



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

WELMA EMIDIO DA SILVA

**Ação da melatonina exógena na cirrose hepática experimental e seus
efeitos sobre o rim e baço de ratos albinos**

RECIFE

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

WELMA EMIDIO DA SILVA

**“Ação da melatonina exógena na cirrose hepática experimental e seus
efeitos sobre o rim e baço de ratos albinos”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2017

WELMA EMIDIO DA SILVA

“Ação da melatonina exógena na cirrose hepática experimental e seus efeitos sobre o rim e baço de ratos albinos”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof^o. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares – UFRPE

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial é de meu Deus, que me permitiu chegar até aqui e realizar esse sonho. Ele foi sempre meu refúgio, minha base de fortalecimento e meu guia. Foram inúmeras as provas de sua presença e proteção em minha vida.

Devo agradecimentos também aos meus pais, Joel Cândido da Silva e Miriam Maria de Oliveira Silva, que me ensinaram que a simplicidade e a humildade nos tornam grandes. São minhas fortalezas e educadores eternos. Pessoas que sei que posso contar sempre, independente do que for.

À Luan Carlos, meu sobrinho (detectado com Síndrome de West há 4 anos), e minha irmã, Joelma Emidio da Silva, devo minha vontade de continuar e lutar sempre. Com eles aprendi que o pouco que temos é muito e que não temos o direito de sequer pensar em desistir, seja qual for a dificuldade que encontrarmos.

A meu marido e filho amados, Adonias de Lima Ferreira e Davi Silva Ferreira, devo minhas desculpas pelas ausências, sempre fiz o possível para estar o máximo com eles. Os agradeço por nunca me deixarem ir sozinha nos finais de semana e feriados na Universidade Federal Rural de Pernambuco para aplicar a melatonina nos animais (Gato foi o nome do primeiro animal que Davi aprendeu a falar, de tanto brincar com os que vivem próximos ao biotério) e por compreenderem meu sonho (Davi já não bate mais na porta do quarto quando estou estudando).

Ao Professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, devo todo meu respeito e gratidão pelos ensinamentos, seriedade, respeito e profissionalismo. O agradeço pelo acolhimento e paciência, quando aqui cheguei inexperiente. À professora Valéria Wandelely Teixeira, agradeço não apenas pela contribuição dada a essa pesquisa, mas pelo exemplo de mulher e profissional que me deu em todos esses anos de convivência.

Não posso deixar de expressar meu total respeito, gratidão e admiração ao professor Leucio Duarte Vieira Filho, por toda contribuição dada a essa pesquisa. Nunca esquecerei que mesmo doente, passou o dia nos ajudando “na bancada” para que o procedimento desse certo. É um exemplo de profissional.

À Cintia Giselle Martins Ferreira, Carolline Guimarães D'assunção e Aline Ferreira da Silva Mariano, não tenho como expressar meu agradecimento. São

pessoas que contribuíram diretamente para que tudo desse certo, sempre estando disponíveis para ajudar, mesmo sendo feriado (são pessoas que nasceram para serem pesquisadoras). Elas são mais que colegas de laboratório, são amigas para a vida inteira.

Àos amigos: Hilda Michelly Paiva dos Santos, Bárbara Brooklyn Timoteo Nascimento Silva, Ismaela Maria Ferreira de Melo, Solange Bezerra da Silva e Clovis Lapa Neto, meu muito obrigada por tudo. Agradeço por existirem em minha vida, pois são pessoas que posso contar sempre! São muito competentes no que fazem.

Aos professores do programa da Pós-Graduação em Biociência Animal, agradeço por todo conhecimento compartilhado. Admiro o profissionalismo de cada um, e a disponibilidade de ajudar no que podem quando solicitado.

Aos funcionários do biotério: Marcos André e Renata Carneiro da Silva, sou grata pela amizade e presteza com os animais.

Agradeço ao departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela disponibilização de suas dependências para a realização dos experimentos.

À Capes/ Cnpq agradeço pelo apoio financeiro disponibilizado.

RESUMO

A cirrose é uma doença crônica e progressiva, sendo responsável por elevado índice de mortalidade no mundo. De quadro patológico complexo, em estágio avançado, vários órgãos são danificados e o quadro se torna irreversível, motivo pelo qual diversos estudos buscam novas opções terapêuticas para essa doença. Por a melatonina ser citada na literatura como um potente agente antioxidante capaz de regular vários processos fisiológicos em mamíferos, objetivamos avaliar o efeito desse hormônio no fígado, rins e baço de animais induzidos a cirrose hepática. Para isso, foram utilizados 25 ratos albinos, com 60 dias de idade, os quais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: **Grupo I** - ratos controle; **Grupo II** – ratos induzidos à cirrose hepática com tioacetamida durante 8 semanas; **Grupo III**- ratos induzidos à cirrose hepática com tioacetamida e tratados com melatonina, simultaneamente, durante 8 semanas; **Grupo IV**- ratos induzidos à cirrose hepática com tioacetamida durante 8 semanas e depois tratados com melatonina por mais oito semanas; **Grupo V** - ratos induzidos à cirrose hepática com tioacetamida durante 8 semanas e mantidos por oito semanas sem melatonina. A cirrose foi induzida com três aplicações semanais de tioacetamida na dosagem de 200 mg/Kg, por via intraperitoneal. A melatonina foi administrada diariamente na dosagem de 20 mg/Kg por 8 semanas, pela mesma via de administração. Foram realizadas análises histopatológicas, histoquímicas, imunohistoquímicas, mensuração do colágeno, níveis de óxido nítrico, análises bioquímicas de função hepática e renal, morfometria renal, hemograma e análise de estresse oxidativo tecidual. Os resultados mostraram que a melatonina atuou como reparador e protetor

contra a cirrose mantendo as características morfológicas do fígado, bem como evitou a fibrose. Além disso, manteve os níveis de glicose e das enzimas AST, ALT, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, albumina, globulina e proteína total. Preveniu o aumento de lípidio no fígado, aumentou GSH, reduziu a peroxidação lipídica e os níveis de citocinas pro inflamatórias e índice apoptótico. Quanto aos rins e baços, a melatonina também preveniu e melhorou os efeitos da cirrose nestes órgãos, mantendo a estrutura e função dos glomérulos renais, bem como o perfil hematológico. Também aumentou GSH, reduziu a peroxidação lipídica e os níveis de citocinas pro inflamatórias. Assim, conclui-se que a melatonina atua não apenas de forma protetora contra a cirrose, mas também reduzindo os danos causados por essa patologia no tecido hepático, renal e esplênico.

Palavras-chave: Cirrose Hepática, Melatonina, Rim, Baço, Ratos albinos.

ABSTRACT

Cirrhosis is a chronic and progressive disease, being responsible for a high mortality rate in the world. Of complex pathological condition, at an advanced stage, several organs are damaged and the picture becomes irreversible, reason why diverse studies search new therapeutic options for this disease. Melatonin is mentioned in the literature as a potent antioxidant agent capable of regulating several physiological processes in mammals, we aimed to evaluate the effect of this hormone in the liver, kidney and spleen of animals induced liver cirrhosis. For this, 25 albino rats, 60 days old, were randomly divided into 5 groups: Group I – control rats; Group II – rats induced the hepatic cirrhosis with thioacetamide for 8 weeks; Group III: - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide and treated with melatonin simultaneously for 8 weeks; Group IV - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide for 8 weeks and then treated with melatonin for another eight weeks; Group V - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide for 8 weeks and maintained for eight weeks without melatonin. Cirrhosis was induced with three weekly applications of thioacetamide at the dosage of 200 mg / kg intraperitoneally. Melatonin was administered daily at a dosage of 20 mg / kg for 8 weeks, by the same route of administration. Histopathological, histochemical, immunohistochemical, collagen measurements, nitric oxide levels, biochemical analyzes of liver and renal function, renal morphometry, hemogram and analysis of tissue oxidative stress were performed. The results showed that melatonin bound as a repairer and protector against cirrhosis maintaining the morphological characteristics of the liver, as well as avoiding fibrosis. In addition, it maintained the levels of glucose and enzymes AST, ALT, gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, albumin, globulin and total protein. It prevented the increase of lipid in the liver, increased GSH, reduced lipid peroxidation and levels of proinflammatory cytokines and apoptotic index. As for the kidneys and spleens, melatonin also prevented and improved the effects of cirrhosis on these organs, maintaining the structure and function of the renal glomeruli, as well as the hematological profile. It also increased GSH, reduced lipid peroxidation and proinflammatory cytokine levels. Thus, it is concluded that melatonin acts not only in a protective way

against cirrhosis but also reduces the damage caused by this pathology in the hepatic, renal and splenic tissues.

Key words: Hepatic Cirrhosis, Melatonin, Kidney, Spleen, Albino Rats.

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. Introdução.....	23
2. Revisão de Literatura.....	26
2.1. Fígado.....	26
2.2. Cirrose	30
2.3. Modelo experimental de cirrose hepática pela tiocetamida....	35
2.4. Complicações da cirrose hepática.....	39
2.5. Biomarcadores de alteração hepática e renal.....	45
2.5. Estresse oxidativo e defesa antioxidante do organismo.....	50
2.6. Potencial terapêutico da melatonina	53
3. Referências	58
II	
Melatonina protege e reverte cirrose induzida pela tioacetamida em ratos	82
Resumo	83
Introdução	85
Material e Métodos	86
Resultados	92
Discussão	108
Agradecimentos	112
Referências	112
III	
Efeito da melatonina exógena sob o rim e baço de ratos cirróticos.....	120
Resumo	121
Introdução	123
Material e Métodos	125
Resultados	131
Discussão	145
Referências	149

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Pág.
Figura 1: Estrutura hepática de seres humanos e de ratos. Em (A) mostra os lobos direito e esquerdo, separados pelo ligamento falciforme. Em (B) mostra a representação do fígado de rato, o qual é constituído por quatro lobos: lobo mediano (LM), lobo lateral esquerdo (LLE), lobo lateral direito (LLD) e lobo caudado (LC)	26
Figura 2. Ilustração esquemática da organização básica do tecido hepático normal. Os sinuzóises formam uma rede altamente anastomosada que separa uma placa hepática da outra. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontramse o espaço de disse e entre os cordões de hepatócitos, os canalículos biliares.....	28
Figura 3. Arquitetura hepática normal e com injúria. Em (A) mostra a presença de células estreladas quiescentes (em azul) e células de Kupffer (em roxo). Em (B) mostra o espaço subendotelial com acúmulo de Matriz Extracelular.....	29
Figura 4. Metabolismo de ativação da tioacetamida (TAA) no fígado. No fígado, a TAA sofre ação da enzima CYP2E1 e se tranforma em Tioacetamida-S,Sdióxido (TASO) na primeira etapa. Na segunda etapa, novamente pela ação da CYP2E1, TASO se converte no metabélito altamente reativo Tioacetamida-S, S dióxido (TASO2). TASO2 se liga covalente a macromoléculas fígado, causando lesão hepática	38
CAPÍTULO II	
Figura 1: Fígado dos animais dos grupos experimentais. A – controle; B – induzidos à cirrose por 8 semanas; C – induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D - induzidos à cirrose +	

tratamento com melatonina por 8 semanas e; em E - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Verificar presença de lóbulos irregulares em B e E. Asterisco - veia centro lobular, seta longa - hepatócito, seta curta - sinusóide. Coloração H.E..... 96

Figura 2: Fígado dos animais dos grupos experimentais corados pelo Ácido Periódico de Schiff e quantificação do glicogênio hepático. A e GI- controle; B e GII – induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels do glicogênio hepático. Verificar marcação intensa em C e D. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 97

Figura 3: Fígado dos animais dos grupos experimentais corados pelo picrossírius e quantificação de fibras colágenas. A e GI- controle; B e GII – induzidos à cirrose por 8 semans; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels de fibras colágenas. Verificar intensa marcação interlobular em B e E. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 98

Figura 4: Detecção de lipídios. Coloração: Oil Red. A – controle; B – induzidos à cirrose por 8 semanas; C – induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; em E - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Verificar intensa marcação em B e E..... 99

Figura 5: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. G I – controle; G II – induzidos à cirrose por 8 semanas; G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultâneamente por 8 semanas; G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 101

Figura 6: Peroxidação Lipídica (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$) 102

Figura 7: Dosagem de óxido nítrico no fígado dos animais dos grupos experimentais G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 103

Figura 8: Imunohistoquímica e quantificação do IL6. A e GI – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV– induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL6.

Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn $p < 0,05$)..... 104

Figura 9: Imunohistoquímica e quantificação do TNF α . A e GI – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do TNF α . Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 105

Figura 10: Imunohistoquímica e quantificação do VEGF. A e GI – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do VEGF. Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 106

Figura 11: Índice apoptótico. G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose +

tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Observar aumento significativo nos grupos G II e G V. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 107

CAPÍTULO III

Figura 1: Níveis de ceatinina (mg/dl) no plasma dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 135

Figura 2: Níveis de uréia (mg/dl) no plasma dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 136

Figura 3: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas

pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 137

Figura 4: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos baços dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 138

Figura 5: Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 139

Figura 6: Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) nos baços dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). 140

Figura 7: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 nos rins dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle, B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas, C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento

com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas, E e GV-induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas, F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL-6. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 141

Figura 8: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no baço dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV-induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL-6. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 142

Figura 9: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α nos rins dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV-induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF- α . Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 143

Figura 10: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no baço dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento

com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV-induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF- α . Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$)..... 144

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Pág.

Tabela 1. Média das dosagens sericas das enzimas indicadoras da função hepática e glicose nos animais dos grupos experimentais.....	100
--	-----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Morfometria dos rins dos animais dos grupos experimentais.....	133
--	-----

Tabela 2. Parâmetros hematológicos dos animais dos grupos experimentais.....	134
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AST** – Aspartato aminotransferase
- ALB** – Albumina
- ALT** – Aspartato aminotransferase
- CAT** – Catalase
- CCL₄** – Tetracloreto de carbono
- CH** – Cirrose hepática
- CHEs** – Células hepáticas estreladas
- CTH** – Contagem total de Hemácias´
- CTL** – Contagem total de Leucócitos
- CYP2E1** – Citocromo P450 2E1
- DMN** – Dimetilnitrosamina
- DNA** – Ácido desóxirribonucleico
- EREN** – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- FA** – Fosfatase alcalina
- GGT** – Gama glutamil transferase
- GLOB** - Globulinas
- GPx** – Glutathiona peroxidase
- GSH** – glutathiona reduzida
- HP** – Hipertensão portal
- Ht** - Hematócrito
- IL- 6** - Interleucina 6
- IL- 10** – Interleucina 10
- MEC** – Matriz extracelular
- MEL** – Melatonina
- NK** – Natural killer
- NO** – Óxido nítrico
- PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PPT** – Proteína plasmática total
- SOD** – Superóxido desmutase

SHP – Síndrome hepato renal

TAA – Tioacetamida

MMP - Metaloproteinases

TASO – Tioacetamida sulfóxido

TASO₂ – Tioacetamida-S,S-dióxido

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde no mundo (ELSHARKAWY; OAKLEY; MANN, 2005; SCHUPAN; AFDAHAL, 2008). Dentre as diversas doenças hepáticas crônicas, a cirrose está entre as dez causas de morte mais comuns no mundo, no Brasil, ela é responsável por elevados índices de morbimortalidade, internações hospitalares repetitivas e absenteísmo no trabalho, gerando elevados custos para a saúde e economia do país (VARGAS; FRANÇA, 2007).

Trata-se de uma doença crônica e progressiva, caracterizando-se por modificações das unidades histológicas básicas do fígado com a formação de nódulos de regeneração, desarranjo e morte dos hepatócitos, associado ao aumento difuso de tecido conjuntivo, o que leva a redução progressiva da função hepática (RHODEN, et al, 1997; STALKER; HAYES, 2007; FRIEDMAM, 2008). Estas alterações estruturais constituem as principais respostas do tecido hepático às inúmeras agressões de natureza inflamatória, tóxica, viral, metabólica ou congestiva (HEIDELBAUGH; SHERBONDY, 2006; TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006).

Com a progressão da doença, a deterioração das funções hepáticas se agrava, podendo chegar a um estágio irreversível, gerando danos ao organismo e colocando em risco a vida do indivíduo (VARGAS; FRANÇA, 2007). Suas consequências consistem em sequelas em múltiplos órgãos e sistemas do organismo como rins, pulmões, baço, sistema cardiovascular e neurológico. Assim, complicações como cardiomiopatia cirrótica, síndrome hepatorenal, varizes esofágicas, síndrome hepatopulmonar, encefalopatia, ascite, metabolismo de drogas alterado e hepatocarcinomas, são comuns na cirrose (SHERLOCK; DOOLEY, 2004; SCHUPAN; AFDAHAL, 2008).

