016, p. 2551; Parola e Pinzani, 2019).

As CEHs, no fígado normal, residem no espaço de Disse e estabelecem contatos íntimos com hepatócitos circundantes, células endoteliais sinusoidais, outras células CEHs e terminações nervosas através de seus processos citoplasmáticos. As CEHs são fisiologicamente responsáveis pela síntese e remodelação da MEC no espaço de Disse, pelo armazenamento e metabolismo da vitamina A e dos retinóides e pela regulação do fluxo sanguíneo (Parola e Pinzani, 2019).



**Figura 3** - Arquitetura sinusoidal e células que compõem o fígado normal. **A:** O sinusoide hepático e a presença de cordões de hepatócitos cercados por endotélio fenestrado. Disposição das células estreladas no espaço de Disse (setas pretas). **B:** CEHs situadas no espaço subendotelial. Espaço subendotelial e espaço de Disse com a presença e identificação dos tipos celulares que compõem o fígado - hepatócitos, células endoteliais, células estreladas quiescentes e células de Kupffer.

Fonte: Adaptada de Friedman, 2008.

O fígado desempenha muitas funções inter-relacionadas. Essa inter-relação fica evidente quando ocorre alguma anomalia hepática. Nesse caso, muitas de suas diferentes funções são perturbadas de forma simultânea (Guyton e Hall, 2016, p. 2551; Silverthorn, 2017 p. 673). Algumas das principais funções do fígado são: (1) filtração e armazenamento de sangue; (2) metabolismo de carboidratos, proteínas, gorduras, hormônios e produtos químicos estranhos; (3) formação de bile; (4) armazenamento de vitaminas e de ferro; (5) formação de fatores de coagulação (Guyton e Hall, 2016, p. 2556).

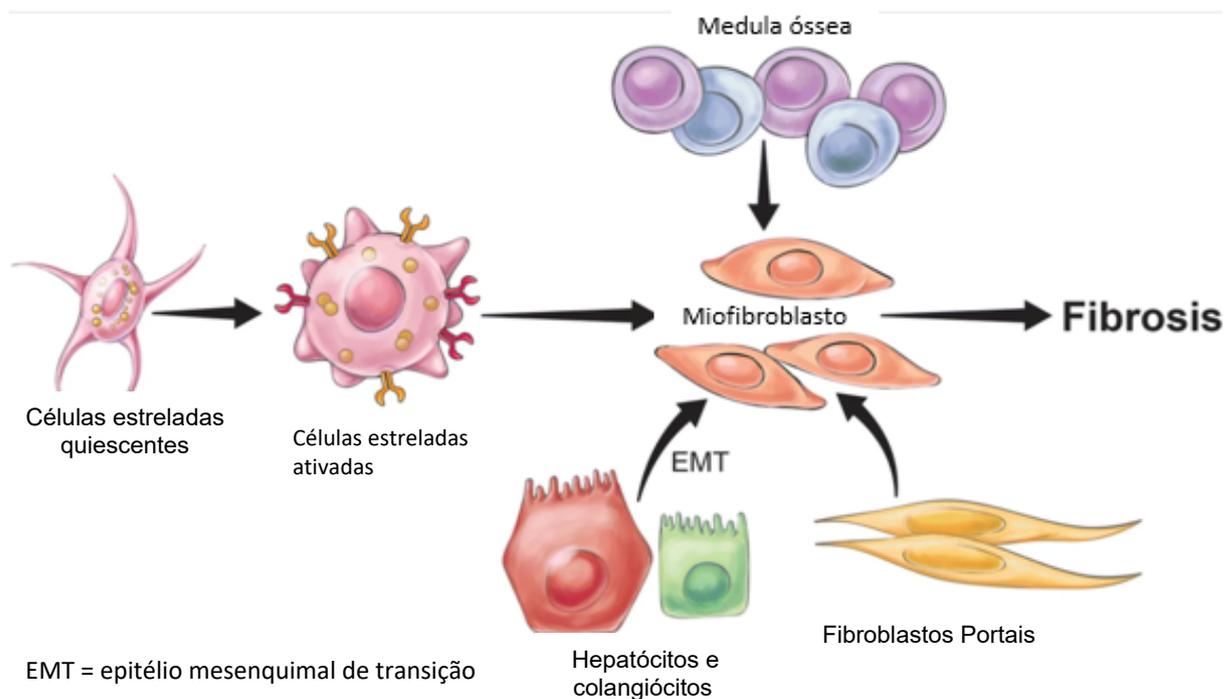
De acordo com Silverthorn e colaboradores (2017, p. 673), o envio de materiais absorvidos diretamente para o fígado ressalta a importância desse órgão como um filtro biológico. Os hepatócitos contêm uma variedade de

enzimas como, por exemplo, as isoenzimas *citocromo p450*, que metabolizam fármacos e xenobióticos e os retiram da circulação sanguínea antes de eles alcançarem a circulação sistêmica.

O fígado é um órgão envolvido em atividades metabólicas vitais, armazenamento de nutrientes e desintoxicação. Mediado por um repertório de células imunes diversificadas e por populações de células não hematopoiéticas, o fígado, quando saudável, desempenha atividade imunológica complexa (Brenner *et al.*, 2013; Robinson, Harmon e O'Farrelly, 2016).

### 1.1.1 Fibrose hepática

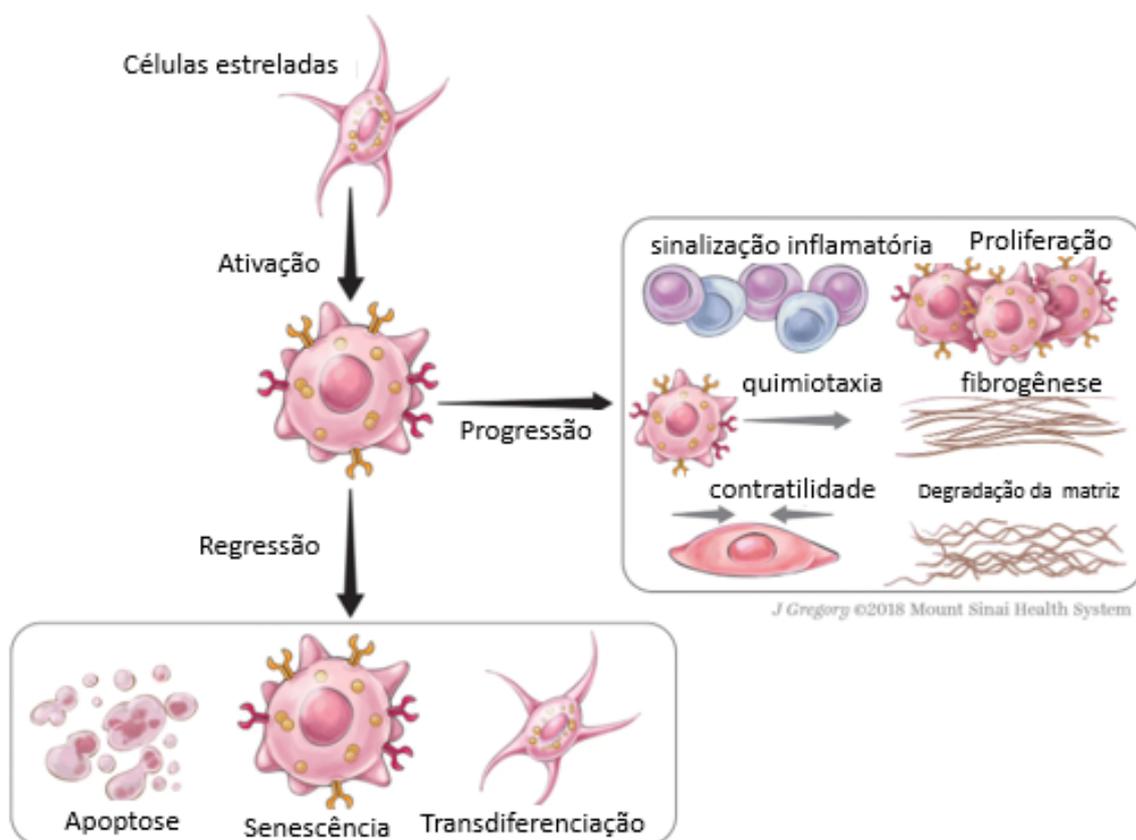
Podemos definir fibrose como um processo altamente integrado e dinâmico entre a célula e o tecido, sendo uma resposta de reparo tecidual normal, como a cicatrização de feridas na pele. Quando essa resposta ocorre de forma controlada e transitória, contribui para a restauração da integridade do tecido formando uma cicatriz. No entanto, quando essa atividade, ou processo, se torna excessivo e persistente, o reparo, que antes era benéfico, se transforma em deformidades teciduais, característica principal da fibrose do órgão. No fígado, o resultado de ciclos repetidos de lesão e reparo dá origem à fibrose hepática (Bona *et al.*, 2014; Hinz *et al.*, 2012). Na lesão hepática crônica, o excesso de produção de matriz extracelular é realizado principalmente pelos miofibroblastos hepáticos. Os miofibroblastos hepáticos originam-se de tipos heterogêneos de células fibrogênicas. As CEHs são a principal fonte de miofibroblastos hepáticos. No entanto, outras células mesenquimais hepáticas, incluindo fibroblastos portais, fibrócitos originados da medula óssea e hepatócitos ou colangiócitos vindos de um processo denominado epitélio-mesenquimal de transição, também podem contribuir para a população de miofibroblastos. Essa contribuição ocorre em graus variados, dependendo da etiologia da doença hepática (Figura 4) (Bansal e Chamroonkul, 2019; González-Fernández *et al.*, 2017).



**Figura 4** - Miofibroblastos hepáticos.

Fonte: Adaptada de Bansal, 2019.

O EO desempenha um papel crucial na ativação das CEHs. Portanto, sua redução poderia ser benéfica na melhora do processo de fibrose. A ativação das CEHs, caracterizada pela conversão de uma célula quiescente rica em vitamina A em um fenótipo de miofibroblasto, que é proliferativo, fibrogênico e contrátil. Essa ativação é considerada a chave central para a fibrogênese e uma resposta comum a vários insultos no fígado (Sanchez-Valle *et al.*, 2012). A redução no número de CEHs potencialmente pode reverter a fibrose hepática. A eliminação das CEHs (Figura 5) pode ocorrer através de três maneiras principais: indução de morte de CEHs (apoptose), indução da senescência de CEHs e reversão ou transdiferenciação das mesmas para um fenótipo inativo (Friedman, 2008; Bansal e Chamroonkul, 2019).



**Figura 5** - Vias de eliminação das CEHs.

Fonte: Adaptada de Bansal, 2019.

Portanto, independentemente da etiologia da doença hepática, as CEHs são o principal alvo da terapia antifibrótica (Bansal e Chamroonkul, 2019).

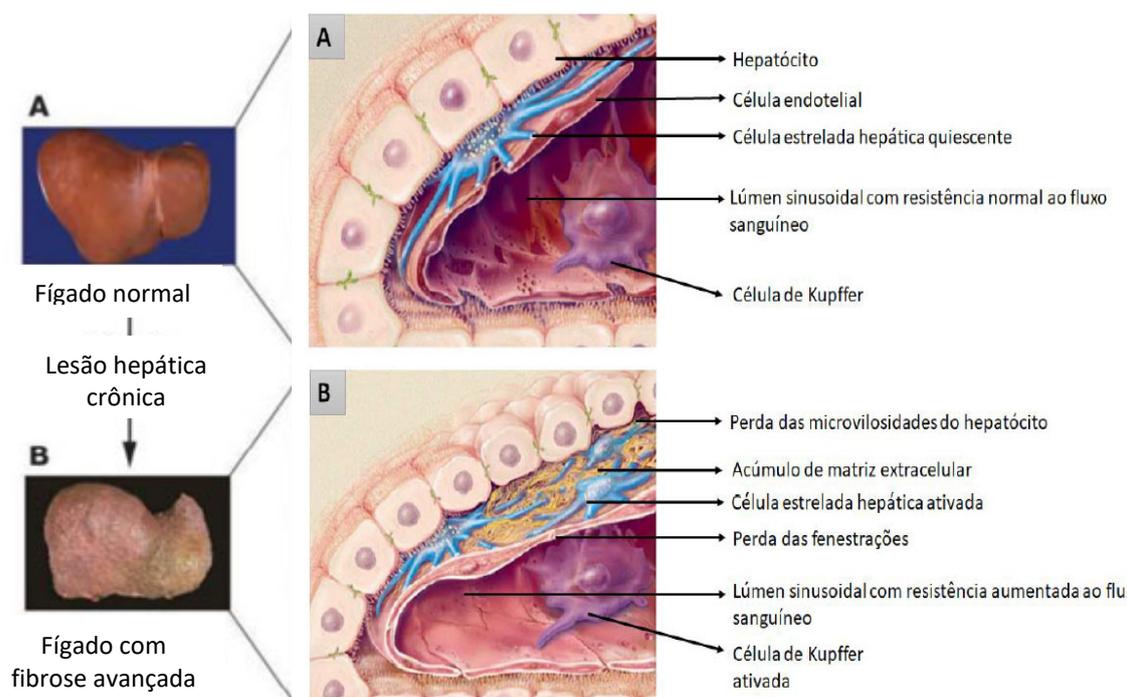
Uma das seis isoformas de actina expressa em tecidos de mamíferos é a  $\alpha$ -SMA, sendo comum sua presença nas células musculares lisas vasculares e nos miofibroblastos, ou fibroblastos contráteis, estando localizados dentro dos feixes de miofilamentos. (Friedman, 2008). O processo de ativação das CEHs, após desencadeado, leva ao aumento da expressão de filamentos contráteis, como da  $\alpha$ -SMA. O marcador mais comumente utilizado em estudos experimentais e clínicos relacionados às doenças hepáticas crônicas é o  $\alpha$ -SMA, sendo aceito como um indicador da ativação das CEHs (Bona *et al.*, 2014; Krenkel *et al.*, 2019; Weiskirchen, R; Weiskirchen, S; Tacke, F, 2019).

### 1.1.2 Cirrose

A cirrose hepática é uma das causas mais comuns de mortes em pacientes com doença hepática crônica. A lesão hepática crônica de praticamente qualquer etiologia envolve lesão crônica do parênquima, desencadeamento de persistentes respostas inflamatórias, ativação da fibrogênese e respostas cicatriciais. Esses processos a longo prazo, promovem o desenvolvimento de fibrose hepática, que pode evoluir para cirrose com aumento na resistência ao fluxo sanguíneo (Guyton e Hall, 2016, p. 2550; Parola e Pinzani, 2019).