Segundo Lida et al (2005) e Schupan e Afdal (2008), a evolução do paciente cirrótico é insidiosa e geralmente assintomática ou marcada por sintomas inespecíficos até que suas complicações se apresentem, o que dificulta o diagnóstico precoce e leva ao agravamento da doença. Isto é preocupante, pois

em estágios avançados, o tratamento definitivo é o transplante hepático (FRIEDMAN, 2004; IREDALE, 2007; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

Tendo em vista a problemática da cirrose na saúde pública, muitas pesquisas são realizadas objetivando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que promovam uma diminuição das agressões teciduais decorrentes de lesões hepáticas crônicas e conseqüente reestabelecimento da função do órgão (LYRA et al., 2007), evitando a progressão da doença e prevenindo o desenvolvimento de possíveis complicações (VARGAS; FRANÇA, 2007).

Na cirrose, tem sido descrita alterações nos mecanismos oxidantes/antioxidantes, que se encontram em desequilíbrio e contribuem em grande parte para a necrose hepática (ALEYNIK et al, 1997; PERES et al, 2000; PEREIRA-FILHO et al., 2008). Os produtos originários da peroxidação lipídica parecem estimular a expressão dos genes responsáveis pela síntese de colágeno, um dos principais componentes da fibrose, mecanismo semelhante é observado na administração crônica da TAA (TÚNEZ et al., 2005; KARANTONIS et al., 2010).

Nesse contexto, a melatonina, hormônio produzido principalmente na glândula pineal, tem sido relatada na literatura como um potente agente antioxidante capaz de regular vários processos fisiológicos em mamíferos (CARRILLO-VICO et al., 2004), atuando na atividade imunomodulatória (GUERRERO; REITER, 2002; CARRILLO-VICO et al., 2005), antiinflamatória (CHAHBOUNI et al. 2010), nas funções homeostáticas na mitocôndria (JOU et al., 2010). Sabe-se também que esse hormônio apresenta ausência de toxicidade, possibilitando seu uso em longo prazo (TENGATTINI et al., 2008), o que confere uma excelente opção para o estudo de sua ação na cirrose.

Entretanto, para Andrade (2005) e McCormick (2011), quando se discute cirrose hepática deve ficar bem claro o que se está discutindo. Não se deve confundir cirrose com fibrose, pois esta última é apenas um dos componentes de uma doença que apresenta processo patológico com vários elementos, também importantes. Desta forma, muitos estudos têm ignorado diversas alterações que acompanham essa doença, como é o caso das sequelas acarretadas em outros órgãos em função da insuficiência hepática (SHERLOCK; DOOLEY, 2004; SCHUPAN; AFDAHAL, 2008).

Diante do exposto, algumas questões quanto ao real efeito benéfico da melatonina na cirrose ainda precisam ser respondidas, pois os estudos realizados com esse hormônio, não averiguaram se seus efeitos se estendem de forma benéfica sobre os órgãos afetados por essa enfermidade, como é o caso do rim e baço, questões importantes e essenciais antes de se pensar em futuros testes clínicos com essa droga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, desempenhando uma grande variedade de funções, vitais ao funcionamento saudável do organismo (SCHINONI, 2006). Nos seres humanos, ele está normalmente localizado no quadrante abdominal superior direito, estendendo-se para o quadrante abdominal superior esquerdo, abaixo do diafragma (SHERLOK; DOOLEY, 2004; MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

Anatomicamente está dividido em duas unidades morfológicas: o lobo direito e o lobo esquerdo (MATTOS; DANTAS-CORRÊA, 2010), os quais são separados por uma prega peritoneal chamada de ligamento falciforme (SHERLOK; DOOLEY, 2004), diferentemente do que ocorre em ratos, sendo o parênquima hepático separado em quatro lobos: mediano, lateral esquerdo, lateral direito e caudado (ALLER et al., 2008) (Fig. 1).

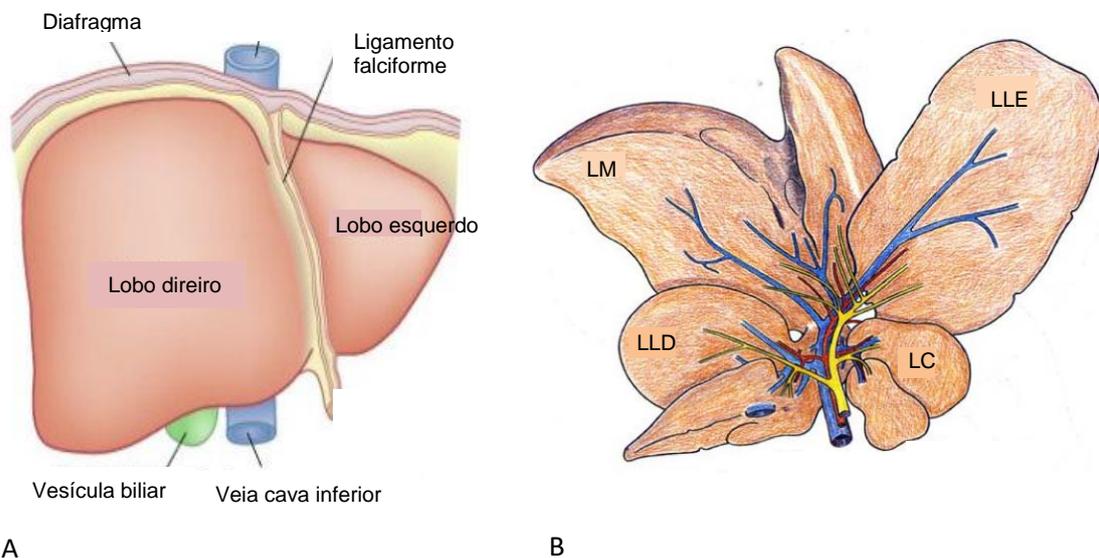


Figura 1: Estrutura hepática de seres humanos e de ratos. Em (A) mostra os lobos direito e esquerdo, separados pelo ligamento falciforme. Em (B) mostra a representação do fígado de rato, o qual é constituído por quatro lobos: lobo mediano (LM), lobo lateral esquerdo (LLE), lobo lateral direito (LLD) e lobo caudado (LC).

Fonte: Adaptado de Townsend-Jr et al. (2015); Aller et al. (2008).

Histologicamente, ele é revestido por uma capsula dealgada de tecido conjuntivo (cápsula de Glisson) que se torna mais espessa no hilo, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram no órgão e por onde saem os ductos hepáticos e linfáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A cápsula de Glisson ramifica-se enviando uma rede de septos para o parênquima hepático, dividindo-o em suas unidades básicas, os lóbulos hepáticos (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003).

Em alguns animais, como o porco, os lóbulos são separados entre si por uma nítida faixa de tecido conjuntivo, o que não acontece em humanos nem em ratos, nos quais vários lóbulos se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões periféricas de tais lóbulos existe tecido conjuntivo contendo ductos biliares, vasos linfáticos, vasos sanguíneos e nervos, sendo essas regiões chamadas de espaço porta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os lóbulos são estruturas prismáticas e poligonais de tecido hepático, formado por placas de hepatócitos (células epiteliais que compreende 60% do tecido hepático), interdigitados entre os capilares sinusóides. Cada placa, tem geralmente duas células (hepatócitos) de espessura e se irradiam a partir das veias centrais (GARTNER; HIAT, 2007; SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003).

Os sinuzóises são vasos sanguíneos de diâmetro reduzido que formam uma rede altamente anastomosada que separa uma placa hepática da outra e é pela qual o sangue dos vasos interlobulares é transportado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2023). Eles são revestidos por células endoteliais sinusoidais e por macrófagos chamados de células de Kupffer. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontram-se um espaço estreito, denominado espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas hepáticas (FRIEDMAN, 2008).

Entre os cordões de hepatócitos encontram-se, ainda, pequenos canais designados canalículos biliares, que transportam a bile até ao sistema porta, para que ocorra a sua excreção através dos canais hepáticos aí localizados (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003) (Fig. 2).

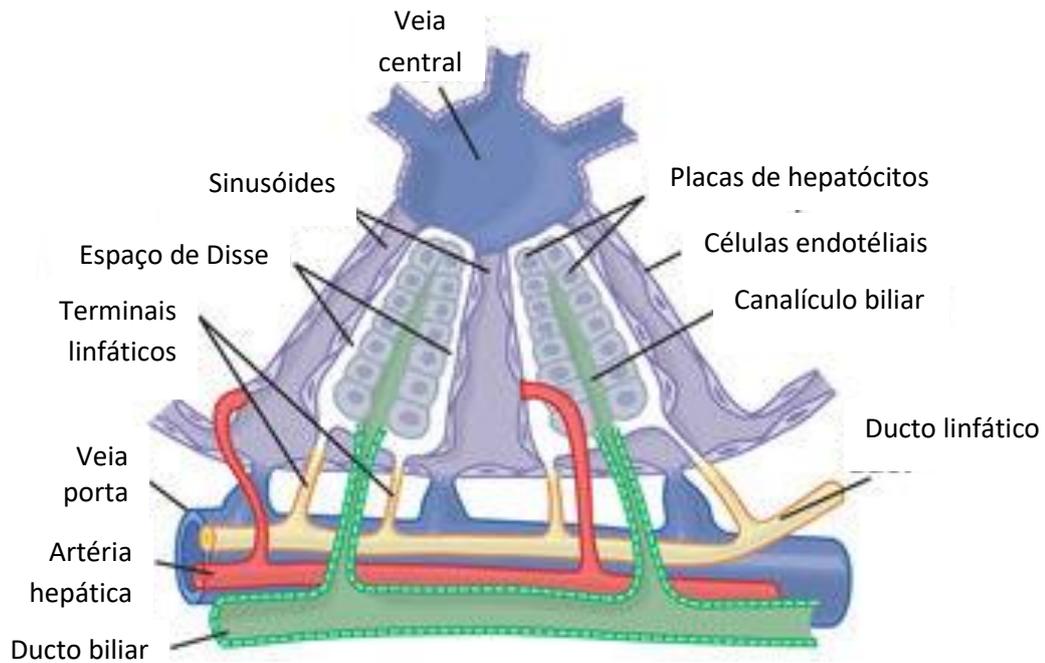


Figura 2. Ilustração esquemática da organização básica do tecido hepático normal. Os sinusóides formam uma rede altamente anastomosada que separa uma placa hepática da outra. Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontram-se o espaço de disse e entre os cordões de hepatócitos, os canalículos biliares. Fonte: Adaptado de Guyton; Hall (2011).

As células de Kupffer são macrófagos que apresentam intensa atividade fagocitária com capacidade para metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com o processo imunitário, destruir bactérias e outros patógenos que penetrem no sangue portal e produção de bilirrubina (SHERLOK; DOOLEY, 2004).

As Células Estreladas Hepáticas (CEH) ou Células de Ito, correspondem a 15% do total de células do fígado e 30% das células não parenquimatosas (BITENCOURT et al, 2012). No fígado normal, as CEHs encontram-se em sua forma quiescente, não-proliferativa, armazenadora de vitamina (ENG; FRIEDMAN, 2000; GEERTS, 2001). Durante a lesão hepática, as CEHs perdem seu conteúdo lipídico e transdiferenciam-se em células com características de miofibroblastos e adquirem propriedades fibrogênicas (LEE et al, 2003; KONG et al, 2012), depositando uma matriz fibrilar no espaço subendotelial (FRIEDMAN; ARTHUR, 2002) (Fig. 3).

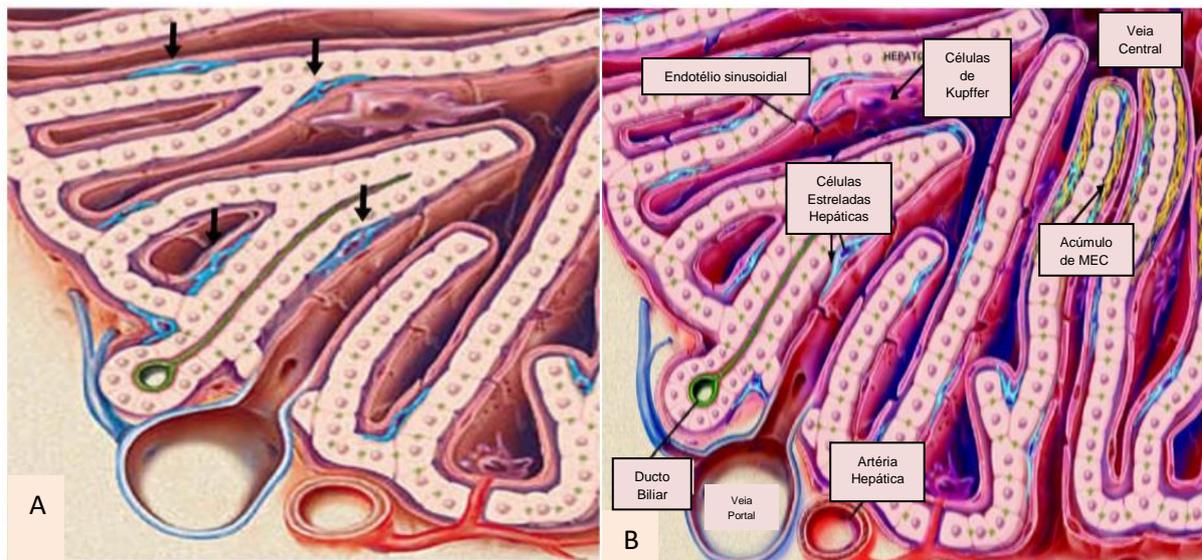


Figura 3. Arquitetura hepática normal e com injúria. Em (A) mostra a presença de células estreladas quiescentes (em azul) e células de Kupffer (em roxo). Em (B) mostra o espaço subendotelial com acúmulo de Matriz Extracelular (MEC).
 Fonte: Friedman; Arthur (2002).

Outro tipo celular existente no parênquima hepático são as células tronco hepáticas que produzem células progenitoras (células ovas) no fígado. Estas células são ativadas por hepatocarcinomas ou por injúria química aos hepatócitos e podem se diferenciar para formar hepatócitos e colangiócitos (PAKU et al, 2001).

Os linfócitos citotóxicos residentes também são células presentes no fígado, aderidas aos sinusóides. Estas células são chamadas de pit cells (LE COUTER, 2008), devido a presença de grânulos no citoplasma destas células. São células *natural killer* (NK) específicas do fígado e de características morfológicas, funcionais e imunológicas diferentes das NK do sangue (LUO et al, 2000).

Quanto à matriz extracelular (MEC), trata-se de uma rede molecular organizada que ocupa menos de 3% da área do órgão. Ela é composta por colágenos (tipo I, III, IV, V, VI, XIV e XVIII), glicoproteínas (laminina, fibronectina, tenascina e nidogen) e proteoglicanos (heparam, dermatam, sulfato de condroitina, percalam, ácido hialurônico e decorina) (RAO, 2003; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

No fígado normal, a MEC é um substrato altamente dinâmico com um sistema regulado e preciso entre síntese e degradação de seus componentes. Entretanto, no processo fibrogênico, essa regulação é perdida e há um aumento de seus múltiplos componentes (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). Além de ser responsável pela integridade funcional e estrutural do parênquima hepático, a MEC fornece manutenção, regulação e diferenciação de diversos tipos celulares (SCHUPPAN et al, 2001; RAO, 2003; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A estrutura e localização do fígado permite que ele desempenhe um grande número de funções no organismo. A secreção de bile é a principal função digestiva do fígado, no entanto, ele é essencial na regulação do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, no armazenamento de substâncias e na degradação e excreção de hormônios. Outras funções incluem a biotransformação e excreção de drogas, a hemostasia e o auxílio à resposta imune (WILLIAMS et al, 2002; SCHIONI, 2006).

Assim, a compreensão da estrutura e fisiologia hepática é fundamental para a análise dos processos patológicos que acometem o órgão (SCHIONI, 2006), pois alterações estruturais e falência das funções de suas células podem gerar danos ao organismo, afetando diversos sistemas, podendo levar o indivíduo à morte (VARGAS; FRANÇA, 2007; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008), que ocorre na cirrose hepática.

2.2. Cirrose

A cirrose é uma doença de grande importância para a medicina humana e veterinária, pois é o estágio final comum de uma série de processos patológicos diversos, como o etilismo (LARSON et al., 2005), infecções parasitárias (GRYSEELS et al., 2006), hepatites crônicas virais e autoimunes, além daquelas de ordem metabólica, vascular, biliar (IIDA et al, 2005) e criptogênica (CODES et al., 2006), sendo causa importante de morte em todo o mundo.