A cirrose hepática (Figura 6B), consequência final da progressão da fibrose, é definida como um estágio avançado da doença hepática crônica. Devido a um contínuo depósito de colágeno, na cirrose, a estrutura acinar se transforma em uma estrutura nodular, circundada por extensos septos de fibrose no parênquima, os quais alteram a estrutura normal e a arquitetura vascular hepática (Novo *et al.*, 2014; Hernandez-Gea e Friedman, 2011). A cirrose apresenta grave interrupção do fluxo arterial e venoso intra-hepático e, por fim, resultam em hipertensão portal (Hernandez *et al.*, 2017). Com o passar do tempo, a diminuição da solubilidade do colágeno contribui para a irreversibilidade da cirrose em estágios posteriores (Bansal e Chamroonkul, 2019).

Alterações qualitativas e quantitativas na composição da MEC levam à capilarização do sinusóide, dificultando a função de trocas metabólicas. Resultando na formação de *shunts* intra-hepáticos (Hernandez-Gea e Friedman, 2011; Rockey, 2013).



**Figura 6** - Alterações celulares na cirrose hepática. **A:** Arquitetura sinusoidal no fígado normal, com a presença e identificação dos tipos celulares que compõem o fígado - hepatócito, célula endotelial, célula estrelada quiescente e célula de Kupffer. **B:** Ativação e multiplicação de células estreladas hepáticas, acúmulo de matriz extracelular, perda das microvilosidades dos hepatócitos e capilarização dos sinusoides.

Fonte: Adaptado de Friedman, 2008.

A cirrose pode se apresentar em dois estados: primeiro de compensado, em que não apresenta sintomas, podendo passar despercebida; e no segundo estado denominado descompensado, que é a fase mais grave, onde surgem habitualmente os sintomas e complicações, como: presença de ascite, hemorragia por varizes e encefalopatia hepática (Hernaez *et al.*, 2017).

As etiologias principais são: virais (por exemplo, hepatites B, C e D), alcoólicas, metabólicas (por exemplo, esteatohepatite não alcoólica), criptogênicas, autoimunes (por exemplo, hepatite autoimune e colangite esclerosante primária), vasculares (por exemplo, fibrose cardíaca), por drogas (lícitas e ilícitas), obstrutivas (por exemplo, obstrução das vias biliares) e tóxicas (xenobióticos), como por DEN, tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) e tiocetamida (TAA) (Ramachandran, 2020; Bona *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2015)

A sinalização angiogênica é um componente-chave na resposta de cicatrização na fibrose hepática, ela contribui não só para a produção de MEC, como também para a hipertensão portal e para as principais complicações da

cirrose, como: varizes gastroesofágicas, hemorragia digestiva, ascite, peritonite bacteriana e encefalopatia hepática (Friedman, 2010; Kim *et al.*, 2011).

A cirrose costuma se desenvolver insidiosamente, sem sintomas, ao longo de muitos anos (20 a 40 anos). A maioria dos pacientes são assintomáticos, e o ritmo de desenvolvimento da doença é influenciado por fatores genéticos e ambientais (Hernandez-Gea e Friedman, 2011). Não há medicamentos eficazes para o tratamento e o transplante hepático é atualmente a única terapêutica com perspectiva curativa. Esse fato associado às potenciais complicações em outros órgãos evidenciam a urgência e a necessidade de desenvolver terapias antifibróticas eficazes que possam reverter a evolução da doença (Snowdon and Fallowfield, 2011; Parola e Pinzani, 2019).

### **1.1.3 Modelo experimental de indução de cirrose**

Os modelos experimentais para estudar cirrose incluem a utilização de modelos cirúrgicos, como a ligadura de ducto biliar (Tieppo *et al.*, 2009; Colares *et al.*, 2022), e o uso de modelos por indução química, como DEN (Haratake *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 2015), CCl<sub>4</sub> (Bona *et al.*, 2012) e TAA (Schemitt *et al.*, 2019). Esses modelos de cirrose conseguem reproduzir o padrão histológico e as alterações na integridade do fígado semelhantes aos da cirrose em humanos (Bona *et al.*, 2018).

A DEN, um composto N-nitroso alquil, está presente em alimentos, bebidas, fumaça de tabaco, água potável e poluição industrial. A DEN quando biotransformada, produz metabólitos capazes de estabelecer ligações covalentes denominadas adutos com DNA e Proteínas celulares. Essa síntese endógena de compostos N-nitrosos (NOCs) contribui para 45% a 75% da exposição total à DEN. Continua a ser uma questão recorrente o efeito de nitrato, nitrito e NOCs na saúde humana no que diz respeito à ocorrência de câncer, devido ao desconhecimento da exposição da população geral aos NOCs (Santos, Colaco e Oliveira, 2017).

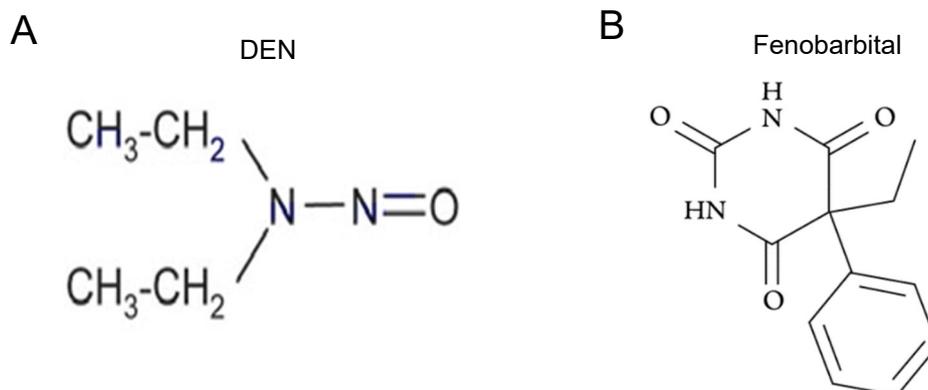
A DEN (Figura 7A), é uma hepatotoxina potente, mutagênica e cancerígena utilizada como modelo experimental de hepatocarcinoma. Ela leva à formação de RL e espécies ativas de oxigênio, a alterações oxidativas e à

quebra de fita do DNA (Santos, Colaco e Oliveira, 2017; Park, *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2015).

Há dois tipos de agentes químicos hepatotóxicos:

- Agente químico indutor (ou de ação direta): atua como iniciador, e tem a capacidade de induzir alterações estruturais no DNA. Exemplos: DEN (Figura 7A), Dimetilnitrosamina, 2-acetilaminofluoreno, Aflatoxinas.
- Agente químico promotor: tem baixa capacidade hepatotóxica, não tem interação direta com o DNA, mas provoca um efeito exacerbado no desenvolvimento da cirrose (potencializa a formação de nódulos). São exemplos de promotores: Fenobarbital (Figura 7B), Tiocetamida, tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) e tamoxifeno. (De Minicis *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2015; Santos, Colaco e Oliveira, 2017; Bona *et al.*, 2018).

Esse estudo utilizou a indução da cirrose por meio de agente químico indutor (DEN) em associação com um agente químico promotor (Fenobarbital).



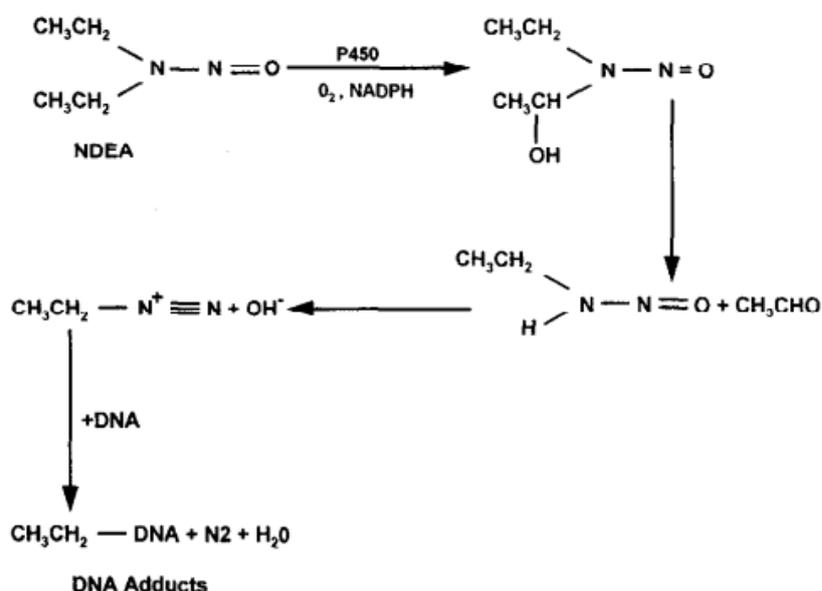
**Figura 7** - Fórmula estrutural: **A:** DEN. **B:** Fenobarbital.  
Fonte: Adaptadas (Sanches-Filho *et al.*, 2003; Yaripour *et al.*, 2020).

A cirrose hepática é uma doença grave sem tratamento eficaz disponível, tendo como única alternativa viável o transplante hepático. Estudos experimentais em modelos animais são fundamentais para compreender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na cirrose e para avaliar a eficácia de novas terapias (Schemitt *et al.*, 2019; De Minicis *et al.*, 2013).

A cirrose hepática foi induzida por DEN, por meio da administração i.p. de uma dose de 50 mg/kg de peso do animal duas vezes por semana, em sete semanas (Bona *et al.*, 2014). A exposição a baixas e repetidas doses de DEN

causa lesão hepática crônica com graus variados de necrose, fibrose e regeneração nodular. Em roedores, a administração de DEN causa dano hepatocelular e EO, resultado da geração de RL. Portanto esse é um modelo ideal para estudar o efeito de terapias antifibróticas em que o EO ativa mecanismos para induzir a ativação das CEHs levando à fibrose (Bona *et al.*, 2014; MadanKumar *et al.*, 2014).

A primeira etapa de bioativação da DEN (Figura 8) é a  $\alpha$ -hidroxilação, que é dependente de oxigênio e de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e requer ativação metabólica catalisada pelo sistema enzimático do citocromo P450, produzindo uma  $\alpha$ -hidroxilnitrosamina, a qual tem sua maior atividade nos hepatócitos centrolobulares. O processo segue com a formação do íon etildiazonium, que apresenta características eletrofílicas. Esse íon propicia a lesão por DEN por meio da quebra na cadeia do DNA (Verna, Whysner e Williams, 1996; Moreira *et al.*, 2015; Santos, Colaco e Oliveira, 2017).



**Figura 8** - Biotransformação da DEN.  
Fonte: Adaptado de Verna *et al.*; 1996.

A lesão hepática induzida por um metabólito tóxico é dependente da mono-oxigenase do citocromo P450, na qual a metabolização do DEN é exacerbado por promotores enzimáticos como o fenobarbital (Calfee-Mason, Spear e Glauert, 2002; Goldani *et al.*, 2007).

## 1. 2 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio atmosférico ( $O_2$ ) é utilizado pelos organismos vivos, sendo um dos responsáveis por fornecer de energia celular e por manter as funções bioquímicas intracelulares. Entretanto, por meio desse metabolismo aeróbico há maior chance de formar as ERO e, conseqüentemente, o EO. Então, o  $O_2$  pode ser potencialmente nocivo, pois tanto a sua falta quanto o seu excesso podem levar à morte (Gutteridge e Halliwell, 1989; Halliwell, 2012).

O excesso na produção de oxidantes, que leva ao EO, causa alteração e danos às biomoléculas intracelulares, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Entretanto, quando o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é mantido, as ERO desempenham uma função fisiológica positiva no funcionamento normal das células, a qual, é essencial para processos bioquímicos vitais por meio da sinalização redox durante o ciclo celular, estimulando a diferenciação, progressão, interrupção do crescimento e morte celular programada (apoptose). As ERO também atuam na defesa contra microrganismos e na regulação imunológica (Sies, Berndt e Jones, 2017; Zahra *et al.*, 2021). Por outro lado, o desequilíbrio da homeostase redox em favor dos pró-oxidantes resulta em uma super-produção de ERO, o que leva a um estado patológico conhecido como EO, um fenótipo-chave relacionado com muitas doenças, incluindo a cirrose (Gaschler e Stockwell, 2017; Halliwell e Gutteridge, 2015).



**Figura 9** - Representação do estresse oxidativo.  
Fonte: elaborado pela autora.

O EO é denominado um estado de desequilíbrio na produção entre substâncias oxidantes e os sistemas de proteção antioxidante a favor das oxidantes. (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Na grande maioria dos estudos clínicos, níveis elevados de certos biomarcadores de dano oxidativo têm sido descritos como um mecanismo sério na iniciação e progressão da fibrose e cirrose. Parecem estar correlacionados com um pior prognóstico da doença, podendo chegar a hepatocarcinoma, estágio mais avançado da doença (Halliwell, 2013).

### 1.2.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

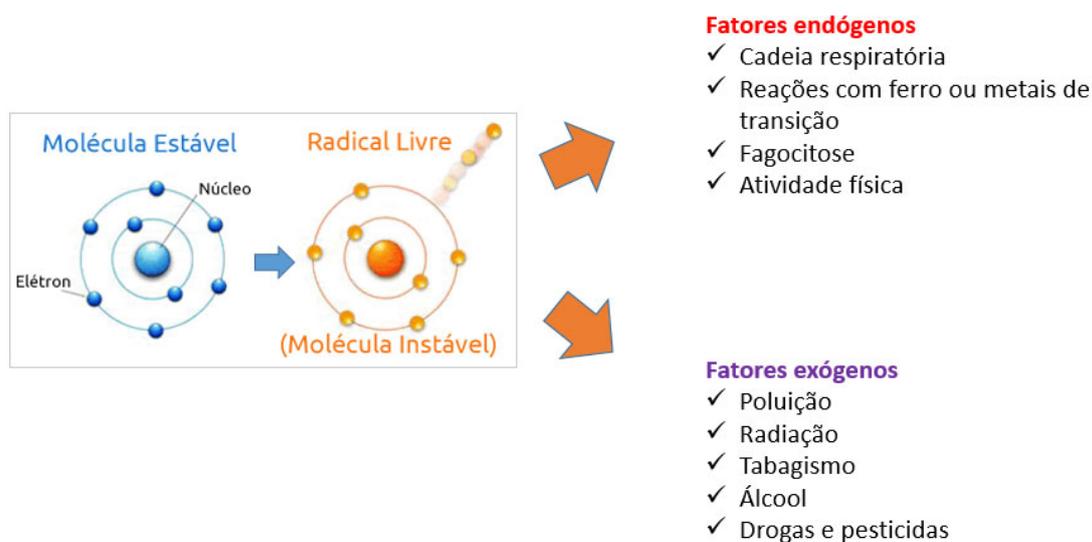
Para o sistema biológico, a geração das ERO está associada ao aumento da velocidade na geração de espécies oxidantes e/ou à diminuição da atividade dos sistemas de defesa AOX (Halliwell e Gutteridge, 1989).

As ERO incluem os RL, como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) e derivados não radicais altamente tóxicos, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Todos esses são gerados como subprodutos metabólicos por sistemas biológicos (Pizzino *et al.*, 2017; Zahra *et al.*, 2021).

Radical livre (RL) é qualquer espécie química (átomo ou molécula) que seja capaz de existência independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no mais externo; um elétron desemparelhado está ligado e ocupando um orbital atômico ou molecular sózinho. Dessa forma, os RL buscam reagir com outras moléculas para alcançarem o equilíbrio. Além disso são uma espécie paramagnética muito instável, com alto grau de reatividade química, vida média curta e com uma enorme capacidade de se combinar inespecificamente com as diversas moléculas da estrutura celular (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Os RL podem ser formados pela perda de um único elétron de um não-radical, deixando para trás um elétron desemparelhado e uma carga positiva, ou ganhando um simples elétron (Halliwell e Gutteridge, 2015).

As espécies radicais mais comuns em sistemas biológicos são os radicais derivados de oxigênio, também conhecidos como ERO (Zahra *et al.*, 2021).

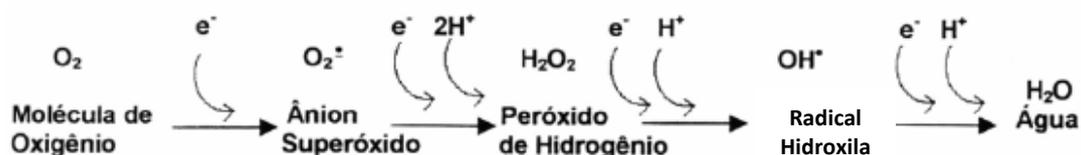


**Figura 10** - Fontes de radicais livres.  
Fonte: Bächtold, 2013. Modificado pela autora.

As ERO são uma família de moléculas continuamente geradas, transformadas e consumidas em todos os organismos vivos como consequência do metabolismo aeróbico, sendo sua concentração regulada pelo equilíbrio entre a taxa de produção e taxa de eliminação por sistemas antioxidantes (Dickinson e Christophe, 2011; Trachootham *et al.*, 2008). Em geral, níveis moderados de ERO podem funcionar como sinal para promover a proliferação e sobrevivência

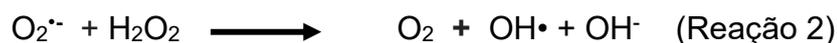
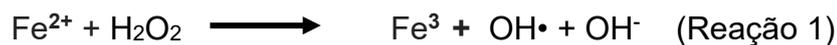
celular. Um aumento excessivo na produção de ERO, por sua vez, pode induzir à apoptose, necrose, piroptose ou morte celular autofágica. Normalmente, há um equilíbrio entre as espécies oxidativas e os mecanismos de defesa antioxidantes, o qual é mediado por enzimas responsáveis por metabolizar ou neutralizar ERO como, por exemplo, a SOD (Domènech e Gemma, 2020).

A maior parte do oxigênio molecular (95 % a 98%), durante seu processo de redução, necessita receber quatro elétrons para formar trifosfato de adenosina (ATP) liberando água e gás carbônico. Porém, na cadeia eletrônica mitocondrial, uma pequena quantidade da redução monoeletrônica do  $O_2$  (2% a 5%) tem forte tendência a receber um elétron por vez, o que levará à formação de uma série de espécies intermediárias tóxicas e reativas, que são as ERO. Em condições metabólicas normais, nos organismos aeróbicos, essas ERO são geradas até que ocorra a redução total do  $O_2$  em água. Durante esse processo, ocorre a redução parcial do oxigênio, gerando ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pela NADPH oxidase, xantina oxidase e peroxidases. O ânion superóxido com a adição de hidrogênio, se reduz a  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$ , na presença de íons metais de transição, forma o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (Figura 11).



**Figura 11** - Formação de espécies reativas de oxigênio e radical livre  
Fonte: Adaptada de Halliwell e Gutteridge, 2007.

O  $H_2O_2$  (um não radical) é produzido por múltiplas enzimas oxidase, isto é, aminoácido oxidase e xantina oxidase. O ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) são denominados RL. O radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) é o mais reativo dentre todas as espécies de RL *in vivo*. Ele é gerado pela reação de  $O_2^{\cdot-}$  com  $H_2O_2$ , na presença de  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$  como catalisador, conforme mostrado (ver figura 12) na reação de Fenton (Reação 1) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Pizzino *et al.*, 2017).



**Figura 12** - Reação de Fenton (Reação 1) e reação de Haber-Weiss (Reação 2).  
Fonte: Halliwell, 2007.

Os intermediários da redução monovalente do  $\text{O}_2$  são  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oxigênio *singlet*  $^1\text{O}_2$  e o radical  $\text{OH}\cdot$ . Todos são denominados ERO por serem capazes de existir de forma independente. Dois desses intermediários são chamados de RL. São eles:  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{OH}\cdot$ .

Alguns fatores que auxiliam no aumento da produção de ERO são a exposição a fatores ambientais, como a radiação ultravioleta (UV e a radiação ionizante, a ingestão de xenobióticos, a exposição a poluentes ambientais e metais pesados, entre outros. Esses fatores levam a um desequilíbrio (EO), que pode ser resultado do aumento exagerado na geração de ERO e de RL e/ou da redução da atividade de enzimas antioxidantes (Halliwell, 1989).

**Tabela 1** - Algumas ERO biologicamente importantes

	ERO
Radical	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superóxido, <math>\text{O}_2^{\cdot-}</math></li> <li>• Hidroxil, <math>\text{OH}\cdot</math></li> <li>• Peroxil, <math>\text{RO}_2\cdot</math></li> <li>• Alcoxil, <math>\text{RO}\cdot</math></li> </ul>
Não radical	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peróxido de hidrogênio, <math>\text{H}_2\text{O}_2</math></li> <li>• Ácido hipocloroso, <math>\text{HOCl}</math></li> <li>• Peróxidos orgânicos, <math>\text{ROOH}</math></li> <li>• Peroxinitrito, <math>\text{ONOO}^-</math></li> <li>• Ácido peroxinitroso, <math>\text{ONOOH}</math></li> </ul>

Fonte: Butterfield, 2019.

### 1.2.2 Lipoperoxidação

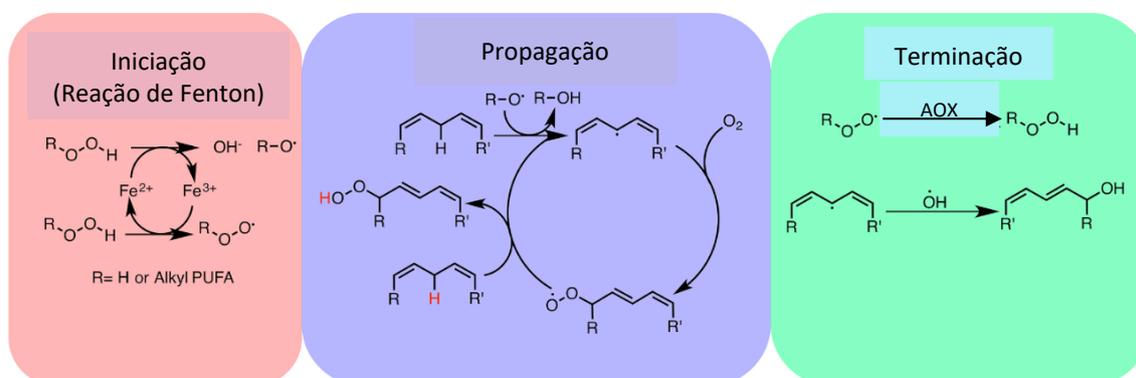
As membranas celulares, têm como seu principal constituinte os lipídeos, que desempenham papel indispensável na manutenção da integridade estrutural

das células. O processo de LPO é uma reação em cadeia caracterizada pelo ataque aos lipídeos que contêm ligações insaturadas. A oxidação excessiva de lipídeos altera a composição, estrutura e dinâmica das membranas lipídicas. Os peróxidos lipídicos, por serem compostos altamente reativos, conseguem propagar a geração adicional de ERO ou degradá-la em compostos reativos com capacidade de fazer ligações com o DNA e com as proteínas (Ayala, 2014; Gaschler, 2017; Schemitt, 2019).

As ERO desencadeiam peroxidação lipídica, liberação de citosinas inflamatórias e morte celular. Tanto os produtos de LPO biologicamente ativos quanto as citocinas agem em conjunto para desencadear as diversas lesões hepáticas, induzindo à inflamação hepática e fibrose, que eventualmente levam à cirrose (Marcolin *et al.*, 2013).

A biossíntese de peróxidos lipídicos pode ser realizada por enzimas ou por processos não enzimáticos, mas, para ambos, o escopo do substrato e o mecanismo geral da LPO são praticamente os mesmos.

Essa reação em cadeia é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 13) (Halliwell, 2013).



**Figura 13** - Etapas da LPO. Na etapa de iniciação, os primeiros radicais são gerados. Na etapa de propagação, os radicais são capazes de reagir com novos substratos, criando novos radicais. A etapa de propagação se repete até a etapa de terminação, em que os radicais são 'extintos' por antioxidantes ou reagem com outro radical.  
Fonte: Adaptado de Gaschler, 2017.

### 1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO

No fígado normal, a expressão de mediadores inflamatórios é baixa. Entretanto, está aumentada nos hepatócitos, nos colangiócitos e no epitélio

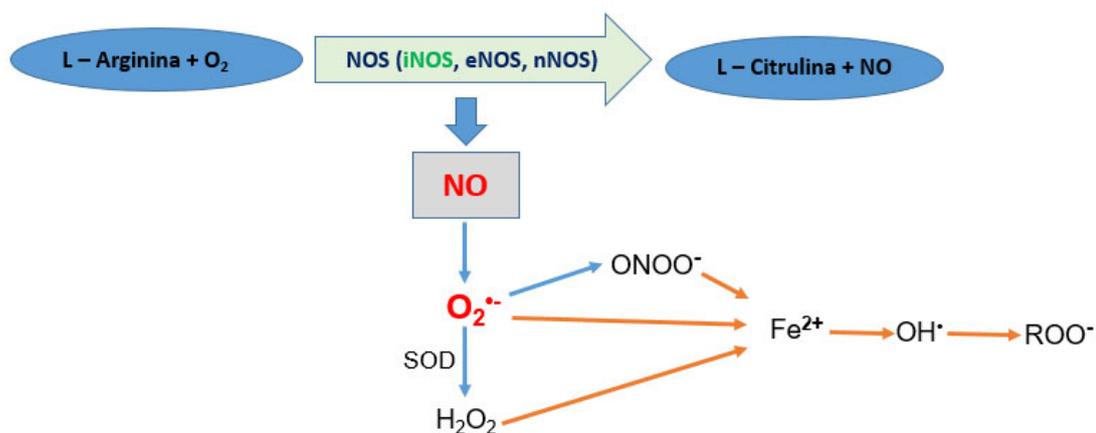
sinosoidal em diferentes doenças hepáticas agudas ou crônicas, incluindo a cirrose hepática induzida por DEN (Cerretani *et al.*, 2011; Brenner, 2013; Bona *et al.*, 2014, Robinson; 2016).

A indução de mediadores inflamatórios no fígado de ratos submetidos ao uso de DEN, incluindo a iNOS, é orquestrada pelo NF $\kappa$ B, que são reguladores gênicos envolvidos na maioria das respostas inflamatórias. (Bona, 2014; Schemitt, 2016; Tacke, 2017).

O processo inflamatório pode ser desencadeado por indutores endógenos, liberados pela ruptura da membrana plasmática ou através de células necrosadas, ou por indutores exógenos, como alimentos, microrganismos ou xenobióticos (Rosa *et al.*, 2021).

### 1.3.1 Óxido Nítrico

O NO é considerado um segundo mensageiro intracelular com inúmeras funções biológicas, incluindo as funções neurotransmissora, vasodilatadora, imunológica e metabólica (Silveira, 2004). O NO é sintetizado a partir da L-arginina e O<sub>2</sub>, com a formação de quantidades estequiométricas de L-citrulina por três enzimas óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzível (iNOS). Baixos níveis fisiológicos de NO são produzidos por eNOS e nNOS expressos constitutivamente. A iNOS, por sua vez, é responsável pela produção prolongada de maiores quantidades de NO. Embora a modulação de NOS possa contribuir para as ações anti-inflamatórias da MLT, os mecanismos envolvidos podem diferir entre os tecidos. O NO influencia vários aspectos da cascata inflamatória, desde sua própria produção por células imunocompetentes até o recrutamento de leucócitos. Além disso, a formação de peroxinitrito – o produto da reação controlada por difusão do NO com o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) – leva ao aumento da citotoxicidade (Mauriz *et al.*, 2013).



**Figura 14** - Metabolismo do NO.  
Fonte: Elaborado pela autora.

### 1.3.2 Fator nuclear Kappa B

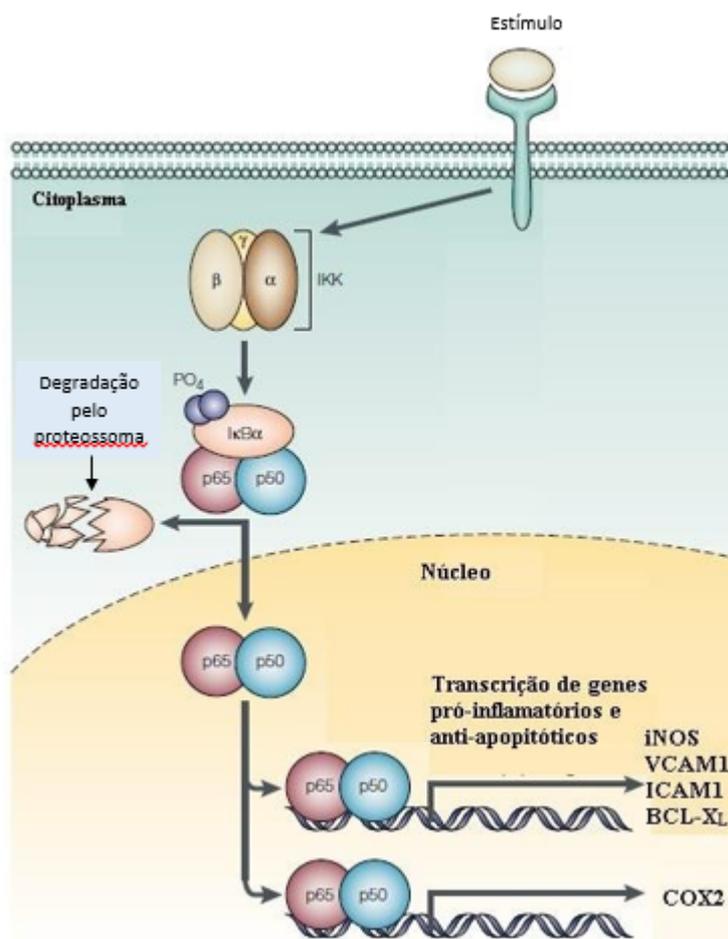
O NF $\kappa$ B é um fator de transcrição, que apresenta como característica a rápida translocação do citoplasma para o núcleo, conseguindo ativar rapidamente a expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias e respostas imunes (Sies, 2017).