Independente do fator etiológico e da espécie, esta patologia caracteriza-se pela substituição do tecido hepático funcional por tecido fibroso, de forma lenta e gradativa, o que provoca alterações na estrutura hepática normal com

formação de nódulos no parênquima e alterações na vascularização do órgão, culminando na perda ou redução das funções hepáticas (BATALLER; BRENNER, 2005; VARGAS; FRANÇA, 2007; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

O desenvolvimento da doença compreende um processo patogênico complexo e dinâmico que ocorre pela combinação de três mecanismos: Morte celular, fibrose e regeneração (ANTHONY et al., 1978; ROSA et al., 2010).

Em fígados agredidos por xenobiontes, tanto a necrose quanto a apoptose cotribuem para a morte celular (BATALLER; BRENNER, 2005). A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE; PULKKI, 2000). Morfológicamente, as células em apoptose se encolhem e se codensam, o citoesqueleto colapsa, o envelope nuclear se desfaz, a cromatina nuclear se condensa e se quebram em fragmentos envoltos por membranas, chamados de corpos apoptóticos (MALHI; GUICCIARDI; GORES et al., 2010). Esses corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (MANJO; JORIS, 2004) sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). As células adjacetes migram ou proliferam para repor o espaço ocupado pela célula apoptótica (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Em contraste a apoptose, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Consequentemente ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição várias células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). O fenômeno de morte celular por necrose é facilmente reconhecido nos espécimes de biopsia hepática porque os restos celulares permanecem por longo período antes de serem removidos pelas células inflamatórias (PATEL, 2000).

Para Forbes e Parolla (2011), o processo patogenético mais importante no desenvolvimento da cirrose é a fibrose. A fibrogênese hepática, independentemente da etiologia, é um evento resultante de processos moleculares, celulares e teciduais, dinâmicos e altamente integrados, que levam a uma deposição progressiva de componentes da matriz extracelular, (FRIEDMAN, 2008), que passam a preencher espaços que, anteriormente à lesão, eram ocupados por hepatócitos (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; IREDALE, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que a célula-chave na produção da fibrose no fígado é a célula de Ito, a qual está situada no espaço de Disse, local que separa os capilares sinusóides dos hepatócitos. Em condições normais, essa célula é o principal reservatório de ácido retinóico no corpo humano (ANDRADE, 2005). Porém, em um processo de dano tecidual, são ativadas e assumem fenótipo de miofibroblastos (ANDRADE, 2005; BRENNER, 2009; ÖSTERREICHER; ÖSTERREICHER; TRAUNER, 2011).

Essa ativação resulta na produção da proteína citoesquelética α -actina de músculo liso e de componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno tipo I e III (BRANDÃO et al., 2006; FRIEDMAN, 2008), bem como a secreção de fatores de crescimento. Por fim, proliferam e atraem leucócitos e células hepáticas adjacentes para os sítios de lesão (BRANDÃO et al., 2006; KOLIOS; VALATAS; KOUROUMALIS, 2006).

Os fatores de crescimento são capazes de, não apenas manter, mas também perpetuar a fibrogênese, as respostas inflamatórias e a neo-angiogênese, através de sinalização parácrina e autócrina (FORBES; PAROLA, 2011). Além disso, se o processo fibrótico é suficientemente mantido, as CHes tornam-se capazes de sintetizar tais mediadores, matando e ampliando sua própria atividade fibrogênica (RAMADORI et al., 2008).

Segundo Gressner et al (2002), as CHes ativadas também produzem e liberam metaloproteinases (MMPS) da matriz, enzimas que degradam moléculas de colágeno. Porém, quando essas células completam o seu ciclo de ativação, elas aumentam a síntese e a liberação de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) I e II, resultando numa queda da atividade e, conseqüentemente, diminuição na

degradação da matriz, promovendo o acúmulo de tecido fibroso (SHUPPAN et al., 2001).

Numerosos estímulos ativam as células estreladas (BRANDÃO et al., 2006; KOLIOS; VALATAS; KOUROUMALIS, 2006), sendo por isso, considerado mecanismo-chave no desenvolvimento da fibrose (KISSELEVA; BRENNER, 2011). Esses estímulos são resultantes da ação de citocinas fibrogênicas como o fator de crescimento e transformante- β (TGF- β); o fator de crescimento de necrose tumoral (TNF- α) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (ANDRADE, 2005), o mitógeno mais atuante para CEHs (MARRA et al., 1994); bem como endotelina-1, que, secretada principalmente pelas células de Kupffer, hepatócitos, miofibroblastos, plaquetas e pelas próprias CEHs, estimula a produção de óxido nítrico (KINNMAN; HOUSSET, 2002). Estudos mostram que espécies reativas de oxigênio (EROs) exercem influência direta nas CEHs, aumentando a produção de matriz extra celular (FORBES; PAROLLA, 2011). Além disso, as EROs podem ativar as células de Kupffer, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas (ARENAS et al., 2004).

Segundo Tsukamoto (1999), as citocinas e fatores de crescimento constituem a principal classe de mediadores envolvidos na fibrogênese, tanto durante o processo normal de reparo, quanto na deposição excessiva de colágeno, o que induz a presença de cicatrizes, seja no fígado ou em qualquer outra doença fibroproliferativa.

Apesar de a fibrose ser mantida principalmente pela ativação de CHEs, outras células estão envolvidas na fibrogênese, tais como miofibroblastos, fibroblastos intersticiais e células epiteliais do ducto biliar (RAMADORI; SAILLI, 2004). Além disso, tanto a apoptose quanto a necrose (ROSE, 2002) parecem estar envolvidas na produção de tecido fibroso em fígados agredidos por xenobiontes.

Entretanto, a fibrogênese hepática não é marcada apenas por um aumento na síntese de tecido conjuntivo. Durante o desenvolvimento da fibrose hepática, todas as células hepáticas sofrem alterações específicas. Os hepatócitos lesionados sofrem apoptose. O macrófago residente no fígado é ativado e produz uma grande variedade de quimiocinas e citocinas (ANDRADE, 2005). Os

hepatócitos isolados por tecido fibroso desenvolvem mecanismos de proliferação com a produção de novas células hepáticas, na tentativa de compensar a perda funcional decorrente da lesão (WANLESS; NAKASHIMA; SHERMAN, 2000).

A regeneração do fígado é um processo que envolve hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do volume celular ou do conteúdo proteico na fase pré-replicação, sendo o processo dividido em três fases: fase inicial, quando os hepatócitos adquirem a capacidade de replicação; fase de proliferação, período no qual o número de células hepáticas aumenta buscando uma quantidade adequada para a restituição da função; e estágio de terminação, período em que a divisão celular é encerrada após atingir o volume de células necessárias para restituição da função (PAES-BARBOSA; FERREIRA; SZUTAN, 2010).

A tumefação e regeneração dos hepatócitos acabam por comprimir os sinusóides e o arranjo discretamente radial é perdido (COTRAN et al., 2000). Em pacientes humanos cirróticos o índice de proliferação celular é maior do em pacientes com fígado normal com tendência a decréscimo durante a evolução da cirrose (DELHAYE et al., 1996). Porém os mecanismos pela qual a regeneração de hepatócitos diminui com o aumento da severidade da cirrose continuam desconhecidos (DELHAYE et al., 1999).

Segundo Assy e Minuk (1997), o processo de regeneração hepática pode ser avaliado por diversos métodos, tais como: o peso do fígado, número de mitoses, os componentes do DNA, o índice de síntese de antígenos nucleares avaliados por imunohistoquímica, a expressão de genes, as variações dos níveis de proteínas séricas, testes sorológicos, determinações enzimáticas de marcadores de proliferação e citometria de fluxo.

Durante décadas acreditou-se que, a partir do momento em que a fibrose está estabelecida, tornaria-se irreversível (POPPER; KENT, 1975). Contudo pesquisas vêm mostrando que a fibrogênese é um processo dinâmico e potencialmente reversível (FRIEDMAN et al., 2013), pelo menos parcialmente, quando sua causa é eliminada (ANDRADE, 2005). Sendo assim, várias moléculas vêm sendo constantemente identificadas como possíveis alvos para terapias anti-fibrogênicas (SUBEQ et al., 2011).

Entretanto, a questão da regressão da fibrose ou cirrose é um assunto controverso (CHEDID, 2000). Em seu artigo, Wanless, Nakashima e Sherman (2000) descreveram uma proeminente regressão na maioria dos fígados com cirrose micronodular e macronodular, em resultado do tratamento com lamivudina (agente antiviral capaz de inibir a replicação viral). No entanto, o mesmo resultado não foi corroborado pela pesquisa de Di Vinicius et al (2005), que também abordaram o problema da reversibilidade da cirrose no rato.

Além disso, para Andrade (2005), não se deve confundir cirrose com fibrose. O que faz a peculiaridade da cirrose é um processo generalizado de regeneração nodular do parênquima, acompanhado de um complexo de alterações no tecido hepático (WANLESS; NAKASHIMA; SHERMAN, 2000; BRENNER, 2009; ÖSTERREICHER; ÖSTERREICHER; TRAUNER, 2011; PEREIRA-FILHO et al., 2008), e não apenas o componente fibroso. Desta forma, fica evidente a importância do desenvolvimento de pesquisas que venham esclarecer tais controvérsias e que objetivem a busca de novas estratégias terapêuticas para diminuição das agressões teciduais, decorrentes de lesões hepáticas crônicas, e conseqüente reestabelecimento da função hepática (LYRA et al., 2007).

2.3. Modelo experimental de cirrose hepática pela Tioacetamida

Os modelos experimentais de cirrose hepática em roedores utilizam diversos tipos de substâncias químicas tóxicas (os xenobiontes) e procedimentos cirúrgicos capazes de ocasionar experimentalmente a lesão hepática. Segundo a literatura, as principais drogas utilizadas para indução de cirrose hepática, são: tetracloreto de carbono (CCl₄), dimetilnitrosamina (DMN) e tioacetamida (TAA) (PAWA; ALI, 2004). Quanto à procedimentos cirúrgicos, a ligadura do ducto biliar é bastante utilizada em experimentos (TIEPPO et al., 2005; VERCELINO et al., 2008).

Os modelos experimentais procuram, de maneira rápida e eficiente, reproduzir as conseqüências do quadro patológico. As diferentes substâncias utilizadas para a indução da cirrose agem sob variáveis de tempo, dosagens e

condições ambientais que, experimentalmente, devem ser controladas a fim de se otimizar os estudos em laboratório (PASSOS et al., 2010).

Vários modelos conseguem um quadro patológico eficaz, contudo, o modelo em que se utiliza a TAA é o mais recente (GUERRA et al., 2009; COGLIAT et al., 2010; TROTTA et al., 2013) com detecção de sinais, sintomas e quadro patológico mais próximos aos relatados na cirrose humana (LALEMAN et al., 2006) tais como a peroxidação das membranas lipídicas, necrose celular, regeneração de hepatócitos, fibrose e reorganização micronodular do parênquima, proliferação ductular (SUN et al., 2000; JEONG et al., 2001) e finalmente, cirrose macronodular (HAKATEYAMA et al., 2002), sendo portanto, o escolhido para esta pesquisa.

A lesão causada pela TAA é consequência da oxidação lipídica das membranas dos hepatócitos (SUN et al., 2000) e de organelas tais como as mitocôndrias (NATARAJAN et al., 2006; YIN et al., 2012) e retículo endoplasmático (RON; WALTER, 2007; TANJORE et al., 2013), o que resulta na ativação da apoptose e necrose dos hepatócitos (HAJOVSKY et al., 2012).

A TAA reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica no fígado estabelecendo uma condição de estresse oxidativo (TÚNEZ et al., 2005). Os radicais livres gerados por esta via oxidativa, além de causarem peroxidação lipídica nas membranas, provocam aumento do cálcio citosólico, inibição de glutathione e redução dos grupos tiol (-sh), afetando severamente as células da região acinar, resultando na morte celular. A concentração intracelular de glutathione e os níveis de tiol atuam sobre o DNA, modulam a síntese e protegem o DNA do dano oxidativo (ZARAGOZA, et al., 2000). Além disso, a TAA altera o ciclo da uréia, o perfil de aminoácidos circulantes, o metabolismo lipídico e lipoproteico, bem como a síntese de ácidos graxos (DAVID et al., 2002).

Além das características patológicas, o uso da TAA apresenta outras vantagens como menor toxicidade para o operador em comparação com os outros xenobiontes (FONTANA et al., 1996), diversos protocolos de administração (CORBIN; MINUK, 2003) e a especificidade pelo fígado como órgão alvo (CHILAKAPATI et al., 2005) e menor mortalidade (LI et al., 2003; PASSOS et al., 2010), em relação aos demais protocolos de indução. Entretanto, a fibrose se desenvolve mais lentamente com TAA que com CCl₄, (SPIRA et al., 2002).

Contudo, essa característica é vista como mais uma característica da TAA em reproduzir adequadamente o estado crônico da doença hepática (MASUMI et al., 1999), pois geralmente são necessários anos de exposição ao agente para que a cirrose se desenvolva no homem (PASSOS et al, 2010).

Além disso, o modelo pela TAA apresenta administração por diferentes vias como a oral, por inalação, injeções intraperitoneais ou subcutâneas. As formas mais empregadas são a oral (através da água do bebedouro) e a intraperitoneal. Entretanto, apesar do método de administração oral não ser invasivo e ser de fácil indução para um grande número de animais (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), o inconveniente está na falta de controle na dosagem do fármaco administrada por animal, pois à medida que a cirrose se instala e compromete o fígado do animal, ele apresenta redução na ingestão de água e alimento, diminuindo a eficiência do tóxico, tendo como consequência a grande variação individual nas lesões resultantes e resultados heterogêneos durante o desenvolvimento do quadro patológico (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001).

A adoção da injeção intraperitoneal de TAA uniformiza a quantidade de toxina que o animal receberá, diminuindo a variabilidade observada na administração oral (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; GEORGE et al., 2001; LI et al., 2003). Contudo, há certo grau de sensibilidade hepática entre os animais após um determinado período de administração da TAA e o animal adquire resistência à droga (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

Segundo Zaragoza et al (2000), isso se deve ao envelhecimento do animal e a redução do citocromo P-450. Pois para que ocorra dano hepático, a TAA precisa passar por ativação metabólica, a qual ocorre através da ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450, localizado no retículo endoplasmático liso hepático. Este sistema enzimático é formado por várias enzimas, dentre as quais a CYP2E1 (*Cytochrome P450 2E1*) parece ser a mais implicada na bioativação dessa droga (WANG et al., 2000; BASKARAN et al., 2010).

Segundo Chilakapati et al (2005), a bioativação da TAA ocorre em duas etapas, onde há a formação dos produtos s-óxido de tioacetamida (TASO) e S-dióxido de tioacetamida (TASO₂) (Fig. 4). Estudos indicam que tanto a TASO

quanto a TASO_2 são responsáveis pela hepatotoxicidade da TAA. Pois foi observado ação da TASO na produção de necrose e carcinogênese e a TASO_2 é um metabólito instável e altamente reativo que se liga covalentemente às macromoléculas hepáticas formando acetylimidolysine. Este composto também causa dano hepático, uma vez que é capaz de provocar necrose e formação de espécies reativas de oxigênio (MANGIPUDY et al., 1995; CHILAKAPATI et al., 2007).

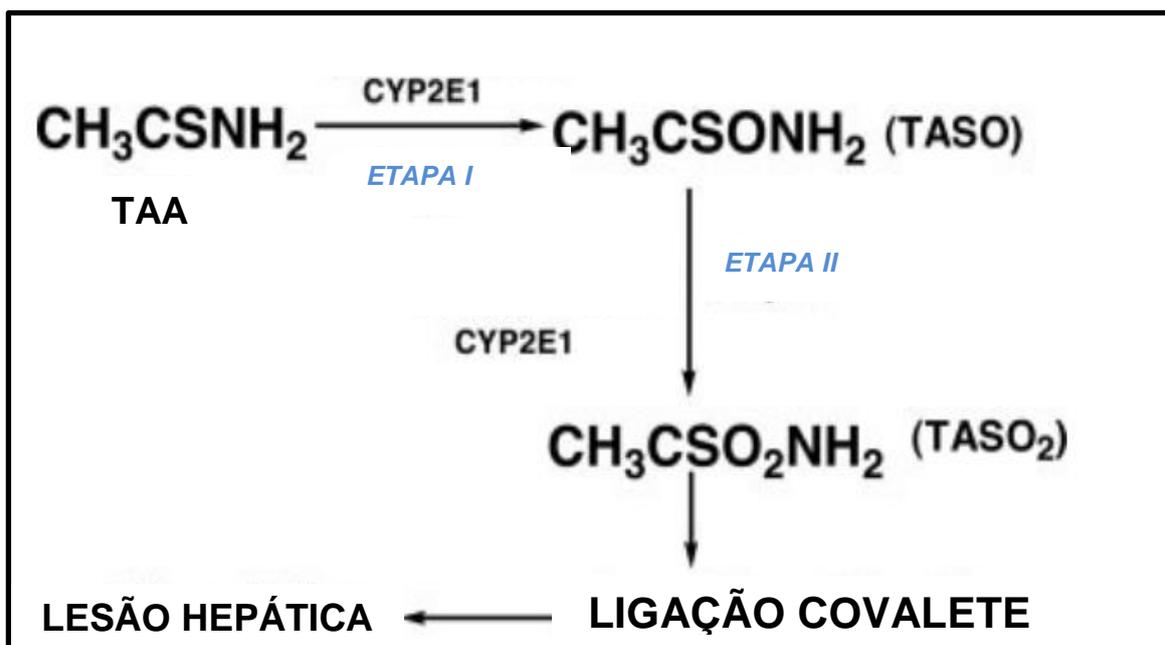


Figura 4. Metabolismo de ativação da tioacetamida (TAA) no fígado. No fígado, a TAA sofre ação da enzima CYP2E1 e se transforma em Tioacetamida-S,S-dióxido (TASO) na primeira etapa. Na segunda etapa, novamente pela ação da CYP2E1, TASO se converte no metabólito altamente reativo Tioacetamida-S,S-dióxido (TASO_2). TASO_2 se liga covalente a macromoléculas fígado, causando lesão hepática.