O NF $\kappa$ B não se refere a uma única molécula, mas sim a uma família de fatores de transcrição diméricos, que consiste nas cinco subunidades Rel: p50, p52, RelA (também conhecida como p65), RelB e c-Rel. Essas subunidades podem ser subdivididas em duas classes: as proteínas da subfamília REL (p65/RelA, RelB e c-Rel), que são sintetizadas como proteínas maduras; e as proteínas da subfamília NF $\kappa$ B (p50 e p52 e seus precursores p105 e p100, respectivamente), que sofrem proteólise para produzir as formas de proteínas maduras (Robinson, 2010; Gaptulbarova, 2020).

As subunidades p50 e p65 (RelA) são as formas mais abundantes, sendo a subunidade p65 a que desempenha função crucial na expressão de genes envolvidos no processo inflamatório (Lingappan, 2018; Mohamed, Suddek, El-Kashef, 2021).

O NF $\kappa$ B, no citoplasma, encontra-se inativo, pois está ligado às proteínas inibitórias I $\kappa$ B. Sinais pró-inflamatórios, como produtos bacterianos, vírus, citocinas, RL, entre outros, induzem a fosforilação das proteínas I $\kappa$ B. A I $\kappa$ B é

responsável pela ativação de NF $\kappa$ B através da fosforilação do inibidor do fator nuclear- $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Ao ser fosforilado, I $\kappa$ B $\alpha$  é degradado, e isso permite que o NF $\kappa$ B/p65-p50, heterodímero, migre para o núcleo e aumente a regulação da expressão de genes pró-inflamatórios e anti-apoptóticos, tais como iNOS, VCAM1, COX2, resultando em um processo inflamatório. (Lawrence *et al.*, 2002; Gaptulbarova,2020).



**Figura 15** - Ativação de NF $\kappa$ B/p65 em resposta ao estímulo pró-inflamatório.  
Fonte: Modificado de Lawrence *et al.*, 2002.

Evidências sugerem que as ERO podem agir como sinalizadores do NF $\kappa$ B, demonstrando que o NF $\kappa$ B é um fator de transcrição que responde ao EO. O NF $\kappa$ B modula a expressão gênica em diversos processos celulares, como a resposta imune inata, inflamatória e apoptótica e respostas ao estresse a uma variedade de estímulos nocivos. Vários estudos, em diferentes modelos de EO, têm sido realizados para elucidar os efeitos do EO na via de sinalização do NF $\kappa$ B (Lingappan, 2018; Moreira *et al.*, 2015).

## 1.4 DANOS AO DNA

As células estão continuamente expostas à ação de agentes e de fatores físicos e químicos provenientes de fontes endógenas e exógenas, ao quais podem danificar o DNA caso os mecanismos de reparo celular não sejam eficientes e rápidos, podendo originar mutações e possíveis transformações neoplásicas (Costa *et al.*, 2003).

Produtos químicos mutagênicos podem induzir alterações genômicas por atingirem diretamente e/ou indiretamente o DNA, ligando-se a proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma. Alguns deles necessitam ser metabolizados antes de adquirirem sua capacidade mutagênica como, por exemplo, a DEN (Mateuca *et al.*, 2006).

O EC é um método que detecta várias formas de danos primários ao DNA, como quebras de fita simples e dupla, lesões álcali-lábeis, dano oxidativo à base do DNA e ligações cruzadas. Esse ensaio tem sido amplamente aplicado como primeiro parâmetro para avaliar a genotoxicidade em células eucarióticas (Bolognesi *et al.*, 2004; Villela *et al.*, 2006).

O teste de MN está entre os biomarcadores mais amplamente estudados de danos ao DNA e instabilidade cromossômica em humanos (Fenech *et al.*, 2020; Miguel *et al.*, 2022).

Diferentemente do teste de MN, que detecta mutações já estabelecidas, o EC é uma técnica mais sensível porque é capaz de verificar a presença de danos pré-mutagênicos no DNA. Essas lesões podem ser reparadas, porém, caso o reparo não ocorra, elas podem resultar em mutação (Tice *et al.*, 2003).

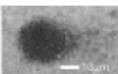
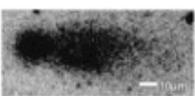
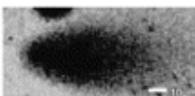
### **Ensaio cometa**

O EC é realizado por técnica de eletroforese em célula única (individual). Essa técnica oferece vantagem importante porque as células não precisam estar em estado de divisão. É considerado um método rápido, sensível e barato para medir sítios sensíveis ao pH básico (alcalinos-lábeis) e quebras no DNA de células de mamíferos. Outra vantagem do EC é a possibilidade de ser usado em

qualquer organismo eucariótico e tipo celular, o que é muito útil, pois pode detectar lesões de DNA em células individuais obtidas sob uma variedade de condições experimentais, uma vez que o dano ao DNA induzido por agentes tóxicos é frequentemente específico de tecido e célula; a técnica também pode ser usada para avaliar o reparo do DNA (Silva *et al.*, 2000).

O EC foi desenvolvido e refinado para fornecer determinação quantitativa e funcional da capacidade de resposta de dano e reparo ao DNA do indivíduo (Xu, Jianzhen *et al.*, 2020). Por envolver a aplicação de uma corrente elétrica nas células, o EC resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora do núcleo, por meio quebras de cadeia simples ou dupla, nas células danificadas. A imagem da migração do DNA obtida assemelha-se à de um cometa com cabeça e cauda, daí o termo EC. Como demonstrado na figura 16, o comprimento da cauda estaria diretamente proporcional à quantidade de DNA danificado (Singh, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Medições de quebras de fitas de DNA residuais (resultados funcionais) são usadas como evidência de excisão de base e capacidade de reparo de quebra de fita de DNA após exposição ao agente genotóxico. O EC foi validado por sua sensibilidade e especificidade, sendo, portanto, bem utilizado em todo o mundo (Xu, Jianzhen *et al.*, 2020).

Dano observado no DNA	Cabeça/Cauda	Classes de dano
	Sem cauda	0
	$\leq$	1
	1 - 2	2
	$\geq$	3
	Sem cabeça	4

**Figura 16** - Diferentes classes de danos celulares detectados pelo EC em células de hemolinfa de *Limnoperna fortunei*.  
Fonte: Villela *et al.*, 2016.

### Teste de micronúcleos

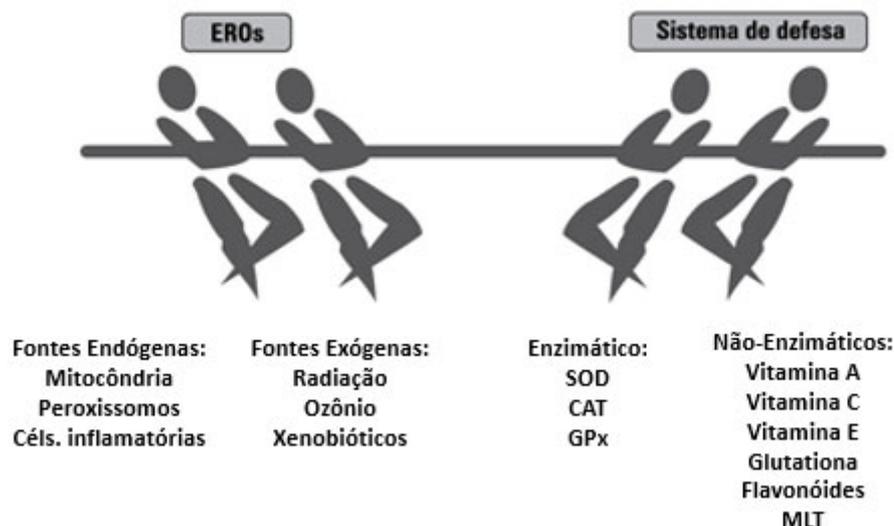
A exposição das células a agentes genotóxicos (químicos e/ou radiação) pode causar aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas, originando pequenos núcleos anormais conhecidos como MN, adicionais ao núcleo principal. Os MN são pequenos corpos extracelulares formados durante a divisão celular que apresentam fragmentos de cromossomos (DNA) e/ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo primário por serem incapazes de migrar para os polos, ficando para trás na anáfase e não sendo incluídos nos núcleos-filhos durante a telófase da mitose. A formação de MN ocorre ou porque a maioria dos fragmentos cromossômicos não possui centrômero, ou porque alguns dos cromossomos inteiros têm centrômeros defeituosos. A presença de MN em células recém divididas indica dano genômico sem possibilidade de reparo (Carrard *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2022).

Entre os testes mais utilizados para a detecção de mutações cromossômicas está o teste de MN, que exige a célula estar em seu estado proliferativo. O ensaio do MN é um teste *in vivo* eficaz e importante para a detecção de compostos genotóxicos, particularmente daqueles que requerem ativação metabólica, como, por exemplo, a DEN (Tu *et al.*, 2021).

### 1.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidante (AOX) é qualquer substância que, quando presente em concentrações reduzidas comparadas às de um substrato oxidável, consegue retardar ou inibir, significativamente, a oxidação desse substrato (Sies *et al.*, 1993).

O nosso organismo, possui um complexo sistema antioxidante protetor contra as ações deletérias provocadas pelos RL. Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático (Figura 17), e ambos trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das ERO nos tecidos (Silveira, 2004).



**Figura 17** - Fonte de ERO e antioxidantes.  
Fonte: Adaptado de Silva, 2014.

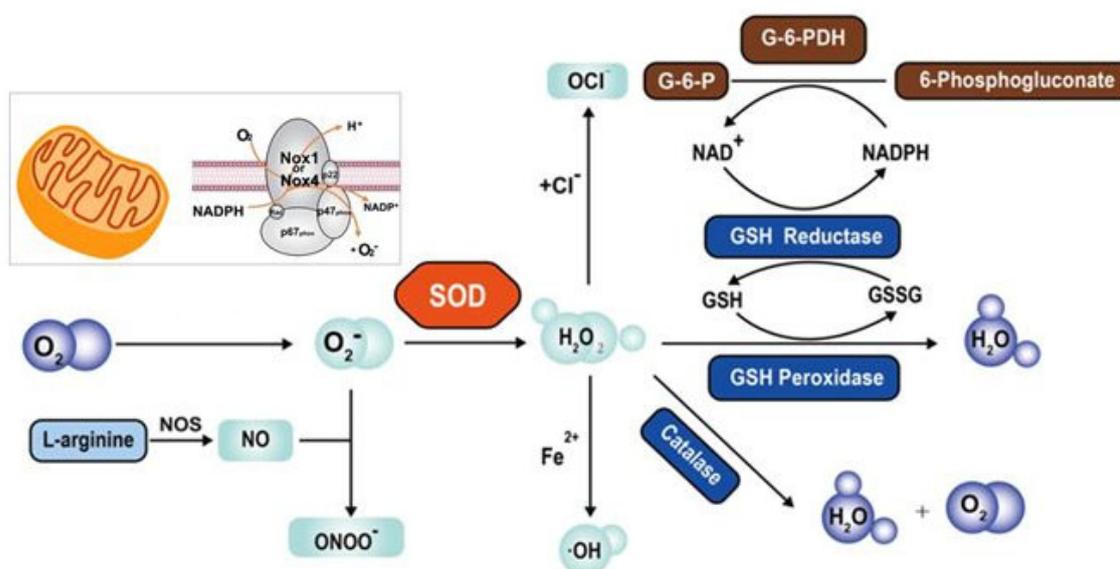
A suplementação com antioxidantes, seja na dieta ou em cápsulas, é baseada em estudos que demonstram que os radicais de oxigênio e as ERO desempenham um papel importante em muitas doenças humanas causando o “dano oxidativo”, e que a diminuição do dano oxidativo irá atrasar ou impedir o desenvolvimento e a progressão da cirrose (Halliwell, 2013).

### 1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

O sistema antioxidante enzimático é responsável pela manutenção do equilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Cada enzima desse sistema desempenha uma função no controle do balanço oxidativo (Moreira *et al.*, 2015)

Entre essas enzimas temos a SOD, responsável pela dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a Catalase (CAT), responsável por decompor o  $H_2O_2$  em água e oxigênio ( $O_2$ ), e a glutathiona peroxidase (GPx), que degrada, além do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), outros peróxidos orgânicos (Figura 18). Como primeira linha de defesa contra as ERO destaca-se a SOD (Travacio e Llesuy, 1996; Halliwell, 2012).

A ação dessas enzimas ocorre de maneira coordenada, a exemplo da SOD que atua na dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), originando  $H_2O_2$  que é transformado em  $O_2$  e água pela CAT, e a GPx inativa tanto os peróxidos de hidrogênio quanto os peróxidos lipídicos. Dependendo do local de atuação, a SOD apresenta três tipos: SOD 1 (mitocondrial), SOD 2 (intracelular) e SOD 3 (extracelular). Apesar de possuírem propriedades e estruturas diferentes, esses tipos de SOD executam a mesma reação (Chance *et al.*, 1979; Bar-Or *et al.*, 2015).



**Figura 18** - Sistema antioxidante enzimático.  
Fonte: He *et al.*, 2020.

### 1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Assim como existem as defesas do sistema antioxidante enzimático, que agem na manutenção do equilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, impedindo danos às membranas celulares, existem as defesas do sistema antioxidante não enzimático, representado por substâncias exógenas (Halliwell, 1994). Os antioxidantes não enzimáticos atuam de diferentes formas na prevenção e no combate do dano oxidativo, evitando a formação de RL e ERO ou, também, suprimindo a cadeia de peroxidação lipídica em sua fase de propagação, reparando ou, até mesmo, reconstituindo as membranas celulares (Repetto e Llesuy, 2002; Halliwell, 2006).