Fonte: Adaptado de Chilakapati et al (2005).

Quanto ao envelhecimento do animal, pesquisadores comprovaram que a extensão da lesão hepática induzida por TAA foi significativamente maior em ratos mais velhos (12 meses) que em jovens (2 meses) (ZARAGOZA et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por Sanz et al (1998), que observaram resposta menos severa à ação da TAA ($6,6 \text{ mmol Kg}^{-1}$) em filhotes

de ratos com 21 dias de idade, que nos animais adultos (6 meses de idade). Segundo estes autores, o fígado em crescimento apresenta vantagens contra a agressão necrogénica da TAA devido a atividade diminuída do seu sistema de desintoxicação microsomal específico e por o aumento da resposta proliferativa impedir a progressão da lesão. Assim, os resultados dessas pesquisas sugerem que a indução da cirrose hepática sejam mais eficazes em ratos jovens.

Além disso, pesquisadores que trabalham com modelo experimental pela TAA, recomendam que as doses da droga sejam ajustadas de acordo com o peso individual de cada animal. Estas medidas se deve a sensibilização do animal à droga no decorrer do tempo. Tal medida, minimiza a mortalidade dos animais, aumentando o rendimento da indução do quadro patológico e proporcionando uma cirrose homogênea (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002; PASSOS et al., 2010).

2.4. Complicações da cirrose hepática

O fígado, estrutura primordialmente afetada pela patologia supracitada, desempenha funções extremamente importantes no que se refere à produção, armazenamento, biotransformação e excreção de uma variedade de substâncias envolvidas no metabolismo. Dentre elas, destacam-se: regulação da concentração sanguínea de glicose, conversão de amônia (substância tóxica ao organismo) em uréia, síntese de vitaminas e proteínas plasmáticas, secreção de bile (COTRAN et al., 2000; SMELTZER; BARE, 2005) e o metabolismo de xenobióticos, compostos estranhos ao organismo que precisam ser metabolizados para se tornarem ativos ou serem excretados (DUFOUR, 2000). Portanto, os distúrbios hepáticos geram consequências desastrosas para o organismo como um todo (VARGAS; FRAÇA, 2007).

A disfunção hepática na cirrose ocorre de forma lenta e progressiva (RHODEN et al., 1997), gerando danos ao organismo e colocando em risco a vida do indivíduo (COTRAN et al., 2000; SMELTZER; BARE, 2005). Suas consequências consistem em sequelas em múltiplos órgãos do organismo, acarretando uma grande diversidade de consequências clínicas (COTRAN et al., 2000; IIDA et al., 2005; SMELTZER; BARE, 2005), como: ascite, hemorragia

digestiva, encefalopatia hepática, icterícia, peritonite bacteriana espontânea e carcinoma hepatocelular (GARCIA-TSAO, 2001; IIDA et al., 2005). Segundo Coelho et al. (2010), a alta morbidade e mortalidade da cirrose são secundárias a essas complicações.

Devido ao objetivo de estudar o rim e o baço nesse trabalho, alterações nos mesmos serão destacados neste referencial teórico.

2.4.1. Rim

Os rins são órgãos excretores, com morfologia classicamente definida em forma de grão de feijão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estão localizados no espaço retroperitoneal da parede abdominal posterior, cada um do lado da coluna vertebral, na altura da 12^a vértebra torácica à terceira vértebra lombar, sendo o rim direito ligeiramente mais inferior, devido a posição do fígado (GENESER, 2003; GARTNER; HIATT, 2007; ROSS; PAWLINA, 2012).

Possuem uma cápsula de tecido conjuntivo denso, com muitos miofibroblastos na porção interna. Exibem uma borda lateral convexa e uma borda medial côncava, na qual se situa o hilo. Neste entram e saem os vasos sanguíneos e linfáticos e os nervos e emerge a pelve renal, a parte superior e expandida do ureter (OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, 2008).

Histologicamente, são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e o parênquima apresenta duas regiões distintas, a zona cortical e a zona medular (ROSS; PAWLINA, 2008). A zona cortical possui estruturas vasculares, os corpúsculos renais (ou de Malpighi), onde o sangue é filtrado. A zona medular possui seis a 18 pirâmides medulares, sendo, portanto, multilobar. As bases das pirâmides situam-se no limite corticomedular e o ápice é voltado para o hilo (GENESER, 2003; GARTNER; HIATT, 2007; ROSS; PAWLINA, 2012). Ainda segundo esses autores, uma pirâmide medular e o tecido cortical adjacente constituem um lobo renal e os ductos coletores abrem-se na extremidade da papila, formando a área crivosa ou cribiforme.

A unidade funcional do rim, o néfron, consiste em uma porção dilatada, o corpúsculo renal e um sistema de túbulos (ROSS; PAWLINA, 2008), que incluem o túbulo contorcido proximal, partes delgadas e espessas da alça de Henle e o

túbulo contorcido distal. O túbulo coletor conecta o túbulo contorcido distal aos fragmentos corticais ou medulares dos ductos coletores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O corpúsculo renal (ou de Malpighi) consiste no glomérulo, um enovelamento de capilares (arteríolas aferentes e eferentes), e na cápsula de Bowman, que possui dois folhetos: um externo, o folheto parietal, de epitélio simples pavimentoso, e outro interno, acolado aos capilares, o folheto visceral, formado por células epiteliais modificadas, os podócitos. O espaço entre a camada visceral e a camada parietal é chamado de espaço subcapsular, que recebe o líquido filtrado através das paredes dos capilares e do folheto visceral da cápsula (BERNE et. al., 2004; ROSS; PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Além das células endoteliais e dos podócitos, os capilares glomerulares contém, ainda, um grupo de células denominadas células mesangiais. Estas células não estão inteiramente confinadas ao corpúsculo renal, estando algumas, fora do corpúsculo ao longo do pólo vascular, onde também são chamadas de células reticuladas, e fazem parte do que é denominado aparelho justaglomerular (ROSS; PAWLINA, 2008), o qual regula o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (BERNE et al., 2004).

Os vários segmentos do sistema de túbulos dos néfrons determina a quantidade de substâncias contidas na urina (BERNE et al., 2004), sendo, portanto, responsáveis pela manutenção e regulação da composição do líquido extracelular e para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Além disso, funcionam como um órgão endócrino, pois sintetizam e secretam eritropoietina (que regula a formação das hemácias em resposta à diminuição da concentração de oxigênio no sangue) e renina (enzima envolvida no controle da pressão arterial e do volume sanguíneo) (AIRES, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

O volume de filtrado formado por unidade de tempo é conhecido com a taxa de filtração glomerular (TFG). A capacidade de filtrar um enorme volume de plasma permite aos rins excretar grandes quantidades de produtos residuais e regular os constituintes do meio interno com muita precisão (EATON; POOLER, 2016). A TFG é a soma das intensidades de filtração de todos os néfrons em funcionamento. Assim, a TFG é o índice da função dos rins. O conhecimento da

TFG é essencial na avaliação da gravidade e do desenvolvimento da doença renal. Quando ocorre queda na TFG, geralmente, significa que a doença está progredindo, enquanto o aumento na TFG geralmente sugere o restabelecimento da função renal (BERNE; LEVY, 2000).

Dentre as doenças que mais afetam os rins está a cirrose. A vasodilatação sistêmica que apresenta no quadro de cirrose, decorrente da superprodução de óxido nítrico, reduz a perfusão dos rins, e ativa sistemas vasoconstritores renais (GARCIA-TSAO; PARIKH; VIOLA, 2008). Além disso, a imunodepressão dos cirróticos aumenta a chance de ocorrer doenças infecciosas (WASMUTH et al., 2005), que podem agravar a vasodilatação sistêmica e precipitar injúria renal aguda.

A Síndrome Hepatorrenal (SHR) é uma condição clínica que ocorre em pacientes com doença hepática avançada, insuficiência hepática e hipertensão portal, caracterizada por uma deterioração da função renal (WADEI et al., 2006). Segundo Garcia-Tsao, Parikh e Viola (2008), a injúria renal aguda ocorre em aproximadamente 19% dos pacientes hospitalizados com insuficiência hepática, aumentando o risco de morte. Além disso, quando a insuficiência renal passa a ser crônica, torna-se uma condição patológica irreversível, caracterizada pela perda da capacidade de manutenção da homeostase pelos rins, onde o transplante é a única solução (PARMAR, 2002; WADEI et al., 2006).

Contudo, esse procedimento terapêutico é de alto risco e bastante invasivo, dificultado também pela baixa disponibilidade de órgãos pelo sistema de saúde. Muitos pacientes vão a óbito ainda na fila de espera por um transplante (LYRA et al., 2007). Além disso, a dependência do paciente transplantado por medicamentos imunossupressores e a probabilidade de uma possível rejeição ao novo órgão são fatores de risco que envolve o transplante (YAN et al., 2008).

Como o rim desempenha uma grande variedade de funções, o paciente com insuficiência renal pode desenvolver disfunções em vários sistemas, como muscular, ósseo, cardiovascular, metabólico e respiratório (VIOLAN et al., 2002; CUISTI et al., 2004; MCINTYRE et al., 2006), afetando a qualidade de vida e colocando a vida do indivíduo em risco.

Ainda devemos ressaltar que eliminação de fármacos, decorrentes da desintoxicação pelos hepatócitos, ocorrem por via biliar ou por via renal, após

passagem pela circulação sanguínea no último caso. Este processo é muito importante para o metabolismo e eliminação de fármacos, assim como dos seus metabolitos (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003), esse fato, conseqüentemente, pode acarretar em nefrotoxicidade (DEKANT, 2001).

2.4.2. Baço

Alterações no baço também são relatadas tanto em pacientes cirróticos (BEM et al, 2006; COELHO et al., 2010) quanto na cirrose experimental (SOYLU et al., 2006). Isso torna-se preocupante, pois o baço é um órgão de extrema importância para o organismo, sendo o local onde ocorre as respostas imunológicas a antígenos veiculados pela circulação, enquanto os linfonodos respondem a antígenos transportados pela linfa. Ele contém aproximadamente 30% do total de linfócitos de um indivíduo, funcionando como filtro pela ação dos macrófagos, que retiram de circulação as hemácias senescentes e partículas estranhas como as bactérias e parasitas (DE FRANCESCHI et al., 2005; ERTEKIN; SELIMOGLU; PIRIM, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Além disso, citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , assim como citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 são amplamente sintetizadas no baço (LAMAS; MARTÍNEZ; MARTI, 2004). Evidências têm mostrado que a produção de IL-10 pelas células B neste órgão, desempenham um papel regulatório na supressão da resposta imune (PESTKA et al., 2004).

Sua estrutura e localização no corpo humano, justificam as funções desempenhadas por esse órgão. Pois ele é o maior acúmulo de tecido linfóide do organismo e, na espécie humana, o único órgão linfóide interposto na circulação sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), estando situado no peritônio, no quadrante superior esquerdo do abdômen, atrás do estômago e, abaixo do diafragma (GARTNER; HIAT, 2007).

Nos humanos, tem a forma e o tamanho de um punho fechado (4x8x12cm) e pesa 180 a 250g no adulto. Entretanto, nos coelhos, ratos e camundongos, este órgão não apresenta morfologia ovóide, mas em forma de tira (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Histologicamente, ele é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a qual emite trabéculas que dividem o

parênquima esplênico em compartimentos incompletos, e irrigado pela artéria esplênica, que penetra na cápsula na região do hilo, ramificando-se progressivamente em vasos menores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

O parênquima do baço (polpa esplênica) é formada por tecido conjuntivo linfoide, contendo células e fibras reticulares. Histológica e funcionalmente divide-se em duas regiões: polpa branca, descontínua e constituída pelos nódulos linfáticos; e em polpa vermelha, formada pelos cordões esplênicos ou de Billroth, entre os quais se situam os sinusóises (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; GENESER, 2003).

Na polpa branca, as arteríolas são envolvidas por uma capa de linfócitos que são predominantemente T (70% CD4+ e 30% CD8+) e constituem a camada linfoide periarteriolar. Na polpa vermelha, as arteríolas terminam em sinusoides vasculares que estão situados em uma região de baixa densidade celular constituída por macrófagos, células dendríticas, linfócitos e plasmócitos. O sangue dos sinusoides drena para as vênulas e daí para a veia esplênica, que leva o sangue do baço até a circulação portal (GENESER, 2003; ROSS; PAWLINA, 2012; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Dessa forma, drogas podem ter efeito direto no baço ou causar alterações em sua estrutura em decorrência de distúrbios em outros órgãos, principalmente fígado e sistema hematoimunitário (PETROIANU, 2011). Segundo Bem et al (2006) e Coelho et al (2010), alterações no baço são relatadas em pacientes cirróticos e na cirrose induzida experimentalmente (SOYLU et al., 2006). Na maior parte dos casos, portanto, a esplenomegalia se caracteriza como efeito colateral do distúrbio hepático (PETROIANU, 2011).

Esse órgão é capaz de aumentar as suas dimensões mais do que todos os outros órgãos (20 vezes), o que geralmente ocorre de maneira lenta e quase imperceptível, até alcançar dimensões avantajadas. O aumento desse órgão pode ser sede de infartos, dores intensas e até mesmo levar a uma ruptura, situação que exige intervenção imediata para evitar choque hipovolêmico (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013). Na maioria dos casos, o tratamento da ruptura esplênica pode ser conservador, por esplenorrafia, ligadura vascular seletiva, esplenectomia parcial ou total. Neste último procedimento, implantes

autógenos de tecido esplênico serão suturados ao omento maior para manter as funções desse órgão (PETROIANU; NETO, 2004; PETROIANU; ANDRADE, NETO, 2008).

As principais manifestações laboratoriais das esplenomegalias são as citopenias periféricas, isoladas ou combinadas. A mais comum é a trombocitopenia, seguida de anemia e mais raramente de granulocitopenia. Essas manifestações devem-se à retenção e eventual destruição de células no baço, fenômeno acompanhado de hiperplasia dos precursores na medula óssea. Em condições normais, cerca de 10% das plaquetas que estão em circulação encontram-se no baço. Nas esplenomegalias esse valor pode chegar a 90%, ou seja, pode haver nove vezes mais plaquetas retidas no baço do que no restante da circulação (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013).

Diante do exposto, podemos enfatizar que a cirrose hepática apresenta uma série de alterações clínicas, que vão além de alterações na estrutura e função do fígado (IIDA et al., 2005), o que se torna preocupante, visto que a gravidade da cirrose é dependente dessas complicações devastadoras (COELHO et al., 2010). Além disso, Coelho et al (2010) ainda afirmam que a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes com cirrose podem ser melhoradas pela prevenção e pelo tratamento das complicações.

2.5. Biomarcadores de alterações hepática e renal

2.5.1. Biomarcadores de alteração hepática

Um conjunto de testes e medidas bioquímicas são rotineiramente realizados em laboratórios clínicos em amostras de plasma ou soro. Este grupo de testes comumente inclui as dosagens de: transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), albumina (ALB) e bilirrubina (BAYNES, DOMINICZAK, 2007),

Esses testes bioquímicos fornecem informações sobre o estado do fígado de paciente, sendo um método muito útil para o reconhecimento das doenças que afetam a funcionalidade hepática (GOMES et al., 2008), uma vez que a maioria

das proteínas plasmáticas são sintetizadas no fígado e as doenças hepatocelulares podem alterar a síntese proteica, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Entretanto, algumas enzimas não são órgão-específicas, ou seja, estão presentes em vários tecidos do organismo, elevando-se mais frequentemente em pacientes com doença hepática, podendo refletir dano ao fígado (PRATT; KAPLAN, 1999), razão pela qual vários autores as denominam enzimas hepáticas.

As AST e a ALT não são específicas do fígado. A AST pode ser encontrada no músculo cardíaco, rins, cérebro e hemácias (GIANNI; TESTA; SAVARINO, 2005). Já a ALT, pode ser encontrada em outros locais como músculo, coração, rins, cérebro e tecido adiposo, porém, com fração maior no fígado (SCHINDHELM et al., 2006). No entanto, elas estão relacionadas com a integridade dos hepatócitos e quando ocorrem lesões ou destruição das células hepáticas, há liberação destas enzimas para a circulação sanguínea, sendo que a sua localização auxilia o diagnóstico e prognóstico de patologias hepáticas (MOTTA, 2000).

AST e ALT são enzimas intracelulares presentes nos hepatócitos e de escolha para o auxílio de diagnóstico. A AST encontra-se presente na mitocôndria (em torno de 80%) e ALT no citoplasma (MOTTA, 2009). Assim, em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (MOTTA, 2000). Além disso, ambas estão envolvidas na interconversão de amino e cetoácido, sendo necessárias para o metabolismo hepático do nitrogênio e carboidratos (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Assim, tanto o aumento de AST quanto de ALT confirma a origem hepática da lesão (MINUK, 1998; BAYNES, DOMINICZAK, 2007).

A FA é uma enzima responsável pelo transporte de metabólitos através das membranas celulares. Ela não é específica do fígado (BAYNES, DOMINICZAK, 2007), sendo sintetizada tanto pelo trato biliar como pelos ossos, placenta e, em menor quantidade, no intestino delgado (GIANNI; TESTA; SAVARINO, 2005). No entanto, patologias do fígado e dos ossos são a causa mais comuns de elevação dos valores da FA (DUFOUR et al., 2000, LOOMBA, 2013). Entretanto, para se certificar que a elevação dessa enzima é de origem hepática, há

necessidade de se dosar em conjunto com a GGT, que provavelmente mostrará elevada se houver distúrbio hepático (MINCIS; MINCIS, 2007).

A GGT é uma enzima que possui como função, catalisar a transferência de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, síntese proteica e peptídica e regulação dos níveis teciduais de glutatona (MOTTA, 2009). Ela está presente nos hepatócitos, nas células do epitélio biliar, nos túbulos renais, pâncreas e intestino (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; MANNING; AFDAHAL, 2008). No entanto, a sua atividade plasmática provém majoritariamente do fígado, onde se localiza no epitélio dos canalículos biliares (DUFOUR et al., 2000; LOOMBA, 2013). Assim, seus níveis se elevam em situações onde os ductos biliares intra-hepáticos estão comprometidos, podendo avaliar a função hepatobiliar (ANDRADE et al., 1992; MOTTA, 2009).

A utilização da GGT como teste de função hepática é justificada por ser um marcador de fibrose progressiva, sendo importante para identificar estágios mais avançados da doença, pois reflete anormalidades da estrutura e da função hepática. É um indicador de colestase mais específica do que a FA e a sua alta concentração plasmática é característica da cirrose. OS níveis plasmáticos aumentados de FA e GGT indicam origem hepatobiliar da lesão (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; MANNING; AFDAHAL, 2008; SCHUPAN; AFDHAL, 2008).

Além das enzimas já citadas, a ALB e a bilirrubina também são rotineiramente realizadas em laboratórios clínicos em amostras de soro e plasma (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). A ALB é uma proteína usualmente utilizada em testes de função hepática, isso porque ela é a proteína mais abundante no plasma, perfazendo um total de 50% das proteínas totais do soro humano (SANTOS et al., 2004). Ela é sintetizada exclusivamente no fígado e concentrações baixas no plasma ocorrem comumente na doença hepática (BAYNES, DOMINICZAK, 2007). Ela desempenha papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-básico do organismo, no transporte de uma ampla variedade de substâncias fisiológicas, também serve como sítio de ligação para muitas drogas, além de atuar como um reservatório de aminoácidos (SANTOS et al., 2004).

O fígado também sintetiza a maioria das globulinas (GLOB). A concentração plasmática dessas GLOB modifica-se nas hepatopatias e doenças sistêmicas

(BAYNES, DOMINICZAK, 2007). A GLOB juntamente com a ALB compõe a proteína plasmática total (PPT) (BANKS, 1992).

A bilirrubina é um produto da degradação da hemoglobina, mais precisamente do grupo heme, ocorrida no baço. A bilirrubina, que é insolúvel, circula ligada à albumina até atingir o fígado, onde é conjugada com ácido glucorônico, tornando-se solúvel e possível de eliminar através da bile (HOULIHAN; ARMSTRONG; NEWSOME, 2011). Em indivíduos saudáveis, a bilirrubina conjugada encontra-se ausente da circulação sanguínea (DUFOUR et al., 2000; GILMORE; GARVEY, 2013).

Diversas conclusões podem ser obtidas através de análises laboratoriais. Entretanto, mesmo na presença de graves lesões, dosagens séricas dos marcadores de função hepática podem mostrarem-se inalterados (BORGES, 1998). Dessa forma, a avaliação da função e lesão hepáticas não deve incluir apenas essas dosagens e deve ser sempre correlacionada com a clínica do paciente (SCHINONI, 2006).

2.5.2. Biomarcadores de alteração renal

O rim desempenha processos essenciais à manutenção da vida e, quando se desenvolve uma patologia renal, alguns desses processos ou todos podem ser afetados (NUNES, 2007). Desta forma, o estudo da função e dos diversos processos patológicos renais tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, principalmente no campo do desenvolvimento de testes que auxiliem a estabelecer um diagnóstico precoce, classificar a doença de base, obter prognóstico seguro e monitorar terapêutica medicamentosa (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

Vários testes são possíveis de realizar com a finalidade de avaliar a função renal, no entanto, há conflitos entre a praticidade, custo e segurança. A determinação dos níveis da uréia e da creatinina no plasma sanguíneo têm sido classicamente indicados para a avaliação da função renal (BRITO et al, 2005; NUNES, 2007), fornecendo subsídios, quer sejam para o diagnóstico ou prognóstico de inúmeras nefropatias.

Segundo Mitch (2001), os níveis séricos de creatinina e uréia são dois importantes fatores para se avaliar a taxa de filtração glomerular (TGF), níveis estes que podem estar elevados ou diminuídos em determinadas situações. A creatinina é o principal indicador da função renal, e a elevação de seus níveis no sangue é observada principalmente quando há lesão dos néfrons funcionantes (AL-HABORI et al., 2002). Ela é um produto endógeno do metabolismo muscular, eliminado pelos rins e, apesar de ser empregada como biomarcador da TFG sua interpretação deve ser acompanhada com cautela. Pois seus níveis séricos sofrem alterações dependentes da idade, do sexo, do estado nutricional e massa muscular e se mostra superior aos níveis basais após diminuição de 50 a 60% da TFG e pela baixa sensibilidade nas fases iniciais da lesão renal (METRA et al., 2012).

Entretanto, a elevação de seus níveis no sangue é observada principalmente quando há lesão dos néfrons funcionantes (AL-HABORI et al., 2002). Na cirrose, por exemplo, a síndrome hepatorenal (SHR) é o estágio mais avançado das complicações da hipertensão porta, sendo o aumento progressivo da creatinina sérica, uma das principais características deste estágio (WADEI et al., 2006).

O prognóstico da cirrose hepática depende de vários fatores, tais como a etiologia, gravidade da doença, presença de doenças associadas e complicações. Vários sistemas de avaliação clínica e laboratorial vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos, dentre estes os mais utilizados são a classificação de Child-Pugh e o sistema MELD (the Model for End Stage Liver Disease). O sistema MELD tem sido adotado para alocação dos pacientes na fila de transplante hepático, sendo os níveis de creatinina um dos fatores avaliados. No Brasil ele já vigora, na Portaria Ministerial da Saúde, desde o ano de 2006 (BOURSIER et al., 2009).

A creatinina é um composto nitrogenado produzido a partir da fosfocreatina muscular. A quantidade de creatinina formada por dia depende da quantidade de creatina no organismo, que por sua vez depende da massa muscular. Entretanto, a quantidade de creatinina formada é relativamente constante para um determinado indivíduo, sendo pouco afetada pela alimentação, principalmente pelo consumo de proteína (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). Sendo seus níveis sangüíneos poucos afetados pela dieta, a creatinina é usada

como referência para corrigir mudanças nas variações de uréia sanguínea (GONZÁLEZ et al, 2000).

Os níveis séricos de uréia também são amplamente utilizados na prática clínica para avaliar o índice de filtração glomerular (MITCH, 2001). Entretanto, deve-se ressaltar que ela não é produzida constantemente durante o dia e a sua concentração sanguínea pode variar com a ingestão protéica, desnutrição, sangramento gastrointestinal e o uso de alguns medicamentos, como, por exemplo, os corticosteroides (RIELLA, 1996).

Ressalta-se também que os valores plasmáticos da uréia podem modificar de acordo com a taxa de produção hepática. Isso porque a lise das proteínas em aminoácidos, a biossíntese da uréia se dá exclusivamente em processo hepático intracelular, no qual o nitrogênio contido no aminoácido é convertido em uréia por um ciclo enzimático. Assim, os níveis séricos da uréia devem ser analisados em conjunto com a creatinina (SODRÉ et al., 2007).

Pois de acordo com Sodré et al (2007), a razão uréia sérica/creatinina sérica pode indicar estados patológicos diferentes. Em valor abaixo do esperado, ela pode ser encontrada em patologias como a necrose tubular aguda, baixa ingestão de proteínas, condições de privação alimentar ou redução da síntese de uréia por insuficiência hepática. Essa razão elevada, pode ser feita de forma dicotomizada, onde creatinina dentro do valor de referência, indica diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumento na ingestão protéica, ou sangramento gastrointestinal; e creatinina acima do valor normal, denota-se presença de processos obstrutivos pós-renais, como tumores ou estenose de vias urinárias.

2.6. Estresse oxidativo e defesa antioxidante do organismo

O termo estresse oxidativo é utilizado para designar uma condição metabólica na qual ocorre o desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva do primeiro, levando a um descontrole da sinalização intracelular e do mecanismo redox (FORMAN; FUKUTO; TORRES, 2004). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio

homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular. Dessa forma, os danos oxidativos têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias, degenerativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2002), autoimunes, pulmonares, cardiopatias, câncer e intoxicação por xenobióticos (HALLIWELL et al., 1995; LABAER, 2005). No entanto, a intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes, uma vez que modificações na membrana celular alteram a passagem de íons e moléculas e podem resultar em um posterior dano ao DNA (GROW, 2001; TELES et al, 2015).

Compostos pró-oxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo (HALLIWELL, 1996). Os radicais livres são átomos ou moléculas, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, livre para se ligar a qualquer outro elétron, conferindo alta reatividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990) e, portanto, são considerados de substância pró-oxidantes. Eles são apontados como os principais responsáveis pelo processo de oxidação nos sistemas biológicos (SIES, 1993), entretanto, segundo Ferreira; Matsubara (1997), nem todos os agentes reativos patogênicos apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, tornando o termo radical livre pouco abrangente. No entanto, espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) são termos que abrangem todas as formas reativas do oxigênio e nitrogênio, incluindo radicais e não- radicais que participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo celular, dessa forma, os EROS e ERNS são produzidos naturalmente ou por

alguma disfunção biológica (MITTELER et al, 2011; VISIOLI; KEANEY; HALLIWELL, 2000; FINKEL; HOLBROOK, 2000). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana (TÚNEZ et al, 2005) e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas (DE LA PEÑA; BELLÓN, 1997; FERNANDES et al., 2005), carboidratos (HALLIWELL, 1999) e DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), o que geralmente está associado ao aparecimento de diversas doenças (DEMMIG-ADAMS; ADAMS, 2002).

Na cirrose, por exemplo, tem sido descrita alterações nos mecanismos oxidantes/ antioxidantes, que se encontram em desequilíbrio e contribuem em grande parte para a necrose hepática (PERES et al., 2000). Os produtos originários da peroxidação lipídica parecem estimular a expressão dos genes responsáveis pela síntese de colágeno, um dos principais componentes da fibrose (HELLERBRAND et al., 1999; TÚNEZ et al., 2005).

Dessa forma, é essencial que sistemas aeróbicos tenham o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Para isso, as células dos organismos vivos possuem dois sistemas de defesa contra os danos produzidos pelos radicais livres: um sistema de defesa enzimático e um sistema de defesa não enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem exógena ou endógena (MACNEE, 2000; VASCONCELOS et al., 2007).

O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O sistema não enzimático é formado por compostos sintetizados pelo organismo como é o caso da glutathione reduzida (GSH), bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico e

também os que são ingeridos através da alimentação ou suplementação de antioxidantes, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e compostos fenólicos de plantas, como os flavonóides (SCHENEIDER; OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007; CAVALCANTE; BRUIN, 2009). Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Essa ampla variedade se dá por haver diversas substâncias que, quando presentes em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Substâncias com essa capacidade são denominadas antioxidantes (SIES; STAHL, 1995; HALLIWELL, 2000).

Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, não são totalmente eficazes, e constantemente há formação de espécies reativas que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de serem eliminadas (AUGUSTO, 2006). Desta forma, atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito da produção excessiva dos radicais livres no organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; NASSER et al., 2011).

2.7. Potencial terapêutico da melatonina

Do ponto de vista terapêutico, existem diversas substâncias exógenas que podem prevenir o dano causado por espécies reativas, através de mecanismos análogos aos sistemas antioxidantes endógenos, inibindo ou prevenindo a geração de radicais livres e, em outros casos, potencializando a atividade antioxidante enzimática ou bloqueando a amplificação do dano oxidativo (DOBRETISOV et al., 1977).

A melatonina (MEL), ou N-acetil-5-metoxitriptamina, é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal dos vertebrados (AXELROD, 1974). Apesar da pineal ser o principal órgão de produção, essa indolamina também é sintetizada, em menor quantidade, pelo corpo ciliar da íris, glândulas harderianas, glândulas

lacrimais, linfócitos e intestino grosso (SOARES-JÚNIOR et al., 2003; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Mesmo sendo produzida de forma endógena, as características farmacocinéticas da MEL têm permitido que ela seja alvo de estudos, devido aos seus possíveis benefícios quando administrada de forma exógena em determinadas patologias (CRUZ et al., 2005; ROSA et al., 2010).

Atualmente, o papel regulatório da MEL nos ritmos circadianos e sazonais está bem estabelecido (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 1986; REITER, 1974; REITER, 1993; MAGANHIN et al., 2008). No entanto, há diversos estudos que evidenciam seu envolvimento em muitas outras funções, tais como: na atividade imunomoduladora (GUERRERO; REITER, 2002; CARRILLO-VICO et al., 2005), antiinflamatória (MAYO et al., 2005; CHAHBOUNI et al. 2010), nas funções homeostáticas na mitocôndria (JOU et al., 2010; PARADIES et al., 2010), fisiopatologia reprodutiva (SOARES-JÚNIOR et al., 2003) e na inibição da progressão do câncer (BLASK; SAUER; DAUCHY, 2002; JUNG-HYNES; REITER; AHMAD, 2010; PARK et al., 2010).

Além disso, um número crescente de estudos vêm mostrando o papel da MEL no controle do estresse oxidativo nos tecidos biológicos (REITER et al., 2000; ROSA et al., 2010; GALANO; TAN; REITER, 2011). Assim, a descoberta da MEL como agente antioxidante abriu novos campos de investigação nas áreas médica e biológica (TAN; CHEN; POEGGELER, 1993; YONEI et al., 2010). Segundo Galano; Tan; Reiter (2011), o número por ano de publicações científicas sobre o papel antioxidante dessa indolamina vem aumentando, pois segundo estes autores, o interesse se justifica por haver muito a investigar e compreender, sobre os mecanismos de ação quanto o combate aos radicais livres.

Estudos tanto *in vitro* como *in vivo* têm demonstrado que a MEL é potente antioxidante contra os radicais hidroxila, que são altamente tóxicos, e de radicais derivados do oxigênio (POEGGELER et al., 1994). Pieri et al (1994) comprovaram que a MEL apresenta o dobro da efetividade da vitamina E um potente neutralizante do radical peróxido. Reiter, Tan e Galano (2014) também têm estudado a capacidade de neutralização de radicais livres pela MEL em uma grande variedade de sistemas *in vitro* e, a maioria dos estudos com essa indolamina, tem proporcionado resultados satisfatórios.

Sofic et al (2005) relataram que a MEL agiu em seu experimento como um antioxidante universal contra os radicais peroxila (ROO•) e hidroxila (HO•). Além disso, esses autores perceberam que esse hormônio é um antioxidante duas vezes mais potente que a vitamina E, e quatro vezes mais que o ácido ascórbico ou GSH. A MEL também conseguiu inibir a fotólise aeróbia induzida com radiação visível e raios ultravioleta mais rápido e de forma mais eficiente, que os antioxidantes citados, concluindo que a melatonina pode ser a molécula principal para proteger as células contra o estresse oxidativo.