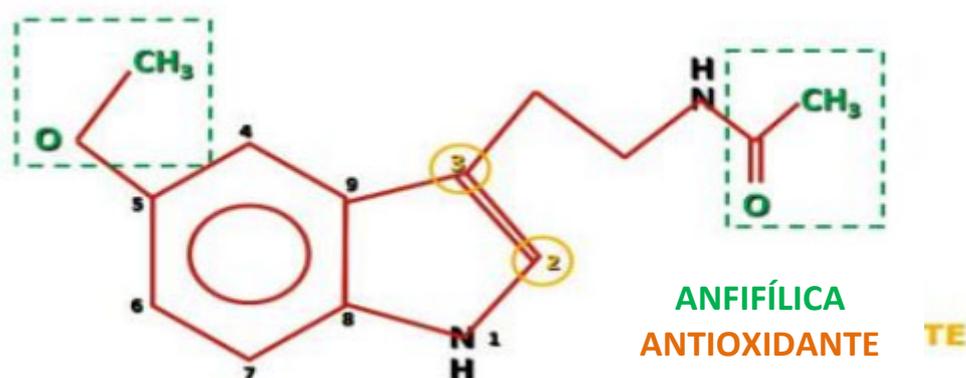
Entre esses AOX não enzimáticos exógenos, os mais conhecidos são a glutathiona (GSH), as vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol) e C (ácido ascórbico), o  $\beta$ -

caroteno, que, após ingestão, se converte em vitamina A, os flavonoides, a MLT, entre outros. A MLT se destaca por ter ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-fibrótica (Tieppo *et al.*, 2009; Bona *et al.*, 2012).

## 1.6 MELATONINA

A n-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 19), popularmente conhecida como MLT, com peso molecular de 232,27 g/mol, é um neurohormônio de natureza indólica, sintetizado a partir do aminoácido triptofano e dependente da sua disponibilidade (Palomo, 2013; Axelrod e Weissbach, 1960).

Sua característica química de anfifilicidade, graças ao grupamento metóxi no carbono 5 e ao grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina, permite ao composto difundir-se em meio hidrofílico e lipofílico, facilitando sua travessia pelas barreiras biológicas (Cipolla-Neto e Afeche, 2008). A capacidade antioxidante da MLT decorre da dupla ligação presente nos carbonos 2 e 3 do anel pirrólico. Essa dupla ligação possui alta capacidade de doar elétrons, propriedade reconhecida pela primeira vez em 1993 (Tan *et al.*, 1993).

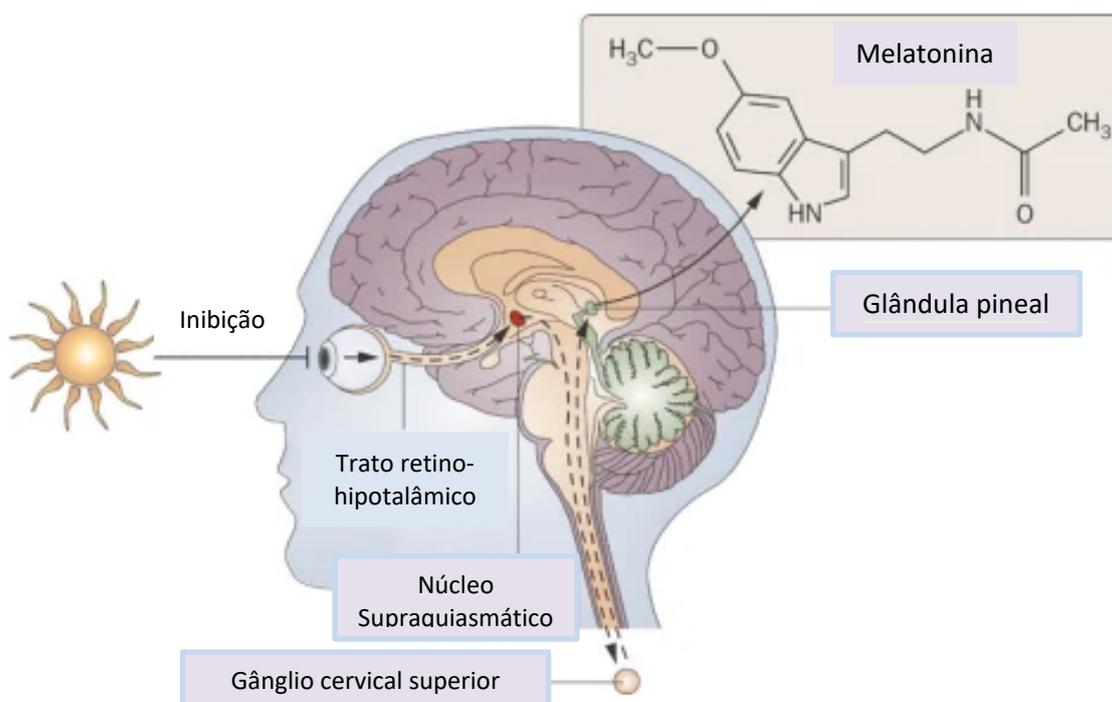


**Figura 19** - Molécula de melatonina: características químicas.  
Fonte: Adaptado de Cipolla-neto e Afeche, 2008.

A MLT é o primeiro composto biologicamente ativo sintetizado pela glândula pineal. Sua síntese ocorre ao longo de certos períodos do dia, sendo inibida pela luz e estimulada durante a fase escura, É descrita como secreção rítmica, exercendo efeitos cronobiológicos e atuando como o relógio biológico

mestre em mamíferos (Palomo, 2013; González-Fernández *et al.*, 2017; Ostrycharz *et al.*, 2020).

Sua síntese e secreção endógenas (Figura 19) são controladas pelo núcleo supraquiasmático, situado no hipotálamo. Por muito tempo, considerou-se que a MLT era produzida apenas pela glândula pineal. Porém, estudos mostram que ela foi detectada em órgãos como fígado, intestino, pulmão e medula óssea (Fevre-Montange, 1985; Brzozowski e Jaworek, 2014). Ela também pode ser encontrada em alguns alimentos como frutas (casca da uva, abacaxi), nozes e carnes, especialmente na carne frango, bovina e suína. A ingestão desses alimentos ajudam a suprir uma parte das deficiências diárias desse hormônio. Pesquisas mais detalhadas foram realizadas recentemente e constataram que a via sintética de MLT em plantas tem como precursor o triptofano, o qual necessita de quatro reações enzimáticas consecutivas para produzir melatonina. No entanto, essa via sintética difere da dos animais (Cheng, *et al.*, 2021).



**Figura 20** - Controle, síntese e secreção da MLT  
Fonte: Koch *et al.*, 2009.

Essa molécula parece ser capaz de afetar várias vias de sinalização intracelulares e proteger células saudáveis contra diferentes tipos de danos (Palomo, 2013). Após secretada ou administrada, ela passa livremente através da membrana celular, incluindo a barreira hematoencefálica e a placenta, e se distribui por vários tecidos sem ser estocada, alcançando todos os compartimentos subcelulares e protegendo-os dos RL (Costa, Lopes e Lamy-Freund, 1995). Inúmeros estudos surgiram para testar e comprovar a capacidade dessa indolamina como *scavenger* de RL, entre eles o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (Reiter *et al.*, 2002; Reiter, Tan e Galano, 2014).

A MLT também tem sido associada a uma gama de funções, incluindo: atividade angiogênica, efeito neuroprotetor junto ao sistema nervoso central e influência na sobrevivência e diferenciação das células-tronco mesenquimais (MSCs) (El-Magd *et al.* 2019; Rosa *et al.*, 2021; Reiter *et al.*, 2016). Muitos estudos demonstraram que a MLT exerce seus efeitos anti-inflamatórios em várias situações fisiopatológicas, sendo capaz de regular a ativação do sistema imunológico e reduzir a inflamação crônica e aguda (Tarocco *et al.*, 2019; Miguel *et al.*, 2022; Oliveira Salvi, 2020).

Na prática clínica, a MLT já é usada há muitos anos. Além de ser segura e bem tolerada mesmo em doses elevadas, ela atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica (Reiter, Tan e Korkmaz, 2013). É prescrita para aumentar a eficiência do sono, tratar o *jet lag*, melhorar o sistema cardiovascular, combater o envelhecimento, complementar dietas, controlar e tratar alterações ligadas ao humor, ajudar na maturação sexual e reprodução (Pescador, 2013; Moreira *et al.*, 2015).

## 2 OBJETIVOS DO ESTUDO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os efeitos da MLT na modulação da homeostase redox, no processo inflamatório, fibrogênico e cirrótico e nos danos ao DNA no modelo experimental de cirrose hepática induzida por DEN em ratos machos *Wistar*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações histológicas no fígado dos animais através de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e Picrosirius.

- Verificar as provas de integridade hepática por meio da análise bioquímica das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) no sangue dos animais submetidos à administração de DEN e tratados com MLT.

- Avaliar a formação de fibrose através da expressão da proteína  $\alpha$ -SMA por Western Blot.

- Avaliar os parâmetros de EO mediante análises da lipoperoxidação pela técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e expressão da enzima antioxidante SOD no fígado dos animais.

- Analisar o processo inflamatório através da expressão das proteínas iNOS e NF $\kappa$ B/p65 pela técnica de Western Blot.

- Avaliar os danos ao DNA por meio das técnicas de EC e MC.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

Este estudo apresentou caráter experimental comparativo, sendo caracterizado pela indução química da cirrose hepática, por meio da administração i.p. de DEN e pela comparação de grupos com grupos com e sem o uso de MLT.

### **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.2.1 Considerações éticas**

O estudo foi realizado na Unidade de Experimentação Animal e no Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) sob o número 2016-0029.

O uso e cuidado com os de animais foram de acordo com a Lei Federal n<sup>o</sup> 11.794 de 08/10/2008, que regulamenta o uso de animais em pesquisas científicas no Brasil, seguindo as normas do Conselho Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### **3.2.2 Animais e cálculo amostral**

O cálculo amostral usou como base estudos anteriores, em que, para detectar diferenças com magnitude (tamanho de efeito: E/S) igual a 2,0 unidades de desvio padrão no balanço oxidativo, mantendo-se  $\alpha = 0,05$  e poder de 90%, foram calculados seis ratos por grupo (Bona *et al.*, 2014).

Neste estudo, foram utilizados 32 ratos machos *Wistar* com peso aproximado de 180 gramas. Os animais foram aclimatados por 14 dias antes de qualquer manipulação/experimentação e mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Durante o experimento, foram mantidos em caixas forradas com maravalha, com lotação mínima de 2 e máxima de 4 animais em cada caixa, e em uma sala com temperatura e umidade relativa do ar controladas (18-

22 °C e 40-60%, respectivamente), e mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração específica para a espécie e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

### 3.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos com oito animais cada:

- Grupo CO (controle) (n=8): animais submetidos à administração do veículo soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,9%) por via i.p. durante sete semanas.
- Grupo CO+MLT (n=8): animais submetidos à administração de MLT por via i.p. durante sete semanas.
- Grupo DEN (n=8): animais submetidos à administração de DEN duas vezes por semana por via i.p. durante sete semanas.
- Grupo DEN+MLT (n=8): animais submetidos à administração de DEN, duas vezes por semana por via i.p. durante sete semanas. Nesse grupo, o tratamento com MLT foi administrado diariamente a partir da quinta semana de experimento até a sétima semana por via i.p.

### 3.2.4 Procedimentos experimentais

#### 3.2.4.1 Peso dos animais

A avaliação do peso dos animais durante o experimento foi realizada semanalmente por meio de pesagem em balança analítica. Os valores de peso (gramas) de cada animal foram utilizados para o cálculo das doses de MLT, DEN e de anestésico.

#### 3.2.4.2 Administração da melatonina

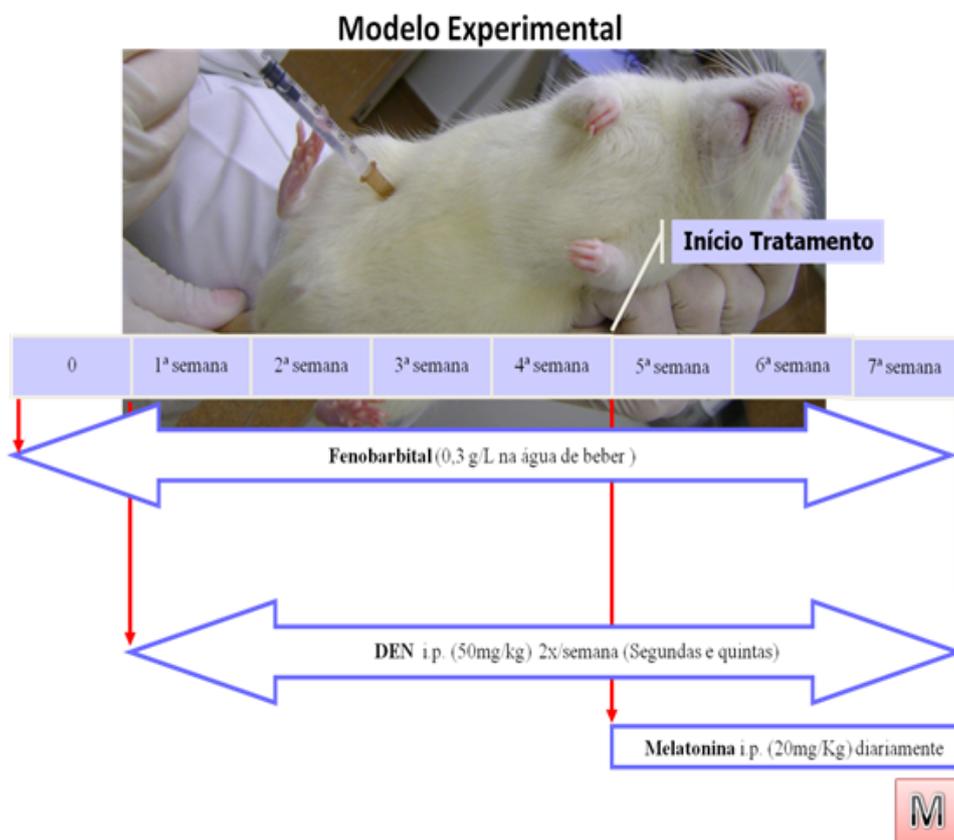
A MLT (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo) foi calculada e diluída a uma dose de 20 mg/Kg de peso corporal em 5 µL (microlitros) de etanol absoluto e 500 µL de NaCl 0,9%. Foi administrada por via i.p. da quinta até a sétima semana do experimento,

sempre às 19h, nos animais dos grupos CO+MLT e DEN+MLT, e estando os animais protegidos da luz (Bona *et al.*, 2014).

### 3.2.4.3 Desenvolvimento do modelo experimental

Foi utilizado fenobarbital na concentração de 0,3 g/L. Ele foi, adicionado à água de beber dos animais sete dias antes da primeira administração de DEN e, posteriormente, todos os dias até o final do experimento, com o objetivo de causar a indução enzimática e diminuir o tempo necessário para o desenvolvimento da cirrose. A cada três dias, foram lavadas as mamadeiras e preparado novo fenobarbital (Li *et al.*, 2012; Bona *et al.*, 2014).