Esse hormônio também atua como antioxidante indireto, através do aumento da atividade das principais enzimas antioxidantes, incluindo SOD, CAT e GPx (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005). E, diferentemente de outros antioxidantes, não participa do ciclo redox, o qual permite que um antioxidante, passe a atuar como pró-oxidante e promova a formação de radicais livres (CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

A ação antioxidante da MEL parece ser ainda mais relevante devido a sua capacidade de atravessar todas as barreiras morfofisiológicas e de distribuir-se amplamente nos tecidos, células e compartimentos subcelulares (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005), pois apresenta alta solubilidade em lipídios, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, atravessando, inclusive a barreira hematoencefálica (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Sendo assim, após ser secretada, se distribui por vários tecidos corporais, não é estocada (REITER, 1991) e sua distribuição subcelular possibilita sua interação com moléculas tóxicas na totalidade da célula, reduzindo o dano oxidativo tanto em meio lipídico quanto aquoso (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005).

Além das características já citadas, para Galano, Tan e Reiter (2011), a MEL a ainda se apresenta como excelente opção terapêutica contra a ação dos radicais livres por apresentar alto espectro antioxidante e ter toxicidade mínima. Também não tem sido relatado nenhum efeito secundário de importância que traga risco a administração desse hormônio (REITER; CARNEIRO, 1997).

Sendo assim, apesar de as informações sobre o mecanismo ou mecanismos que determinam a atividade antioxidante da MEL não ser ainda bem definido, devido a alta complexidade dos sistemas e (GALANO; TAN; REITER, 2011;

LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011; PEREZ-GONZALEZ; GALANO, 2011), com base nos dados recolhidos na literatura, pode-se afirmar que a MEL protege de forma eficiente contra o estresse oxidativo, por uma variedade de mecanismos (GALANO; TAN, REITER, 2011).

Estudos também mostram que o fotoperíodo, a pinealectomia e a melatonina exógena podem afetar o peso e as funções do timo e do baço em mamíferos e aves (PERTSOV, 2006; WRONKA et al., 2008). Visto que são nesses órgãos onde ocorrem as respostas, as interações entre a MEL e o sistema imunológico têm sido bastante estudadas, e em praticamente todos os casos, o efeito imunomodulador da resposta immune por esse hormônio se mostraram satisfatórios (ESQUIFINO et al., 2004; FAAS et al., 2005).

Ainda nesse contexto, estudos realizados por El-Sokkary et al (2003), mostraram que ratos portadores de tumor e que receberam melatonina, apresentam aumento na atividade proliferativa de linfócitos, na síntese de DNA em linfócitos tímicos e esplênicos e na produção de citocinas por macrófagos, reforçando assim a teoria da ação da MEL no sistema immune.

Dados da literatura mostram também que a pineal, principal produtora de MEL, exerce ação direta no sistema renal (SOARES-JÚNIR et al, 1999). Pishak e Kokoshchuk (1995), verificaram que esse hormônio induz o aumento da filtração glomerular de sódio e água no filtrado urinário e estimula o transporte tubular de sódio. Diversos estudos também comprovam a ação anti-apoptótica da MEL nesse órgão, atribuindo esta ação principalmente às suas propriedades antioxidantes (NAVA et al., 2000; HOIJMAN et al., 2004; BAYDAS et al., 2007).

Também se sabe que receptores de membrana, MT-1, MT-2 e MT-3, são amplamente distribuídos no organismo, tanto no sistema nervoso central quanto em diversos órgãos e tecidos periféricos como: testículos, ovários, rins, pele, adrenal, tireóide, placenta, pulmão, rins, fígado e baço (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003; SLOMINSK et al., 2012).

Esses receptores são responsáveis por uma grande variedade de efeitos intracelulares (dependendo do tecido), os quais levarão a expressão de vários mecanismos fisiológicos importantes como: imunomodulação, ação anticarcinogênica, regulação da atividades endócrinas e pigmentação da pele, sendo alvos farmacológicos cada vez mais atrativos (SLOMINSKI et al., 2012).

Aproximadamente 300 moléculas são conhecidas como ligantes para os receptores de MEL (BOUTIN et al., 2005), o que mostra a diversidade de ação desse hormônio mediado por receptores. No entanto, a MEL também desempenha ações independentes de receptores, demonstrando seu diversificado potencial de ação nos mais variados órgãos e tecidos do corpo humano.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; LOWENSTEIN, P. R.; ROSENSTEIN, R. E.; CARDINALI, D. P. Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. **J. Pineal Res.**, v. 3, n. 2, p. 101-109, 1986.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**, 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.
- ALEYNIK, S. I.; LEO, M. A.; MA, X.; ALEYNIK, M. K.; LIEBER, C. S. Polyenylphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. **J. Hepatol.**, v. 27, n. 3, p. 554-561, 1997.
- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; GARCIA-DOMINGUEZ, J.; ARIAS, J. I.; DURÁN, M.; ARIAS, J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 1, n. 6, p. 0-16, 2008.
- ANDRADE, P.; ROCHA, M. L.; SOFIA, C.; PRAGANA, M. L.; OLIVEIRA, M. R.; PORTELA, F.; MONTEIRO, G. Gama-gt e doença hepática alcoólica. **Acta Méd. Port.**, v. 5, n. 3, p. 119-23, 1992.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev Soc Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.
- ANTHONY, P. P.; ISHAK, K. G.; NAYAK, N. C.; POULSEN, H. E.; SCHEUER, P. J.; SOBIN, L. H. The morphology of cirrhosis. Working group sponsored by the World Health Organization. **J. Clin. Pathol.**, v. 31, n. 5, p. 395-414, 1978.
- ARENAS, I. A.; XU, Y.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; DAVIDGE, S. T. Angiotensin II induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- α . **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 286, n. 4, p.779–784, 2004.
- ASSY, N.; MINUK, G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **J. Hepatol.**, v. 26, n. 4, p. 945-952, 1997.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: Bons, maus e naturais**. Oficina de Textos: São Paulo, 2006, 120 p.

AXELROD J. The pineal gland: a neurochemical transducer. **Sci.**, v. 184, n. 144, p. 1341-1348. 1974.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1992, 658 p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASKARAN, M.; PERIYASAMY, L.; RAJAGOPALAN, R. Effect of Phyllanthus niruri on alcohol and polyunsaturated fatty acid induced oxidative stress in Liver. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 58–62, 2010.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.

BAYDAS, G.; KOZ, S. T.; TUZCU, M.; ETEM, E.; NEDZVETSKY, V. S. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. **J. Pineal Res.** v. 43, n. 3, p. 225-231, 2007.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716 p.

BEM, R. S.; LORA, F. L.; SOUZA, R. C.A.; TRIPPPIA, M. A.; AMARANTE, H. M. B.; CARMES, E. R. Correlação das características do ecodoppler do sistema porta com presença de alterações endoscópicas secundárias à hipertensão porta em pacientes com cirrose hepática. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n. 3, p.178-183, 2006.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BITENCOURT, S.; MESQUITA, F. C.; CABERLON, E.; SILVA, G. V.; BASSO, B. S.; FERREIRA, G. A.; OLIVEIRA, J. R. Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. **Biochem Cell Biol**, v. 90, n. 6, p. 683-690, 2012.

BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 113-132, 2002.

BORGES, D. R. Testes hepáticos e testes de função hepática. In: MINCIS, M. **Gastroenterologia e Hepatologia: diagnóstico e tratamento**. 2ª. Edição. São Paulo: Lemos- editorial; 1998, p. 565-585.

BOURSIER, J.; CESBRON, E.; TROPET, A. L.; PILETTE, C. Comparison and improvement of MELD and Child-Pugh score accuracies for the prediction of 6-month mortality in cirrhotic patients. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.43, n. 6, p. 580-585, 2009.

BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26, n. 8, p. 412-419, 2005.

BRANDÃO, D. F.; RAMALHO, L. N. Z.; RAMALHO, F. S.; ZUCOLOTO, S.; MARTINELLI, A. L. C.; SILVA, O. C. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cir. Bras.** v. 21, n. 1, 2006.

BRENNER, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, v. 120, p. 361-368, 2009.

BRITO, M. V. H.; MOREIRA, R. J.; TAVARES, M. L. C.; CARBALLO, M. C. S.; CARNEIRO, T. X.; SANTOS, A. A. S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 243-246, 2005.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.**, v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.

CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J. M.; LARDONE, P.J.; REITER, R. J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **End.**, v. 27, n. 2, p. 189–200, 2005.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CHAHBOUNI, M.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; SEVILLA, B.; DOERRIER, C.; MUÑOZ-HOYOS, A.; MOLINA-CARBALLO, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. **J. Pineal Res.**, v. 48, n.3, p. 282-289, 2010.

CHEDID, A. M. D. Regression of Human Cirrhosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, 2000.

CHILAKAPATI, J.; SHANKAR, K.; KORRAPATI, M. C.; MEHENDELE, H. M. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. **Drug Met. Disp.**, v. 33, n. 12, 2005.

CHILAKAPATI, J.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. **Toxicol.**, v. 230, n. 2-3, p. 105-116, 2007.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med. Ver.**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

CODES, L.; SCHINONI, M. I.; FREITAS, L. A. R.; ROLIM, C. E.; MATOS, L.; MATTEONI, L.; ANDRADE, Z.; PARANÁ, R. Hepatite aguda criptogênica: uma entidade heterogênea com possibilidades de complicações. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 293-298, 2006.

COELHO, A. P. C. P.; GASSANI, B. C. A.; AZEVEDO, C. I.; OLIVEIRA, D. F. B.; ROCHA, D. M.; DUTRA, F. N.; RIOS, L. A.; MARTINS, R. M. F.; PENNA, F. G. C. Abordagem da injúria renal aguda em paciente com cirrose hepática. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 144-146, 2010.

COGLIATI, B.; PEREIRA, H. M.; DAGLI, M. L. Z.; PARRA, O. M.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Hepatotrophic factors reduce hepatic fibrosis in rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 47, n.1, p. 79-85, 2010.

CORBIN, I. R.; MINUK, G. Y. Serial percutaneous liver biopsies in laboratory rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 48, n. 10, p. 1939-1943, 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. In: Robbins. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, p. 1-25.

CRUZ, A.; PADILLO, F. J.; TORRES, E.; NAVARRETE, C. M.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; CABALLERO, F. J.; BRICEÑO, J.; MARCHAL, T.; TÚNEZ, I.; MONTILLA, P.; PERA, C.; MUNTANE, J. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 143–150, 2005.

CUPISTI, A.; LICITRA, R.; CHISARI, C.; STAMPACCHIA, G.; D'ALESSANDRO, C.; GALETTA, F. Skeletal muscle and nutritional assessment in chronic renal failure patients on a protein-restricted diet. **J. Intern. Med.**, v. 255, n. 1, p.115-124, 2004.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.

DAVID, P.; ALEXANDRE, E.; CHENARD-NEU, M.; WOLF, P.; JAECH, D.; RICHERT, L. Failure of liver cirrhosis induction by thiocetamide in Nagase analbuminaemic rats. **Lab. Animals**, v. 36, n. 2, 158-164, 2002.

DE LA PEÑA, F. A.; REDONDO, B. P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. **Rev. Clin. Esp.**, v. 197, n. 2, p. 58-70, 1997.

DE FRANCESCHI, L.; SADA, S.; ANDREOLI, A.; ANGHEBEN, A.; MAROCCO, S.; BISOFFI, Z. Sick cell disease and hyperreactive malarial splenomegaly (HMS) in young immigrants from Africa. **Blood**, v.106, p. 4415-4417, 2005.

DEKANT, W. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. **Toxicol. Letteres**, v. 124, n. 1-3, p. 21-36, 2001.

DELHAYE, M.;LOUIS, H.;DEGRAEF, C. ;LE MOINE, O. ;DEVIÈRE, J.; GULBIS, B.; JACOBOVITZ, D.;ADLER, M.; GALAND, P. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. **Hepatol.**, v. 23, n. 5, p. 1003-1011, 1996.

DELHAYE, M.;LOUIS, H.;DEGRAEF, C. ;LE MOINE, O. ;DEVIÈRE, J.; GULBIS, B.; JACOBOVITZ, D.;ADLER, M.; GALAND, P. Hepatocyte proliferative activity in human liver cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 30, n. 3, p. 461-471, 1999.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2149-2153, 2000.

DI VINICIUS, I.; BAPTISTA, A. P.; BARBOSA JR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon-tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. **Pathol. Res. Pract.**, v. 201, n. 6, p. 449- 456, 2005.

DOBRETSOV, G. E.; BORSCHEVSKAYA, T. A.; PETROV, V. A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. **FESB Lett.**, v. 84, n. 1, p.125-128, 1997.

DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R. S.; SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. **Clin. Chem.**, v. 46. n. 12, p. 2017-2049, 2000.

EATON, D. C.; POOLER, J. P. **Fisiologia Renal de Vander**, 8ª Ed., Porto Alegre: AMGH, 2016, 216p.

ELSHARKAWY, A. M.; OAKLEY, F.; MANN, D. A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 5, p. 927-939, 2005.

ENG, F.J.; FRIEDMAN, S.L. Fibrogenesis: I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. **Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.**, v.279, p.7-11, 2000.

ERTEKIN, V.; SELIMOGLU, M. A.; PIRIM, I. Familial Mediterranean fever in a childhood population in eastern Turkey. **Pediatr Int.**, v. 47, p. 640-644, 2005.

ESQUIFINO, A.I.; CHACON, F.; CANO, P.; MARCOS, A.; CUTRERA, R. A.; 271 CARDINALI, P. Twenty-four-hour rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset 272 populations and amino acid content in submaxillary lymph nodes of growing male rats 273 subjected to calorie restriction. **J. Neuroimmunol.**, v.156, n.1, p.66–73, 2004.

FAAS, M.M.; BOUMAN, A.; NIEUWENHOVEN, A.L.V.V.; SCHAAF, G.V.D.; 275 MOES, H.; HEINEMAN, M.J.; VOS, P. Species differences in the effect of pregnancy 276 on lymphocyte cytokine production between human and rat. **J. Leukocyte Biol.**, v.78, 277 p.946–953, 2005.

FERNANDES, D. C.; MEDINAS, D. B.; ALVES, M. J.; AUGUSTO, O. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein–tyrosine nitration to protein–cysteine nitrosation. **Free Radical. Biol. Med.**, v. 38, n. 2, p. 189, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONTANA, L.; MOREIRA, E.; TORRES, M. I.; FERNANDEZ, M. I.; RIOS, A.; MEDINA, F. S.; GIL, A. Serum amino acid changes in rats with thiocetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicol.**, v. 106, n. 3, p. 197-206, 1996.

FORBES, S.J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 207-217, 2011.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M.; TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 287, n. 2, p. 246-256, 2004.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterol.**, v.134, n. 6, p. 1655- 1669, 2008.

- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 1, n. 2, p. 98-105, 2004.
- FRIEDMAN, S. L.; ARTHUR, M. J. P. Reversing hepatic fibrosis. *Sci. Med.*, v. 8, n. 4, p.194-205, 2002.
- FRIEDMAN, S. L.; SHEPPARD, D.; DUFFIELD, J. S.; VIOLETTE, S. Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. *Sci. Transl. Med.*, v. 5, n. 167, p. 1-17, 2013.
- GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J. Pineal Res.*, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.
- GARCIA-TSAO, G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol.*, v.120, n. 3, p. 726-48, 2001.
- GARCIA-TSAO, G.; PARIKH, C. R.; VIOLA, A. Acute kidney injury in cirrhosis. *Hepatol.*, v. 48, n. 6, p. 2064-2077, 2008.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. pp. 279, 282-284, 289, 301, 305-307.
- GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.*, v.21, p.311–335, 2001.
- GEORGE, J.; RAO, K. R.; STERN, R.; CHANDRAKASAN, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicol.*, v. 156, n. 3, p. 129-138, 2001.
- GENESER, F. **Histologia: com bases moleculares**. 3.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana/ Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. pp. 318, 348. 5.
- GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canad. Med. Assoc. J.*, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.
- GILMORE, I.; GARVEY, C. J.; JAUNDICE. *Medicine*, v. 41, n. 2, p. 99-103, 2013.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GONZÁLEZ, F.H.D.; CONCEIÇÃO, T.R.; SIQUEIRA, A.J.S. ; LA ROSA, V.L. VARIAÇÕES SANGÜÍNEAS DE URÉIA, CREATININA, ALBUMINA E FÓSFORO EM BOVINOS DE CORTE NO RIO GRANDE DO SUL. **A Hora Veterinária**, v.20, p.59 - 62, 2000.

GRESSNER, A. M.; WEISKIRCHEN, R.; BREITKOPF, K.; DOOLEY, S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. **Front. Biosci.**, v. 7, p. 793–807, 2002.

GROW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. J. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **J. Cell. Physiol.**, v. 187, n.3, p. 277-282, 2001.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KISTENS, L. Human Schistosomiasis. **The lancet**, v. 368, n. 9541, p.1106-1118, 2006.

GUERRA, R. R.; TROTTA, M. R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, 2009.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-immune system relationships. **Curr: Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 167-179, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 12^a ed, Elsevier Health Sciences, 2011.

HAJOVSKY, H.; HU, G.; KOEN, Y.; SARMA, D.; CUI, W.; MOORE, D. S.; STAUDINGER, J. L.; HANZLIK, R. P. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 25, n. 9, p. 1955-1963, 2012.

HAKATEYAMA, Y.; ONO, T.; SAKUMA, H.; KOYOMA, Y.; INOUE, N.; TAKENOSHITA, S.; OMATA, S. Usefulness of the tactile sensor for estimating the degree of liver fibrosis and the DNA synthesis activity of remnant liver cells after partial hepatectomy. **Fukushima J. Med. Sci.**, v. 48, n. 2, p. 93-101, 2002.

HALLIWELL B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n. 5, p. 1082-1087, 2000.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, v. 38, p. 3-20, 1996.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chem. Toxicol.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, W. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?**Brit. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Met. Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5th ed., Clarendon Press: Oxford, 1999.

HEIDELBAUGH, J. J.; SHERBONDY, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. **Am. Fam. Physician.**, v. 74, n. 5, p. 767-776, 2006.

HELLERBRAND C, STEFANOVIC B, GIORDANO F, BUCHARDT ER, BRENNER DA. The role of TGF beta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. **J. Hepatol.**, v. 30, n. 1, p. 518-522, 1999.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu Ver. Pathol.** v. 6, p. 425-456, 2011.

HOIJMAN, E.; ROCHA VIEGAS, L.; KELLER SARMIENTO, M. I.; ROSENSTEIN, R. E.; PECCI, A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 418-425, 2004.

HOULIHAN, D. D.; ARMSTRONG, M. J.; NEWSOME, P. N. Investigation of jaundice. **Med.**, v. 39, n. 9, p. 518-522, 2011.

IIDA, V. H.; SILVA, T. J. A.; SILVA, A. S. F.; SILVA, L. F. F.; ALVES, V. A. F. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n.1, p. 29-36, 2005.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 3, p. 539-548, 2007.

JEONG, D. H.; JANG, J. J.; LEE, S. J.; LEE, J. H.; LIM, I. K.; LEE, M. J.; LEE, V. S. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thiocetamide. **J. Gastroenterol.**, v. 36, n. 1, p. 24-32, 2001.

JOU, M. J.; PENG, T. I.; HSU, L. F.; JOU, S. B.; REITER, R. J.; YANG, C. M.; CHIAO, C. C.; LIN, Y. F.; CHEN, C. C. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca²⁺- mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. **J. pineal Res.**, v. 48, n. 1, p. 20-38, 2010.

JUNG-HYNES, B.; REITER, R. J.; AHMAD, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 1, p. 9-19, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. pp. 258, 267-268.

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6^a ed., San Diego: Academic Press, 2008, 932p.

KARANTONIS, H. C.; GRIBILAS, G.; STAMOULIS, I.; GIAGINIS, C.; SPILIOPOULOU, C.; KOURAKLIS, G.; DEMOPOULOS, C.; THEOCHARIS, S. E. Platelet-Activating Factor Involvement in Thioacetamide-Induced Experimental Liver Fibrosis and Cirrhosis. **Digest. Diseases and Sci.**, v. 55, n. 2, p. 276-284, 2010.

KINNMAN, N.; HOUSSET, C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. **Front. Biosci.**, v. 7, p. 496-503, 2002.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. **B. Pract. R. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p.305-317, 2011.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; KOUROUMALIS, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. **World. J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 46, 2006.

KONG, X.; HORIGUCHI, N.; MORI, M.; GAO, B. Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. **Front Physiol**, v. 3, n.69, 2012.

LABAER, J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). **J. Proteome Res.**, v. 4, n.4, p. 1053-1059, 2005.

LALEMAN, W.;VANDER ELST, I.; ZEEGERS, M.; SERVAES, R.; LIBBRECHT, L.; ROSKAMS, T.; FEVERY, J.; NEVENS, F. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 36, n. 4, p. 242-249, 2006.

LAMAS, O.; MARTÍNEZ, J.A.; MARTI, A. Decreased splenic mRNA expression levels of TNF-alpha and IL-6 in diet-induced obese animals. **J. Physiol. Biochem.** v.60, p. 279–283, 2004.

LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S.; REISCH, J.S.; SCHIÄ, D.T.F.V.; OSTAPOWICZ, G.; SHAKIL, A.O.; LEE, W.M. Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. **Hepatol.**, v. 42, n. 6, p.1364-1372, 2005.

LE COUTEUR, D. G.; WARREN, A.; COGGER, V. C.; SMEDSRØD, B.; SØRENSEN, K. K.; DE CABO, R.; FRASER, R.; MCCUSKEY, R. S. Old age and the hepatic sinusoid. **Anat. Rec**, v. 291, n. 6, p. 672-683, 2008.

LEE, E. -S.; KIM, J. -H.; IM, S.; LEE, K. B.; SOHN, S.; KANG, W. H. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, n. 1, p. 45-49, 2001.

LEOPOLDINI M, RUSSO N, TOSCANO M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chem.**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LI, H.; HOU, S.; WANG, W.; YANG, L.; LI, Y.; TAN, J. In vitro effects of metal ions on lipid peroxidation induced by alcohol in mice liver homogenate. **J. Environm. Biol.**, v. 4, n. 4, p. 423-428, 2003.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thiocetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **J. Hepato-Biliary Panc. Sur.**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.

LOOMBA, R. Serum γ -glutamyltranspeptidase predicts all-cause, cardiovascular and liver mortality in older adults. **J. Clin. Expe. Hepatol.**, v. 3, n. 1, p. 4-11, 2013.

LUO, D. Z.; VERMIJLEN, D.; AHISHALI, B.; TRIANTIS, V.; PLAKOUTSI, G.; BRAET, F.; VANDERKERKEN, K.; WISSE, E. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 6, p. 1-11, 2000.

LYRA, A.C.; SOARES, M.B.; DA SILVA, L.F.; FORTES, M.F.; SILVA, A.G.; MOTA, A.C.; OLIVEIRA, S.A.; BRAGA, E.L.; DE CARVALHO, W.A.; GENSER, B.; DOS SANTOS, R.R.; LYRA, L.G. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, p. 1067-1073, 2007.

MACNEE, W. Oxidants/antioxidants and COPD. **Chest.**, v. 117, n. 5, suppl 1, p. 303S-3017S, 2000.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JÚNIOR, M. J. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Assoc. Med. Bras**, v. 54, n. 3, 2008.

MALHI, H.L; GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Hepatocyte death: a clear and present danger. **Physiol. Rev.**, v. 90, n. 3, p. 1165-1194, 2010.

MANJO, G.; JORIS, I. Cell injury and cell death. In: **Cells tissues and disease-principles of general pathology**. New York: Oxford University Press, 2^a ed, p. 185- 245, 2004.

MANNING, D.; AFDHAL, N. Diagnosis and quantitation of fibrosis. **Gastroenterol.**, 134, n. 6, p. 1670-1681, 2008.

MARRA, F.; CHOUDHURY, G.G.; PINZANI, M.; ABBOUD, H.E. Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. **Gastroenterol.**, v.107, n. 4, p.1110-1117, 1994.

MASUMI, S.; MORIYAMA, M.; KANNAN, Y.; OHTA, M.; KOSHITANI, O.; SAWAMOTO, O.; SUGANO, T. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused livers during the development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. **Toxicol.**, v. 135, n. 11, p. 21-31, 1999.

MAYO JC, SAINZ RM, TAN DX, HARDELAND R, LEON J, RODRIGUEZ C.; REITER, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **J. Neuroimmunol.**, v.165, n. 1-2, p. 139-149, 2005.

MATTOS, A. A.; DANTAS-CORRÊA, E. B. **Tratado de Hepatologia**. 1º EDIÇÃO, RUBIO LTDA, 2010, 1024 p.

MCCORMICK, P. A. Hepatic cirrhosis. In: DOOLEY, J. S.; LOK, A.; BURROUGHS, A. K.; HEATHCOTE, J. **Sherlock's Diseases of the Liver and biliary system**. 12 ed. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011, 792 p.

METRA, M.; COTTER, G.; GHEORGHIADÉ, M.; DEI CAS, L.; VOORS, A. A. The role of the kidney in heart failure. **Eur. Heart J.** v. 33, n. 17, p. 2135-2142, 2012.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de patologias do fígado. **Prática Hosp.**, v. 51, p. 44-48, 2007.

MINUK, G. Y. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 12, n. 6, p. 417-421, 1998.

MITCH, W. E. Insuficiência renal aguda. In: Gildman L, Bennett JC. Cecil: **Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2001.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant Sci.** v. 16, n.6, p. 300-9, 2011.

MOREIRA, E.; FONTANA, L.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, I.; RÍOS, A.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GIL, A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thiocetamide-induced liver cirrhosis in rats. **J. Paren. Enteral Nutri.**, v. 19, n. 6, p. 461-469, 1995.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora: Médica Massau, vol. 9, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 5ª ed. Medbook, 2009.

NAVA, M.; ROMERO, F.; QUIROZ, Y.; PARRA, G.; BONET, L.; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 279, n. 5, p. 910-918, 2000.

NASSER, A. L. M.; DOURADO, G. K.; MANJATE, D. A.; CARLOS, I. Z.; CESAR, T. B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 32, n. 2, p.275-279, 2011.

NATARAJAN, S. N.; THOMAS, S.; RAMAMOORTHY, P.; BALASUBRAMANIAN, K. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 21, n. 6, p. 947-957, 2006.

NUNES, G. L. S. Avaliação da função renal em pacientes hipertensos. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 14, n. 3, p. 162-166, 2007.

ÖSTERREICHER, M. P.; ÖSTERREICHER, C. H.; TRAUNER, M. Fibrosis in Autoimmune and Cholestatic Liver Disease. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 245–258, 2011.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. pp. 354, 357.

PAES-BARBOSA, F. C.; FERREIRA, F. G.; SZUTAN, L. A. Planejamento pré-operatório em hepatectomias. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 5, p. 370-375, 2010.

PAKU, S.; SCHNUR, J.; NAGY, P.; THORGEIRSSON, S. S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 4, p. 1313-1323, 2001.

PARADIES, G.; PTROSILLO, G.; PARADIES, V.; REITER, R. J.; RUGGIERO, F. M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 4, p. 297-310, 2010.

PARK, S. Y.; JANG, W. J.; Yi EY; JANG, J. Y.; JUNG, Y.; JEONG, J. W.; KIM, Y. J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 2, p. 178–184, 2010.

PARMAR, M. S. Chronic renal disease: early identification and active management of patients with renal impairment in primary care can improve outcomes. **BMJ**, v. 325, n. 7355, p. 85-90, 2002.

PASSOS, C. C.; FERREIRA, A. O.; BLAZQUEZ, F. J. H.; GUERRA, R. R. Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 183-190, 2010.

PATEL T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clin. Liver Dis.**, v. 4, n. 2, p. 295—317, 2000.

PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure In: rats protection by oxyanionic form of tungsten. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1688, n. 3, p. 210-222, 2004.

PEREIRA-FILHO, G.; FERREIRA, C.; SCHWENGBER, A.; MARRONI, C.; ZETTLER, C.; MARRONI, N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45, n. 2, p. 156-162, 2008.

PERES, W.; TUÑION, M. J.; HERMANN, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The flavanoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **J. Hepatol.**, v. 33, n. 5, p. 742-750, 2000.

PEREZ-GONZALEZ, A.; GALANO, A. OH radical scavenging activity of edaravone: mechanism and kinetics. **J. Phys. Chem.**, v. 115, n. 5, p. 1306–1314, 2011.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.L. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu Rev. Immunol.** v. 22, p. 929–979, 2004.

PERTSOV, S. Effect of melatonin on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats during acute stress. **B. Exp. Biol. Med.**, v.141, p.292-295, 2006.

PETROIANU, A. Esplenomegalia induzida por drogas, **Acta Med. Port.** v. 24, n. 4, p. 977-982, 2011.

PETROIANU, A.; ANDRADE, M. A. C.; NETO, R. B. Laparoscopic subtotal splenectomy. **Surg. Laparosc. Endosc. Percutan Tech.**, v. 18, p. 94-97, 2008.

PETROIANU, A.; NETO, R. B. Laparoscopic subtotal splenectomy. **Minerva Chir.**, v. 59, n. 5, p. 501-505, 2004.

PIERI, C.; MARRA, M.; MORONI, F.; DECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F. Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.**, v. 55, n. 5, p. 271-276, 1994.

PISHAK, V. P.; KOKOSHCHUK, H. I. The renal effects of melatonin in intact and epiphysectomized rats. **Fiziol. Zh.**, v. 41, p. 23-26, 1995.

POEGGELER, B.; SAARELA, S.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; CHEN, L. K.; MANCHESTER, L. C. Melatonin-A highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 738, n. 1, p. 419-420, 1994.

POPPER, H.; KENT, G. Fibrosis in chronic liver diseases. **Clin. Gastroenterol.**, v. 4, n. 2, p. 315-332, 1975.

PORTER, W. R.; GUDZINOWCZ, M. J.; NEAL, R. A. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 208, n. 3, p. 386 –391, 1979.

PORTER, W. R.; NEAL, R. A. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide by rat liver microsomes. **Drug Metab. Dispos.**, v. 6, n. 4, p. 379 –388, 1978.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of the liver: laboratory tests. In: SCHIFF, E. R. Ed. **Schiff's diseases of the live**. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, 1999.

RAMADORI, G.; MORICONI, F.; MALIK, I.; DUDAS, J. physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 59, n. 1, p. 107-117, 2008.

- RAMADORI, G.; SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Lab. Invest.**, v.84, p.153–159, 2004.
- RAO, J. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat. Rev. Câncer**, v. 3, n. 7, p. 489-501, 2003.
- REITER, R. J. Circannual reproductive rhythms in mammals related to photoperiod and pineal function: a review. **Chronobiol.**, v. 1, n. 4, p. 365–395, 1974.
- REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Ver.**, v. 12, n. 2, p, 151-180, 1991.
- REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654–664, 1993.
- REITER, R. J.; CARNEIRO, R. C.; OH, C. S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. **Horm. Metab. Res.**, v. 29, n. 8, p. 363-372, 1997.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology** (Bethesda), v. 29, n. 5, p. 325–333, 2014.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; QI, W.; MANCHESTER, L. C.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biol. Signals Recept.**, v. 9, n. 3-4, p 160-171, 2000.
- RHODEN, E. L.; MAURI, M.; PETTEFFI, L.; BELLÛ-KLEIN, A.; RHODEN, C.R. O estresse oxidativo na cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono em ratos. **Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v. 16, n. 2, p. 47-51,1997.
- RIELLA, C. M. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, n. 7, p. 519-529, 2007.
- ROSA, D. P.; BONA, S.; SIMONETTO, D.; ZETTLER, C.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 47, n.1, 2010.

ROSE, N. R. Mechanisms of autoimmunity. **Semin. Liver Dis.**, v. 22, p. 387-394, 2002

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. pp. 450-451, 468-471.

SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Rev. nutrição**, v. 17, n. 3, p. 339-349, 2004.

SANZ, N.; DÍEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; ALVAREZ, A.; CASCALES, M. Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1384, n. 1, p. 66-78, 1998.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, n. 3, p. 525-537, 2000.

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M.; TUSHUIZEN, M. E.; TEERLINK, T.; HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 22, n. 6, p. 437-343, 2006.

SCHIONI, M. I. Fisiologia Hepática Fisiologia Hepática. **Gaz. méd. Bahia**, v. 76, n.1, p. S5-S9, 2006.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10, n. 4, p. 314-318, 2004.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **Lancet.**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

SCHUPPAN, D.; RUEHL, M.; SOMASUNDARAM, R.; HAHN, E.G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Semin. Liver Dis.**, v. 21, p. 351-372, 2001.

SEELEY, R.R., STEPHENS, T.D., TATE, P. **Anatomy & Physiology**. In: Seeley et al... Aparelho Urinário. 6ª Edição. McGraw-Hill Companies. 2003, p. 990-992.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. 9th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1993.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Doenças do fígado e do sistema biliar**. Guanabara Koogan, 2004, 599 p.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **Euro. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIMMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, G. Generation of melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 325-395, 2003.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHALABRITZ-LOUTSERVITCH, N.; OSTROM, R. S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Mol. Cellular Endocrinol.**, v. 351, p. 152-166, 2012.