Foi utilizado DEN (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo – código N0258), com peso molecular 102,14 g/mol. O DEN foi diluído em NaCl (0,9%) na concentração de 50 mg/kg de peso do animal. O grupo DEN e DEN+MLT recebeu a substância diluída por via i.p. duas vezes por semana, durante sete semanas (Bona *et al.*, 2014) (Figura 21).



**Figura 21** - Delineamento experimental.  
Fonte: Bona *et al.*, 2014.

#### 3.2.4.4 Morte dos animais e obtenção das amostras

As mortes dos animais ocorreram na sétima semana após 12 horas de jejum, momento em que os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (100 mg/Kg de peso corporal) e Cloridrato de Xilazina 2% (50 mg/Kg de peso corporal) por via i.p. Foi realizada a tricotomia da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média. Após a remoção do fígado, ele foi pesado e avaliado em seus aspectos físicos, como cor, textura e consistência. A coleta de sangue foi feita por meio de punção cardíaca, sendo coletado em torno de 3 ml de sangue, o qual foi transferido imediatamente para um frasco devidamente preparado para posteriores análises séricas. O tecido hepático foi dissecado e armazenado parte em formalina tamponada a 10% (para posterior análise histológica) e parte a -80 °C (para posteriores análises bioquímicas e moleculares). Por fim, os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia. As carcaças dos animais foram acondicionadas em embalagens específicas para o descarte e mantidas em *freezer* até o recolhimento para incineração, conforme os protocolos de rotina da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 3.3 ANÁLISES

#### 3.3.1 Avaliações histológicas

Para a análise histológica, inicialmente o fígado foi dissecado e aproximadamente 2 cm foi retirado do fígado cada animal. Essas amostras foram imersas em formalina tamponada a 10% e encaminhadas ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde ficaram 24 horas para fixação. A seguir, as amostras passaram por uma série graduada de etanol, seguida de dois banhos de xilol, e foram incluídas em parafina a 64°C. Os blocos de parafina resultantes foram fixados ao Micrótomo (Leitz® 1512) e cortados em lâminas na espessura de 3 micras (3 $\mu$ ). Na etapa de coloração, as lâminas foram colocadas em banho histológico a 50°C e, a seguir, foram imersas em cubas contendo o corante HE ou Picrosirius durante 5 minutos em cada coloração. Após lâminas foram lavadas em água corrente e, a seguir, passaram por três recipientes com álcool absoluto e por mais dois com xilol. Na próxima etapa, foi colocada uma lamínula sobre cada lâmina, a qual foram fixadas

com Bálsamo do Canadá ou Entellan, finalizando, assim, o processo de preparação. As lâminas foram examinadas por um patologista que desconhecia a alocação dos grupos. Não utilizamos para essas análises o grupo CO+MLT, uma vez que trabalhos anteriores verificaram semelhanças com o grupo CO. As lâminas foram fotografadas e analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* com aumento de 100x e 200x, por um patologista que desconhecia os grupos estabelecidos no delineamento experimental do Serviço de Patologia do HCPA. Foi utilizado *score* para determinar o grau de lesão nas histologias coradas por meio das técnicas de HE e Picrosirius (Tabela 2):

**Tabela 2** - *Score* indicando o grau de lesão presente nas lâminas histológicas

Score para coloração HE		Score para coloração Picrosirius	
Ausência de dano	0	Ausente	G0
Dano leve	1	Fibrose espaço porta	G1
Dano moderado	2	Fibrose com septos	G2
Dano acentuado	3	Esboça nódulos	G3
		Nódulos	G4

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3.2 Avaliações bioquímicas

#### 3.3.2.1 Enzimas de integridade hepática

As análises dos níveis séricos de ALT (U/L) e AST (U/L) foram determinadas pelo teste cinético ultravioleta. A FA (U/L) foi quantificada pelo teste colorimétrico cinético. Os níveis dessas enzimas foram medidos utilizando métodos laboratoriais de rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por meio de método enzimático automatizado (*Siemens Advia 1800 Chemistry system*).

#### 3.3.2.2 Preparação do homogeneizado

Após a retirada do fígado de cada animal, cada amostra devidamente identificada, pesada e armazenada em *freezer* a -80 °C. Posteriormente, foram

adicionados a cada amostra 9 ml de solução cloreto de potássio (KCl 1,15%) por grama de tecido e, a seguir, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração de 100 mM (milimol) em isopropanol (10 µl PMSF / mL de KCl). O tecido foi homogeneizado em Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante 30 a 40 segundos em temperatura de 0 a -4 °C, sendo, a seguir, centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante foi removido e congelado em freezer a - 80 °C para posteriores análises bioquímicas (Llesuy *et al.*, 1985).

### 3.3.2.3 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada utilizando o método Bradford (1976). Assim, foi utilizada uma curva de albumina bovina (SIGMA) como padrão, bem como reagente de Bradford, que consiste no corante *Coomassie Brilliant blue* BG 250. Esse método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm (nanômetros). Sendo assim as amostras foram mensuradas em espectrofotômetro a 595 nm e os valores foram expressos em mg/mL. Esses valores foram utilizados para calcular, posteriormente, o TBARS e os valores das enzimas antioxidantes (Bradford, 1976).

### 3.3.2.4 Técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Com o intuito de avaliar a LPO nos grupos presentes neste estudo, utilizamos o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. As amostras homogeneizadas de fígado foram colocadas em tubos de ensaio com uma mistura de ácido tricloroacético (TCA) 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. A seguir, as amostras foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e resfriadas em gelo por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL de álcool n-butílico para a extração do pigmento formado. O aparecimento da coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da LPO no material biológico. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, e sua absorvância foi determinada por espectrofotometria a 535 nm, sendo os resultados expressos em nmol/mg (nanomol/mg) de proteína (Buege e Aust, 1978).

### **3.3.3 Avaliações moleculares**

#### **3.3.3.1 Western Blot**

As amostras foram incubadas a 100 °C utilizando H<sub>2</sub>O, tris/HCl, DTT e azul de bromofenol. Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida. Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) e colocadas em solução de bloqueio. A membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com anticorpo primário específico para as seguintes proteínas: SOD,  $\alpha$ -SMA (42kDa), iNOS (131kDa) e NF $\kappa$ B/p65 (65kDa). Após esse período, foi lavada com PBS-Tween e incubada com anticorpo secundário específico para cada proteína. A detecção das proteínas foi realizada por quimiluminescência utilizando um kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). Para a análise densitométrica foi utilizado o aparelho *L-Pix Chemi molecular image* e o software *Locus Biotecnologia L-PIX Image*. Para as avaliações moleculares foram utilizadas amostras dos grupos CO, DEN e DEN+MLT. O grupo CO+MLT não foi avaliado, pois, em análises anteriores, não foram observadas diferenças entre esse grupo e o grupo CO. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

### **3.3.4 Danos ao DNA**

#### **3.3.4.1 Ensaio cometa**

A avaliação dos danos às bases de DNA foi realizada por meio da versão alcalina do EC descrita por Tice *et al.* (2000), com pequenas modificações em amostras do fígado. As amostras do fígado foram transferidas para uma solução salina tamponada pH 7,4. Alíquotas de 5  $\mu$ l das amostras (suspensão celular de tecidos) foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão a 0,75% (95  $\mu$ l) e colocadas sobre lâminas pré-revestidas com agarose normal a 1,5%. Em

seguida, essas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso) por, no mínimo, 1 hora e, no máximo, 72 horas a 4° C para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA, realizada por eletroforese (corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos), após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram relatados como índice de dano (ID) e frequência de dano (FD). O ID foi obtido por avaliação visual das classes de dano (de 0 a 4) por meio da extração de um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células (50 células por lâmina em duplicata). O ID pode variar de 0 (nenhum dano = 100 células × classe 0) a 400 (dano máximo = 100 células × classe 4). A FD foi calculada pelo número de células com cauda (classes 1, 2, 3 e 4) *versus* sem cauda (classe 0) (Picada *et al.*, 2003).

#### 3.3.4.2 Teste de Micronúcleos

O teste de MN também avaliou os danos às bases de DNA, sendo utilizado o procedimento padrão, descrito por Mavournin e colaboradores em 1990 e por Picada *et al.* em 1997. Após a eutanásia, amostras de medula óssea foram coletadas de ambos os fêmures. A extremidade final proximal de cada fêmur foi cortada para expor o canal da medula. A medula foi extraída por meio de punção, com uma agulha histológica, e misturada a uma gota de soro fetal bovino. Com o auxílio de uma espátula curva, a amostra de medula óssea foi homogeneizada no soro, obtendo-se uma suspensão de células. Foi realizado esfregaço da suspensão celular sobre lâminas de microscopia. Foram preparadas duas lâminas por animal (Mavournin *et al.*, 1990). Após a etapa de secagem da preparação, que durou aproximadamente 30 minutos, as lâminas foram tratadas com metanol à temperatura ambiente durante 10 minutos para a fixação do material biológico. Após secagem por 30 minutos, foi realizada a coloração utilizando o corante de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,2 M, pH 5,8 (proporção de 1:9). Após sete minutos nessa solução de coloração, as lâminas foram enxaguadas em água destilada, secas e guardadas em caixas de lâminas para posterior análise. Para contagem dos eritrócitos normocromáticos

(ENC), eritrócitos policromáticos (EPC) e micronúcleos no EPC foi utilizado microscópio ótico com objetiva de imersão. Aproximadamente 2000 EPC foram analisados por animal. A relação EPC/ENC também foi determinada pela avaliação da frequência de EPC em 1000 eritrócitos de cada animal (Mavournin *et al.*, 1990; Picada *et al.*, 1997).

### 3.3.5 Análise Estatística

Os dados foram previamente tratados para verificar a normalidade.

Para as análises estatísticas dos dados foram utilizados a análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste *Student-Newman-Keuls* no programa *GraphPad InStat 3.0*.

Para avaliação do EC e do teste de MN foi utilizada a ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações, utilizando o programa SPSS versão 17.0.

Todos os dados foram expressos por meio da média  $\pm$  erro padrão, sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

As doenças hepáticas representam um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Nesse contexto, a cirrose é o principal tipo de doença inflamatória crônica do fígado, resultando na destruição do parênquima hepático e na sua substituição por fibrose (Colares *et al.*, 2016). A doença hepática crônica causa destruição progressiva do parênquima hepático, acúmulo de MEC, aumento da síntese de colágeno e incapacidade de promover a degradação da MEC. Esses processos resultam em fibrose e em subsequente cirrose hepática (Bona *et al.*, 2018).

O uso de DEN i.p. 50 mg/Kg semanalmente em ratos induz cirrose em 12 semanas (Molina-Aguilar *et al.*, 2017). O nosso estudo utilizou fenobarbital na água de beber sete dias antes da primeira utilização de DEN até o final do experimento para indução enzimática (CITP450), contribuindo para o estabelecimento de cirrose em sete semanas, o que resultou em benefícios econômicos e éticos para o modelo experimental do estudo (BONA *et al.*, 2014; Schulien e Hasselblatt, 2021).

A desnutrição proteico-calórica é uma complicação da cirrose caracterizada pela perda de peso de massa magra e gordurosa. Os animais que receberam DEN diminuíram de peso quando comparados aos animais dos demais grupos. Os animais tratados com MLT, por sua vez, tiveram aumento de peso no final do experimento. Estudos de Sharma *et al.* (2019), Molina-Aguilar *et al.* (2017) e Rosa *et al.* (2021) atribuem a perda de peso corporal nos ratos à alteração severa da função hepática desencadeada por DEN.

As provas de integridade hepática foram avaliadas após sete semanas por meio da determinação da atividade enzimática das aminotransferases (AST e ALT) e da enzima canalicular fosfatase alcalina (FA). O aumento significativo da atividade dessas enzimas provavelmente decorre de danos às membranas dos hepatócitos, com alteração da sua permeabilidade, e/ou de lesão celular aguda com extravasamento enzimático, conforme Latief *et al.* (2019) e Oleshchuk *et al.* (2019). A lesão, nesse modelo, ocorre como consequência do dano oxidativo provocado pela formação de peróxidos lipídicos. Nos grupos tratados com MLT, houve diminuição significativa das aminotransferases, com retorno a níveis semelhantes aos do grupo controle, sugerindo ação protetora da MLT contra o agente tóxico DEN, o que corrobora com o estudo de El-Magd, *et al.* (2019).

A avaliação histológica por meio da técnica por coloração de HE evidenciou, no grupo exposto à DEN, desorganização tecidual, com perda de cordões de hepatócitos, presença de infiltrado inflamatório e arranjo nodular. Achados semelhantes foram observados por Kuznietsova (2020), que encontrou acúmulo de tecido conjuntivo ao redor dos tratos portais e septos bem desenvolvidos. A MLT, por causa de sua ação antioxidante, diminuiu a fibrose do grupo DEN+MLT, como observado na Figura 23 e no *score* de danos apresentados nessa figura.

A coloração de Picosirius (Figura 24) evidenciou septos fibróticos formando nódulos hepáticos nos animais do grupo DEN. O uso de MLT causou redução significativa na deposição de colágeno, evidenciado pelo *score* apresentado na Figura 24 (Moreira *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2019).

Existe uma variedade de meios pelos quais a MLT impede o dano oxidativo, sendo eficaz na eliminação de uma variedade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, a MLT modula um grande número de enzimas antioxidantes, levando a uma redução no dano oxidativo (Reiter *et al.*, 2016).

Estudos recentes mostraram que a MLT exógena exerce seus efeitos citoprotetores em diferentes modelos experimentais. Isso é, especialmente verdadeiro para lesões hepáticas agudas e crônicas, que reduzem a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (Brzozowski e Jaworek, 2014; Mathes, 2010; Cruz *et al.*, 2005). A MLT protege o fígado, bem como outros tecidos, agindo contra RL produzidos. Além disso, não há relatos, de toxicidade grave após uso da MLT (Reiter *et al.*, 2002; El-Missiry *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2021; Colares *et al.*, 2022).

Testes preliminares em seres humanos revelaram que a MLT é eficaz na prevenção de colite ulcerativa, câncer do cólon, doença hepática gordurosa não alcoólica e nas complicações associadas à ressecção parcial do fígado (Brzozowski e Jaworek, 2014).

Podemos observar, na Figura 25, um aumento significativo nos marcadores de LPO. Isso ficou evidenciado ao se comparar os níveis de concentração citosólica de malonaldeído entre os animais do grupo DEN e os animais dos grupos controle. As reações de LPO aumentadas têm sido utilizadas como marcadores significativos de dano oxidativo, ocorrendo pelo acúmulo de ERO nos tecidos (Kujawska *et al.*, 2016). O aumento da produção de ERO e LPO induz à liberação de citocinas fibrogênicas,

afim de iniciar a produção de colágeno por meio da ativação das células estreladas hepáticas (CEHs) (Latief *et al.*, 2019). No grupo DEN+MLT, ocorreu diminuição significativa de LPO por TBARS, em comparação com o grupo DEN. O estudo de Oleshchuk (2019) em modelo de hepatite induzida por tetracloreto de carbono demonstrou que o uso da MLT diminui a LPO medida por TBARS no fígado. A ação da MLT em impedir a continuidade da cadeia de reação da LPO é 10 vezes maior do que a da vitamina C (Bruck *et al.*, 2004).

Para prevenir os danos sistêmicos e hepáticos provocados pelo EO, o uso de antioxidantes tem sido proposto como terapia alternativa e/ou como fármaco auxiliar na terapêutica (Moreira *et al.*, 2015).

A SOD é uma das principais enzimas que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos prejudiciais das ERO. Ela atua como primeira linha de defesa contra o EO, convertendo radicais superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Ighodaro e Akinloye, 2018). A redução na expressão da SOD nos animais que receberam DEN demonstra um consumo das defesas antioxidantes, contra o EO (Kujawska *et al.*, 2016), o que pode ocorrer em razão do aumento da utilização da SOD para o processo de dismutação de ânions superóxido gerados pela ação da DEN. Nosso estudo demonstrou que os animais tratados com MLT diminuíram a LPO e aumentaram os níveis de SOD, apresentando valores semelhantes aos do grupo controle achados semelhantes aos de Moreira *et al.* (2015).

Quando o EO e o processo inflamatório não são interrompidos, temos um estímulo para uma resposta fibrótica que se torna irreversível, com desarranjo do parênquima e lesão à função hepática. Como consequência da injúria ao fígado (pelos xenobióticos, vírus e reações auto-imunes), as CEHs são ativadas, aumentando, assim, a síntese de colágeno e a expressão de algumas citocinas - aqui avaliadas - com potentes estímulos às células para a síntese da matriz extracelular e consequente aumento da fibrose.

A transdução de sinais intracelulares leva à estimulação da  $\alpha$ -SMA, um indicador de ativação das CEHs. A  $\alpha$ -SMA é um conhecido marcador de miofibroblastos hepáticos que tem um papel na produção de proteínas contráteis, conforme observado, nesse estudo, na análise histológica e evidenciado pelo arranjo nodular e por septos fibróticos.

A MLT diminuiu significativamente a expressão da  $\alpha$ -SMA (Figura 27) e reduziu a fibrose, conforme observado pela formação de septos incompletos de fibrose e nódulos na avaliação pela coloração de Picrosirius (Figura 24) (Moreira *et al.*, 2015; Bona *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019).

A DEN induz dano oxidativo que estimula a fosforilação do I $\kappa$ B e libera NF $\kappa$ B na porção p65 para atuar no núcleo e estimular a transcrição de genes responsáveis na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas na promoção da fibrose.

Neste estudo, a DEN induziu a fosforilação do I $\kappa$ B com base no aumento da expressão nuclear de NF $\kappa$ B/p65 e no concomitante aumento na expressão da iNOS.

No presente estudo, a expressão de iNOS no extrato citoplasmático e a expressão de NF $\kappa$ B/p65 no extrato nuclear apresentaram aumento nos animais cirróticos e expressão diminuída desses parâmetros em animais tratados com MLT.

A regulação do sono é considerada a principal função da MLT, mas não a única. Estudos experimentais e clínicos mostram que a MLT possui potente efeito antioxidante, significativa atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (Reiter *et al.*, 2013; Mauriz *et al.*, 2013; Carrillo-Vico *et al.*, 2005) e propriedades oncostáticas (Srinivasan *et al.*, 2011; Acuña-Castroviejo *et al.*, 2014), além de modular vários fatores de transcrição, entre eles, o NF $\kappa$ B (Palomo, 2013; Markus, Cecon e Pires-Lapa, 2013; Ostrycharz *et al.*, 2020).

O aumento da expressão de iNOS e NF $\kappa$ B/p65 está relacionado a processos inflamatórios agudos e crônicos. Observamos, com nossos resultados, o papel da MLT no controle do processo inflamatório e na regulação da expressão da proteína NF $\kappa$ B/p65, achados que corroboram com os de Bona *et al.* (2018), que observaram menor expressão de iNOS e NF $\kappa$ B/p65 em animais tratados com MLT no modelo experimental de cirrose induzido por tetracloreto de carbono em ratos.

No presente estudo a MLT reduziu significativamente a expressão do NF $\kappa$ B/p65 (Figura 29) e reduziu o processo inflamatório evidenciado pelo decréscimo na expressão da iNOS (Figura 28). Dessa forma, a MLT atuou como agente anti-inflamatório.

Na análise histológica, por coloração de HE, observamos que a MLT reduziu o infiltrado inflamatório e regenerou o tecido hepático, sugerindo um efeito hepato protetor da MLT.

O modelo de DEN leva ao aumento de ERO induzindo à oxidação do DNA, sendo a principal causa da desregulação genômica (Tice *et al.*, 2000; Picada *et al.*, 2003). Ao observar o grupo DEN na Figura 30, percebe-se que a cirrose exibe um aumento de danos ao DNA, sugerindo uma instabilidade genômica, avaliada pelo ensaio cometa.

Liu, R. *et al.* (2013), por meio do EC demonstraram, em seu estudo, que células pré-tratadas com MLT apresentaram uma redução nos danos ao DNA, em comparação com células não tratadas com MLT após exposição ao mutagênico (metilmetoxissulfonato). Neste estudo, analisado pelo ensaio cometa, observou-se que a MLT reduziu tanto o índice quanto a frequência de dano ao DNA em animais submetidos à DEN, sendo capaz de prevenir danos genotóxicos, bem como preveniu a quebra de fitas de DNA e a oxidação de bases de DNA. O EC demonstrou a capacidade da MLT em proteger o material genético.

Nossos resultados corroboram com o estudo de Moreira *et al.* (2015), que utilizou o modelo experimental de carcinoma hepatocelular induzido por DEN e demonstrou uma redução no índice e na frequência de dano nos grupos tratados com MLT, possivelmente devido à capacidade antioxidante da MLT de regular vários genes envolvidos nas vias de reparo do DNA, reduzindo o dano oxidativo, o processo inflamatório e o dano ao parênquima hepático confirmado pela histologia.

A presença de MN em células em divisão indica o dano genômico sem possibilidade de reparo (Carrard *et al.*, 2007; Miguel *et al.*, 2022). Damiani *et al.* (2020) observaram que a suplementação com MLT é associada a baixos índice e frequência de dano ao DNA quando avaliados por MN em camundongos *Swiss*. No presente estudo, não foram observadas alterações, no grupo DEN e DEN+MLT, na frequência e no índice de danos, portanto não houve nenhuma atividade mutagênica com o uso da MLT (Figura 31).

O uso de drogas que tenham ação no fígado, impedindo que ocorram alterações moleculares, inflamatórias e danos celulares é a meta das investigações

translacionais, que visam o uso de substâncias antioxidantes, as quais podem impedir a evolução de doenças crônicas.

Os modelos experimentais de cirrose são ideais para verificar a ação da MLT em várias fases da fisiopatogenia evolutiva da fibrose, impedindo sua cronificação e, inclusive, diminuindo-a. Os medicamentos que impedem a evolução da cirrose podem ser úteis no tratamento dessa doença crônica nas fases iniciais, diminuindo suas complicações e impedindo o tratamento final, que é o transplante hepático.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho que:

- ✓ O modelo de cirrose hepática induzida por DEN foi eficaz e a MLT restaurou as provas de integridade hepática (ALT, AST e FA).
- ✓ A MLT restaurou o parênquima hepático, diminuindo a fibrose hepática e, conseqüentemente, os nódulos instalados, o que ficou evidenciado pela diminuição na expressão de  $\alpha$ -SMA.
- ✓ A MLT diminuiu a LPO e aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD.
- ✓ A MLT diminuiu o processo inflamatório, a julgar pela diminuição dos níveis de iNOS e NF $\kappa$ B.
- ✓ A MLT diminuiu os danos ao DNA, o que ficou evidenciado pelo ensaio cometa.

Nossos resultados sugerem que o uso de MLT, nesse modelo experimental, foi eficaz e pode ser um potencial tratamento, necessitando, entretanto, maiores estudos clínicos no futuro.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cirrose é a via comum final do processo de fibrose hepática. Ela provoca formação difusa de nódulos e capilarização dos sinusoides hepáticos, com formação de *shunts* vasculares e regeneração anárquica do parênquima hepático. Até pouco tempo, era considerada irreversível. No entanto, novos estudos vêm demonstrando que há meios de impedir a progressão do processo fibrogênico e, até mesmo, de regredi-lo.

Dados do presente estudo corroboram com as afirmações prévias de que a MLT tem um grande potencial antioxidante, anti-inflamatório e anti-fibrogênico.

Esperamos que o atual estudo contribua elucidando o conhecimento das vias de sinalização e o estabelecimento do EO, da inflamação e da formação de fibrose hepática.

## **8 PERSPECTIVAS FUTURAS**

O impacto de um novo estudo na aplicação de novas terapias muitas vezes não acompanha a pesquisa biomédica translacional. Porém acreditamos que estudos adicionais para a translação do conhecimento obtido com esse estudo resulte em uma aplicabilidade real, como um novo conceito terapêutico, e proporcione benefícios diretos aos pacientes. Porém, mais estudos a longo prazo necessitam ser feitos para melhor elucidação da relação entre os eventos aqui descritos.

Na continuidade ao estudo, serão avaliados marcadores envolvidos no estresse de retículo endoplasmático e nas proteínas de choque térmico. Assim, será possível estreitar o eixo bancada experimental e o leito hospitalar, propiciando uma pesquisa translacional.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, Darío *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 20 fev. 2014.
- AXELROD, Julius; WEISSBACH, Herbert. Enzymatic O-Methylation of N-Acetylserotonin to Melatonin. **Science**, v. 131, n. 3409, p. 1312-1312, 29 abr. 1960.
- AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-31, 2014.
- BÄCHTOLD, G. Introdução aos antioxidantes. Radicais livres. 2013. Disponível em: <https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/05/26/introducao-aos-antioxidantes/>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- BADIANI, N. Liver + biliary anatomy. 2016. Disponível em: <https://quizlet.com/165506921/liver-biliary-anatomy-flash-cards>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- BANSAL, Meena B.; CHAMROONKUL, Naichaya. Antifibrotics in liver disease: are we getting closer to clinical use?. **Hepatology International**, v. 13, n. 1, p. 25-39, 9 out. 2018.
- BAR-OR, David *et al.* Oxidative stress in severe acute illness. **Redox Biology**, v. 4, p. 340-345, abr. 2015.
- BINGÜL, İlknur *et al.* Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 529-538, set. 2013.
- BOLOGNESI, Claudia *et al.* Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1-3, p. 127-136, out. 2004.
- BONA, Silvia *et al.* Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. **Isrn Gastroenterology**, v. 2012, p. 1-7, 2 abr. 2012.
- BONA, Silvia *et al.* Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study. **Protoplasma**, v. 252, n. 3, p. 825-833, 5 nov. 2014.
- BONA, Silvia *et al.* Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **Jgh Open**, v. 2, n. 4, p. 117-123, 24 maio 2018.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976.

BRASIL, Luis Josino *et al.* Modelo experimental de indução de lesão oxidativa hepática em ratos por halotano. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 1, p. 73-77, mar. 2007.

BRENNER, Catherine *et al.* Decoding cell death signals in liver inflammation. **Journal Of Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 583-594, set. 2013.

BRUCK, Rafael *et al.* Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. **Journal Of Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 86-93, jan. 2004.

BRZOZOWSKI, Thomas; JAWOREK, Jolanta. Editorial (Thematic Issues: basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. new advancements and future perspectives). **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 30, p. 4785-4787, 31 ago. 2014.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods In Enzymology**, p. 302-310, 1978.

CALFEE-MASON, Karen G.; SPEAR, Brett T.; GLAUERT, Howard P.. Vitamin E Inhibits Hepatic NF- $\kappa$ B Activation in Rats Administered the Hepatic Tumor Promoter, Phenobarbital. **The Journal Of Nutrition**, v. 132, n. 10, p. 3178-3185, 1 out. 2002.

CARRARD, V C *et al.* Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, 2007. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/7512>. Acesso em: 20 ago. 2022.

CARRILLO-VICO, Antonio *et al.* A Review of the Multiple Actions of Melatonin on the Immune System. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 189-200, 2005.

CERRETANI, D *et al.* Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF $\alpha$ -mediated apoptosis in rat liver. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 5, p. 517-527, nov. 2011.

CHANCE, B; SIES, H; A BOVERIS,. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, jul. 1979.

CHENG, Guo *et al.* Plant-derived melatonin from food: a gift of nature. **Food & Function**, v. 12, n. 7, p. 2829-2849, 2021.

CIPOLLA-NETO, J.; Afeche, S C. Glândula Pineal. *In*: AIRES, MM. **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 981-990.

COELHO, Julio Cezar Uili. **Aparelho digestivo clínica e cirúrgica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2012. p. 2240.

COLARES, Josieli Raskopf *et al.* Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 28, n. 3, p. 348-364, 21 jan. 2022.

COLARES, Josieli Raskopf *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 22, n. 40, p. 8918, 2016.

COSTA, Ernane J X *et al.* Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **Journal Of Pineal Research**, v. 19, n. 3, p. 123-126, out. 1995.

COSTA, Renata *et al.* The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1083-1099, nov. 2003.

CRUZ, Adolfo *et al.* Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. **Journal Of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 143-150, 23 mar. 2005.

DICKINSON, Bryan C; CHANG, Christopher J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, 18 jul. 2011.

DOMÈNECH, Elena B.; MARFANY, Gemma. The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 347, 23 abr. 2020.

EL-MAGD, Mohammed A *et al.* Melatonin maximizes the therapeutic potential of non-preconditioned MSCs in a DEN-induced rat model of HCC. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108732, jun. 2019.

EL-MISSIRY, M A *et al.* Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 278-286, fev. 2007.

FENECH, Michael *et al.* Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. **Mutation Research/Reviews In Mutation Research**, v. 786, p. 108342, out. 2020.

FERNANDES, Sabrina Alves *et al.* Alteration of taste buds in experimental cirrhosis. Is there correlation with human hypogeusia? **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 53, n. 4, p. 278-284, dez. 2016.

FEVRE-MONTANGE M. "Melatonin". **Presse médicale**, v. 14, n. 31, p.1659-1663, 1985.

FRIEDMAN, Scott L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 8, p. 425-436, 29 jun. 2010.

FRIEDMAN, Scott L. Hepatic Stellate Cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, jan. 2008.

GAPTULBAROVA, K A et al. NF- $\kappa$ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer. **Experimental oncology**, v. 42, n. 4, p. 263-269, 2020.

GARDNER, Ernest; GRAY, Donald J.; O'RAHILLY, Ronan. **Anatomia: Estudo Regional do Corpo Humano**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R.. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, jan. 2017.

GOLDANI, Helena A *et al.* The role of food restriction on CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis model in rats. **Experimental And Toxicologic Pathology**, v. 58, n. 5, p. 331-337, abr. 2007.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Bárbara *et al.* Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells. **Biofactors**, v. 43, n. 2, p. 272-282, 1 nov. 2017.

GUTTERIDGE, John M.C.; HALLIWELL, Barry. 1 Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillière'S Clinical Haematology**, v. 2, n. 2, p. 195-256, abr. 1989.

GUYTON, A.C. e Hall J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M C. Free Radicals. *In: **Biology and Medicine***. 5ed. (Oxford, 2015; online edn, Oxford Academic, 22 Oct. 2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>. Acesso em: 15 set. 2022.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M C. Free radicals. *In: **Biology and medicine***. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, Barry. Free Radicals and Antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 27 abr. 1994.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 26 abr. 2012.

HALLIWELL, Barry. How to Characterize a Biological Antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-32, jan. 1990.

HALLIWELL, Barry. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 1 jun. 2006.

HALLIWELL, Barry. The antioxidant paradox: less paradoxical now?. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 637-644, 5 fev. 2013.

HARATAKE, J., HISAOKA, M., YAMAMOTO, O., & HORIE, A. Morphological changes of hepatic microcirculation in experimental rat cirrhosis: a scanning electron microscopic study. **Hepatology**, v. 13, n. 5, p. 952-956, maio 1991.

HE, Yuzhe *et al.* The role of SIRT3-mediated mitochondrial homeostasis in osteoarthritis. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 3729-3743, 28 maio 2020.

HERNAEZ, Ruben *et al.* Acute-on-chronic liver failure: an update. **Gut**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 541-553, 4 jan. 2017.

HERNANDEZ-GEA, Virginia; FRIEDMAN, Scott L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 425-456, 28 fev. 2011.

HINZ, Boris *et al.* Recent Developments in Myofibroblast Biology. **The American Journal Of Pathology**, v. 180, n. 4, p. 1340-1355, abr. 2012.

IGHODARO, O.M.; AKINLOYE, O.A.. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal Of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 1 dez. 2018.

KIM, Moon Young *et al.* Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. **Journal Of Hepatology**, v. 55, n. 5, p. 1004-1009, nov. 2011.

KOCH, Birgit C P *et al.* Circadian sleep–wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 7, p. 407-416, 26 maio 2009.

KRENKEL, Oliver *et al.* Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 503, 24 maio 2019.

KUJAWSKA, Małgorzata *et al.* Protective effect of yellow tea extract on N-nitrosodiethylamine-induced liver carcinogenesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1891-1900, 3 fev. 2016.

KUZNIETSOVA, Halyna *et al.* Water-Soluble Pristine C60 Fullerenes Inhibit Liver Fibrotic Alteration and Prevent Liver Cirrhosis in Rats. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-14, 15 fev. 2020.

LATIEF, Uzma; UMAR, Mohammad Faisal; AHMAD, Riaz. Nrf2 protein as a therapeutic target during diethylnitrosamine-induced liver injury ameliorated by  $\beta$ -carotene-reduced graphene oxide ( $\beta$ C-rGO) nanocomposite. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 346-357, set. 2019.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LINGAPPAN, Krithika. NF- $\kappa$ B in oxidative stress. **Current Opinion In Toxicology**, v. 7, p. 81-86, fev. 2018.

LIU, R *et al.* Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. **BMC Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 327-345, jan. 2013.

LLESUY Susana *et al.* Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*, v. 20, n. 71, p. 241-249, jun. 1985.

MADANKUMAR, Perumal *et al.* Morin ameliorates chemically induced liver fibrosis in vivo and inhibits stellate cell proliferation in vitro by suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 277, n. 2, p. 210-220, jun. 2014.

MARCOLIN, Éder *et al.* Quercetin decreases liver damage in mice with non :alcoholic steatohepatitis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 6, p. 385-391, 21 mar. 2013.

MARKUS, Regina; CECON, Erika; PIRES-LAPA, Marco. Immune-Pineal Axis: nuclear factor kb (nf-kb) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 10979-10997, 24 maio 2013.

MARRONI, Claudio Augusto *et al.* Clinical and Experimental Alcoholic Liver Disease. **Journal of Liver and Clinical Research**, v.3, n. 2, p.1028, set. 2016.

MATEUCA, R *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, nov. 2006.

MATHES, Alexander M. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 16, n. 48, p. 6087, 2010.

MAURIZ, José L *et al.* A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal Of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 24 jun. 2013.

MAVOURNIN, Kathleen H *et al.* The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews In Genetic Toxicology**, v. 239, n. 1, p. 29-80, jul. 1990.

Miguel Fabiano Moraes *et al.* Melatonin Attenuates Inflammation, Oxidative Stress, and DNA Damage in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by a Methionine-

and Choline-Deficient Diet. **Inflammation**. 2022 Apr 13. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10753-022-01667-4#citeas>. Acesso em: 09 ago. 2022.

MINICIS, Samuele de *et al.* Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. **Digestive And Liver Disease**, v. 45, n. 6, p. 450-459, jun. 2013.

MOHAMED, Nagwa I.; SUDDEK, Ghada M.; EL-KASHEF, Dalia H.. Molsidomine alleviates acetic acid-induced colitis in rats by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. **International Immunopharmacology**, v. 99, p. 108005, out. 2021.

MOLINA-AGUILAR, Christian *et al.* Time-caloric restriction inhibits the neoplastic transformation of cirrhotic liver in rats treated with diethylnitrosamine. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 8, p. 847-858, 23 maio 2017.

MOREIRA, Andrea Janz *et al.* Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144517, 11 dez. 2015.

MOREIRA, Andrea Janz *et al.* Ductular reaction, cytokeratin 7 positivity, and gamma-glutamyl transferase in multistage hepatocarcinogenesis in rats. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 911-920, 15 ago. 2017.

NOVO, Erica *et al.* Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 548, p. 20-37, abr. 2014.

OLESHCHUK, Oleksandra *et al.* Hepatoprotective Effect of Melatonin in Toxic Liver Injury in Rats. **Medicina**, v. 55, n. 6, p. 304, 24 jun. 2019.

OSTRYCHARZ, Ewa *et al.* Melatonin Protects Cholangiocytes from Oxidative Stress-Induced Proapoptotic and Proinflammatory Stimuli via miR-132 and miR-34. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9667, 18 dez. 2020.

PALOMO, Andrés García. **Análisis in vitro del efecto oncostático de la melatonina en hepatocitos tumorales de la línea HepG2**. 2013.Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – IBIOMED, Universidad de León, Espanha, 2013.

PARK, Min-Koo *et al.* Effects of fermented rice bran on DEN-induced oxidative stress in mice: gstp1 , line :1 methylation, and telomere length ratio. **Journal Of Food Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. e13274, 28 maio 2020.

PAROLA, Maurizio; PINZANI, Massimo. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 65, p. 37-55, fev. 2019.

PESCADOR, Sara Carbajo. **Efecto de la melatonina sobre la proliferación, apoptosis y angiogénesis en un modelo in vitro de hepatocarcinoma**. 2013.Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – IBIOMED, Universidad de León, Espanha, 2013.

PICADA, Jaqueline Nascimento *et al.* Genotoxic effects of structurally related  $\beta$ -carboline alkaloids. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 379, n. 2, p. 135-149, out. 1997.

PICADA, Jaqueline Nascimento *et al.* DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. **Molecular Brain Research**, v. 114, n. 1, p. 80-85, maio 2003.

PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

SANCHES-FILHO Pedro José *et al.* Pre-concentration of nitrosamines from aqueous samples by SPE and MEKC. **Química Nova**, v, 26, n. 2, p. 193-196, mar. 2003.

RAMACHANDRAN, Prakash *et al.* Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 8, p. 457-472, 1 jun. 2020.

REITER, R J *et al.* Antioxidant capacity of melatonin. *In*: CADENAS, E; PACKER, L (Edt.). **Handbook of antioxidants**. 2a ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 565-614.

REITER, Russel J *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal Of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 1 set. 2016.

REITER, Russel J *et al.* Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 2, p. 293-307, 16 out. 2013.

REITER, Russel J.; TAN, Dun-Xian; GALANO, Annia. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. **Frontiers In Physiology**, v. 5, p. e377, 6 out. 2014.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F.. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, maio 2002.

ROBINSON, Mark W; HARMON, Cathal; O'FARRELLY, Cliona. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 267-276, 11 abr. 2016.

ROBINSON, Stuart M.; MANN, Derek A.. Role of nuclear factor  $\kappa$ B in liver health and disease. **Clinical Science**, v. 118, n. 12, p. 691-705, 30 mar. 2010.

ROCKEY, Don C.. Translating an Understanding of the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis to Novel Therapies. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 224-231, mar. 2013.

ROSA, Carlos Gustavo Sakuno *et al.* Sarcopenia, oxidative stress and inflammatory process in muscle of cirrhotic rats – Action of melatonin and physical exercise. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 121, p. 104662, ago. 2021.

SALVI, Jéferson de Oliveira *et al.* A melatonina modula a resposta antioxidante e protege os hepatócitos de ratos com insuficiência hepática aguda grave. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 7, n. 2, p. 280–312, 2020.

SANCHEZ-VALLE, V *et al.* Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 4850-4860, 1 out. 2012.

SANTOS, Nuno Paula; COLAÇO, Aura Antunes; OLIVEIRA, Paula Alexandra. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: a review. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 101042831769592, mar. 2017.

SCHEMITT, Elizângela Gonçalves *et al.* Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. **World Journal Of Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 273-286, 27 mar. 2019.

SCHEMITT, Elizângela Gonçalves *et al.* Efecto de la glutamina en el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de rata con insuficiencia hepática fulminante. **Nutrición Hospitalaria**, v. 33, n. 2, p. e92, 25 mar. 2016.

SCHULIEN, Isabel; HASSELBLATT, Peter. Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. **Methods In Cell Biology**, p. 137-152, 2021.

SHARMA, Supriya *et al.* Dendrimer-conjugated podophyllotoxin suppresses DENA-induced HCC progression by modulation of inflammatory and fibrogenic factors. **Toxicology Research**, v. 8, n. 4, p. 560-567, 2019.

SIES, Helmut. Strategies of antioxidant defense. **European Journal Of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, jul. 1993.

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P.. Oxidative Stress. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748, 20 jun. 2017.

SILVA, Camila Tainah da; JASIULIONIS, Miriam Galvonas. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SILVA, Juliana da *et al.* An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics And Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 241-245, mar. 2000.

SILVEIRA, Leonardo R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-822, dez. 2004.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**, 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, Narendra P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 111-127, nov. 2000.

SNOWDON, Victoria K.; FALLOWFIELD, Jonathan A.. Models and Mechanisms of Fibrosis Resolution. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 35, n. 5, p. 794-799, 1 fev. 2011.

SOUZA, Lucas Petimteberte *et al.* Antioxidant Evaluation of the Aqueous Extract of Hulls of *Campsiandra laurifolia* in Colitis Induced by Acetic Acid in Wistar Rats. **Journal of Coloproctology**, v. 41, n. 02, pp. 138-144, ago 2021.

SRINIVASAN, Venkatramanujam *et al.* Melatonin, Immune Function and Cancer. **Recent Patents On Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 109-123, 1 maio 2011.

TAN, Dun-Xian *et al.* The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. **Cancer Letters**, v. 70, n. 1-2, p. 65-71, jun. 1993.

TAROCCO, Anna *et al.* Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 4, p. e317, abr. 2019.

TICE, R R *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 6 jun. 2000.

TIEPPO, Juliana *et al.* Quercetin Administration Ameliorates Pulmonary Complications of Cirrhosis in Rats. **The Journal Of Nutrition**, v. 139, n. 7, p. 1339-1346, 3 jun. 2009.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn *et al.* Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, ago. 2008.

TRAVACIO, Marina; LLESUY, Susana. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Ciência e Cultura**, v. 48, n. 1/2, p. 9-13, jan. 1996.

TU, Honggang *et al.* Evaluation of the liver and blood micronucleus, and comet assay end points in a 14-day repeated-dose study with methyl carbamate and 1,3-propane sultone. **Mutagenesis**, v. 36, n. 6, p. 401-406, 13 set. 2021.

VERNA, L; WHYSNER, J; WILLIAMS, G M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, dna-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 71, n. 1-2, p. 57-81, 1996.

VILLELA, Izabel Vianna *et al.* DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, jun. 2006.

XU, Jianzhen *et al.* Challenge-comet assay, a functional and genomic biomarker for precision risk assessment and disease prevention among exposed workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 397, p. 115011, jun. 2020.

YARIPOUR, Saeid, EBRAHIMI, Shahriar, MOHAMMADI, Ali. Quantitative analysis of phenobarbital in biological fluids: Analyte enrichment by an electrically-assisted microextraction technique. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, e17839, abr. 2020.

WEISKIRCHEN, Ralf; WEISKIRCHEN, Sabine; TACKE, Frank. Organ and tissue fibrosis: molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 65, p. 2-15, fev. 2019.

ZAHRA, Kamal Fatima *et al.* The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: a double view on the role of the antioxidants. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1-25, 5 ago. 2021.

## ANEXOS

ANEXO A: Carta de aprovação do Projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa.



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 160029

**Data da Versão do Projeto:** 05/04/2016

**Pesquisadores:**

NORMA ANAIR POSSA MARRONI

ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEMITT

SILVIA BONA

**Título:** Ação da melatonina sobre a cirrose hepática induzida por dietilnitrosamina

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 13 de abril de 2016.

  
Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA

## ANEXO B: ARTIGO

**MELATONIN REVERSES DNA DAMAGE AND THE CIRRHOTIC EFFECT  
OF DIETHYLNITROSAMINE (DEN) IN RATS**

**Marilda S Brasil<sup>1,2</sup>, Silvia Bona<sup>2</sup>, Elizângela G Schemitt<sup>2</sup>, Sandielly RB  
Fonseca<sup>2</sup>, Gabriela S Martins<sup>1,2</sup>, Jaqueline N Picada<sup>3</sup>, Norma P Marroni<sup>1,2</sup>**

1 Graduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Experimental Laboratory of Pneumological Sciences and Inflammation - Center  
of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto  
Alegre-RS, Brazil

3 Cellular and Molecular Biology Program, Lutheran University of Brazil (ULBRA),  
Canoas-RS, Brazil

Submetido para publicação na revista *Hepatology Forum*