SMELTZER, S. G.; BARE, B. G. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, 2396 p.

SOARES-JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C.; OLIVEIRA, S.; HAIDAR, M. A.; SIMÕES, M. J.; REIS, L. C. Influência da Glândula Pineal sobre a Ingestão de Água e NaCl em Ratas Normais e Ooforectomizadas. **RBGO**, v. 21, n. 6, p. 317-321, 1999.

SOARES-JÚNIOR, J. M.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C. Aspectos moleculares dos receptores de melatonina e sua ação na reprodução. **Femina**, v. 31, n. 6, p. 495-500, 2003.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOFIC, E.; RIMPAPA, Z.; KUNDUROVIC, Z.; SAPCANIN, A.; TAHIROVIC, I.; RUSTEMBEGOVIC, A.; CAO, G. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. **J. Neural Transm.**, v. 112, n. 3, p. 349-58, 2005.

SOYLU, A.; AYDOGDU, N.; BASARAN, U.; ALTANER, S.; TARCIN, O.; GEDIK, N.; UMIT, H.; TEZEL, A.; DOCKMECI, G.; BALOGLU, H.; TURE, M., KUTLU, K.; KAYMAK, K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 42, n. 12, p. 6835-6841, 2006.

SPIRA, G.; MAWASI, N.; PAIZI, M.; ANBINDER, N.; GENINA, O.; ALEXIEV, R.; PINES, M. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **J. HepatoBiliary Panc. Sur.**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

STALKER, M. J.; HAYES, M.A. Liver and biliary system, p.297-388. In: MAXIE M.G. (ED.), JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. v. 2, 5^a ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2007, 771p.

SUBEQ, Y. M.; KE, C. Y.; LIN, N. T.; LEE, C. J.; CHIU, Y. H.; HSU, B. G. Valsartan decreases TGF- β 1 production and protects against chlorhexidine digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. **Cytokine**, v.53, n. 2, p.223–230, 2011.

SUN, F.; HAYAMI, S.; OGIRI, Y.; HARUNA, S.; TANAKA, K.; YAMADA, Y.; TOKUMARU, S.; KOJO, S. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1500, n. 2, p. 181–185, 2000.

TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr. J.**, v. 1, p.57– 60, 1993.

TANJORE, H.; LAWSON, W. E.; BLACKWELL, T. S. Endoplasmatic reticulum stress as pro-fibrotic stimulus. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1832, n. 7, p. 940-947, 2013.

TELES, Y. C. F.; MONTEIRO, R. P.; OLIVEIRA, M. S.; RIBEIRO-FILHO, J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **J. Health Sci. Inst.**, V. 33, N. 1, P. 89-93, 2015.

TENGATTINI, S.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; TERRON, M. P.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 44, n. 1, p. 16-25, 2008.

TIEPPO, J.; VERSELINO, R.; DIAS, A. S.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. **Arq. Gastroenterol.**, v. 42, n. 4, p. 244-248, 2005.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2005.

TOWNSEND-JR., C.M.; BEAUCHAMP, R. D.; EVERS, B. M.; MATTOX, K. L. **Sabiston Text book of Surgery: the biological basis of modern surgical practice**. 19 ed. Elsevier Saunders, 2015, 2320 p.

TROTTA, M. R.; CAJAÍBA, D. M.; PARRA, O. M.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Parenteral solution of nutritional hepatotrophic factors improves regeneration in thioacetamide-induced cirrhotic livers after hepatectomy. **Toxicol. Pathol.**, v. 00, n. 0, p. 1-8, 2013.

TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin. Chim. Acta.**, v. 364, n. 2, p. 33-60, 2006.

TSUKAMOTO, H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 23, n. 5, 1999.

TÚNEZ, I.; MUÑOZ, M. C.; VILLAVIVENCIO, M. A.; MEDINA, F. J.; PRADO, E. P.; ESPEJO, I.; BARCOS, M.; SALCEDO, M.; FEIJÓO, M.; MONTILLA, P. Hepato-and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharma. Res.**, v. 52, n. 3, p. 223-228, 2005.

VARGAS, R. S.; FRANÇA, F. C. V. Processo de Enfermagem aplicado a um portador de Cirrose Hepática utilizando as terminologias padronizadas NANDA, NIC e NOC. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, n. 3, p. 348-352, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano:

principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERCELINO, R.; TIEPPO, J.; DIAS, A. S.; MARRONI, C. A.; GARCIA, E.; MEUER, L.; PICADA, J. N.; MARRONI, N. P.N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 102, n. 4, p. 370-378, 2008.

VIOLAN, M.; T POMES, T.; MALDONADO, S.; ROURA, G.; DE LA FUENTE, I.; TANIA VERDAGUER, T.; LLORET, R.; TORREGROSA, J. V.; CAMPISTOL, J. M. Exercise capacity in hemodialysis and renal transplant patients. **Transplant Proc.**, v. 34, n. 1, p. 417-418, 2002.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.**, v. 47, n. 3, 2000.

WANLESS, I. R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.124, n. 11, p.1599–1607, 2000.

WADEI, H. M.; MAI, M. L.; AHSAN, N.; GONWA, T. A. Hepatorenal syndrome: pathophysiology and management. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, n. 5, p. 1066–1079, 2006.

WANG, T.; SHANKAR, K.; RONIS, M. J.; MEHENDALE, H. M. Potentiation of thiocetamide liver injury in diabetic rats is due to induced P4502E1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, n. 2, p. 473-479, 2000.

WASMUTH, H. E.; KUNZ, D.; YAGMUR, E.; TIMMER-STRANGHÖNER, A.; VIDACEK, D.; SIEWERT, E.; BACH, J.; GEIER A, PURUCKER EA, GRESSNER AM, MATERN S, LAMMERT F. Patients with acute on chronic liver failure display „sepsis-like“ immune paralysis. **J. Hepatol.**, v. 42, n. 2, p. 195-201, 2005.

WILLIAMS, D. P.; KITTERINGHAM, N. R.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; SMITH, D. A.; PARK, B. K. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Curr Drug Metab.**, v. 3, n. 4, p. 351-366, 2002.

YIN, H.; ZHOU, Y.; ZHU, M.; HOU, S.; LI, Z.; ZHONG, H.; LU, J.; MENG, T.; WANG, J.; XIA, L.; XU, Y.; WU, Y. Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. **Mitochondrion.**, v. 13, n. 3. p. 209-224, 2012.

YONEI, Y.; HATTORI, A.; TSUTSUI, K.; OKAWA, M.; ISHIZUKA, B. Effect of melatonin: basics studies and clinical applications. **Anti-Aging Medicine**, v. 7, p. 85-91, 2010.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. 1ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2013, 1064p.

ZARAGOZA, A.; ANDRÉ, D.; SARRIÓN, D.; CASCALES, M. Potentiation of thioacetamide by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. **Chemico-Biological Inter.**, v. 124, n. 2, p. 87-101, 2000.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

CAPÍTULO II

Melatonina protege o fígado e reverte a cirrose induzida pela tioacetamida em ratos

Welma Emidio da Silva¹; Leucio Duarte Vieira Filho²; Christina Alves Peixoto³;
Carolline Guimarães D'assunção¹; Cintia Giselle Martins Ferreira¹; Aline Ferreira da
Silva Mariano¹; Wilma Helena Oliveira³; Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar
Coelho Teixeira^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Recife, Brasil

³ Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois
Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br (TEIXEIRA, A. C.)

RESUMO

A cirrose é responsável por elevados índices de morbimortalidade no Brasil, motivando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dentre as possíveis alternativas, a melatonina torna-se uma excelente opção, tendo ação contra radicais livres, modulador de respostas inflamatórias e imunológicas. Assim, avaliou-se o efeito da melatonina exógena sobre o perfil fibrótico, parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo tecidual, perfil histoquímico e imunohistoquímico no fígado de ratos cirróticos. Utilizou-se 25 ratos albinos, com 60 dias de idade, divididos nos seguintes grupos: **I** - ratos sem indução a cirrose (controle); **II** – ratos induzidos à cirrose hepática pela tioacetamida; **III**- ratos induzidos à cirrose hepática pela tioacetamida e tratados com melatonina, simultaneamente; **IV**- ratos induzidos à cirrose hepática pela tioacetamida e depois tratados com melatonina por oito semanas; **V** - ratos induzidos à cirrose hepática pela tioacetamida e depois mantidos sem tratamento com melatonina por oito semanas. A cirrose foi induzida com três aplicações semanais de tioacetamida na dosagem de 200 mg/Kg i.p., durante 8 semanas. A melatonina foi administrada na dosagem de 20mg/Kg i.p. Os resultados mostraram que a melatonina atuou como reparador e protetor contra a cirrose mantendo as características morfológicas do órgão, bem como evitou a fibrose. Além disso, manteve os níveis normais de glicose e das enzimas AST, ALT, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, albumina, globulina e proteína total. Previu o aumento de lipídio no fígado, aumentou GSH, reduziu a peroxidação lipídica e os níveis de citocinas pró inflamatórias e índice apoptótico. Assim, conclui-se que a melatonina atua não apenas de forma protetora contra as ações da cirrose hepática, mas também reduzindo os danos causados por essa patologia no tecido hepático.

Palavras-Chave: Melatonina, ratos, lesão hepática, estresse oxidativo, bioquímica.

ABSTRACT

Cirrhosis is responsible for high morbidity and mortality rates in Brazil, motivating the development of new therapeutics strategies. Among possible alternatives, a melatonin becomes an excellent choice, with action against free radicals, a modulator of inflammatory and immune responses. Thus, were evaluated the effect of exogenous melatonin on the fibrotic profile, biochemical, tissue oxidative stress, histochemical and immunohistochemical profile in the liver of cirrhotic rats. 25 albino rats, 60 days old, were divided into the following Group I – control rats; Group II – rats induced the hepatic cirrhosis with thioacetamide; Group III: - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide and treated with melatonin simultaneously ; Group IV - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide and then treated with melatonin for another eight weeks; Group V - rats induced hepatic cirrhosis with thioacetamide and maintained for eight weeks without melatonin. Cirrhosis was induced with three weekly applications of thioacetamide at a dosage of 200 mg / kg body weight, for 8 weeks. Melatonin was administered at a dosage of 20mg / kg i.p. The results showed that melatonin acted as repairer and protector against cirrhosis keeping morphological characteristics of the organ, as well avoiding the fibrosis. In addition, it maintained glucose and enzyme levels AST, ALT, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase, albumin, globulin and total protein. It prevented the increase of lipid in the liver, increased GSH, reduced lipid peroxidation and proinflammatory cytokine levels and apoptotic index. Thus, it is concluded that a melatonin acts not only in a protective way against the hepatic cirrhosis actions, but also reduces the damage caused by this pathology in the hepatic tissue.

Key words: Melatonin, rats, hepatic injury, oxidative stress, biochemistry.

1. INTRODUÇÃO

A cirrose é uma doença crônica e progressiva, responsável por elevados índices de morbimortalidade, internações hospitalares repetitivas e absenteísmo no trabalho, o que gera elevados custos para a saúde e economia do Brasil (Vargas; França, 2007). Esta patologia caracteriza-se pela distorção da arquitetura hepática normal e pela formação de nódulos de regeneração (Garcia-Tsao; Lim, 2009), em resposta a agressões de natureza inflamatória, tóxica, viral, metabólica ou congestiva (Heidelbaugh; Sherbondy, 2006; Tsukada; Parsons; Rippe, 2006).

O processo patológico mais discutido na cirrose é a fibrose progressiva (Forbes; Parolla, 2011), entretanto, o desenvolvimento da doença envolve vários elementos, também fundamentais para explicar a fisiopatologia dessa doença (Onori et al., 2000). Todas as células hepáticas sofrem alterações específicas: os hepatócitos lesionados sofrem apoptose; as células de Kupffer são ativadas e produzem uma grande variedade de quimiocinas e citocinas, que são responsáveis pelo recrutamento dos linfócitos que irão infiltrar no fígado lesionado e contribuirão para o desencadeamento da inflamação (Brenner, 2009; Penz-Österreicher; Österreicher; Trauner, 2011); os hepatócitos isolados por tecido fibroso desenvolvem mecanismos de proliferação, na tentativa de compensar a perda funcional decorrente da lesão (Wanless; Nakashima; Sherman, 2000).

Diversos autores também têm demonstrado que os mecanismos oxidantes/antioxidantes se encontram em desequilíbrio na cirrose hepática e contribuem em grande parte para a necrose hepática (Aleynik et al., 1997; Peres et al., 2000; Pereira-Filho et al., 2008). A produção local de óxido nítrico parece participar do processo de vasodilatação e o VEGF ainda parece atuar na mediação dessa vasodilatação (Lewis et al., 1997; Medina

et al., 2004), além disso, alterações na micro e macrovasculatura do órgão têm sido apontados como elementos fundamentais na gênese da doença (Onori et al., 2000).

Com os avanços da biologia celular e molecular, estudos que investiguem o complexo de fatores que influenciam na gênese da cirrose hepática, tornam-se possíveis e essenciais, visto que em estágios avançados, o transplante torna-se a única terapia efetiva (Iredale 2007). Em função da dificuldade de realização de transplantes hepáticos no país, o conhecimento de novos agentes capazes de atuar nas vias dessa doença, reduzindo as agressões teciduais decorrentes de lesões hepáticas crônicas, e consequentemente reestabelecimento da função hepática (Lyra et al., 2007), também são necessários.

Dentre as possíveis alternativas terapêuticas, a melatonina, hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, torna-se uma excelente opção de estudo. Pois na literatura, essa indolamina tem sido citada por regular vários processos fisiológicos em mamíferos (Carrillo-Vico et al., 2004), apresentando atuação contra a ação dos radicais livres (Galano; Tan; Reiter, 2011), como modulador de respostas inflamatórias e imunológicas (Maganhin et al., 2008). A ação da melatonina parece ser ainda mais relevante devido a sua capacidade de atravessar todas as barreiras morfofisiológicas e de distribuir-se amplamente nos tecidos, células e compartimentos subcelulares, possibilitado sua interação com moléculas tóxicas na totalidade da célula (Tomás-Zapico; Coto-Montes 2005). Desta forma, este estudo teve como objetivo, avaliar o potencial terapêutico da melatonina no complexo de alterações que caracterizam a cirrose hepática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 25 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, pesando em torno de 200 ± 25 g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00h. Os animais foram divididos, ao acaso, em cinco grupos, cada um constituído por 5 animais, a saber:

Grupo I - ratos sem indução a cirrose (controle);

Grupo II – ratos induzidos a cirrose hepática pela tioacetamida por 8 semanas;

Grupo III- ratos induzidos a cirrose hepática pela e tratados com melatonina, simultaneamente, por 8 semanas;

Grupo IV- ratos induzidos a cirrose hepática pela tioacetamida por 8 semanas e depois tratados com melatonina por mais 8 semanas;

Grupo V - ratos induzidos a cirrose hepática pela tioacetamida por 8 semanas e sem tratamento com melatonina por 8 semanas.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 23082.013261/2014.

2.2. Indução da cirrose

A tioacetamida foi diluída em água destilada e administrada intraperitonealmente na dosagem de 200 mg/1000g de peso corporal, três vezes por semana, durante 8 semanas (Alshawsh et al., 2011). As doses da droga foram ajustadas de acordo com o peso

individual de cada animal, como preconiza Li; Benjamin; Alexander (2002) e Guerra et al. (2009).

2.3. *Tratamento com melatonina*

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima; Baracat; Simões (2004). Foi administrada 20mg/1000g de peso corporal do animal por meio de injeções intraperitoneais no início da noite (18:00h), durante 8 semanas. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02mL) e diluída em solução salina 0,9% (NaCl a 0,9%). Os animais dos grupos I e V receberam solução de NaCl 0,9% e 0,02mL de etanol.

2.4. *Análise histopatológica e histoquímica*

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após os períodos experimentais de cada grupo. Para tanto, foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular. Em seguida, procedeu-se à remoção do fígado, os quais foram imersos em formol tamponado à 10%, permanecendo no mesmo por 24 horas. Após esse procedimento, os fígados foram clivados e submetidos à técnica histológica de inclusão em parafina. A seguir, os blocos foram cortados, corados com Hematoxilina e Eosina (H.E) para análise de rotina histopatológica e pelo Ácido periódico de Schiff (PAS) e picrosirius para detecção de glicogênio e fibras colágenas, respectivamente. A quantificação do teor de glicogênio e fibras colágenas interlobulares foram realizadas através de imagens capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue).

2.4. Detecção de lipídeos

Fragmentos retirados do fígado de todos os animais foram fixados utilizando-se formaldeído a 4% com tampão fosfato 0,1M por duas horas e logo após as amostras foram tratadas com solução de sacarose nas concentrações de 15 e 30% por 24 horas cada, respectivamente, sob resfriamento com N-hexano antes de ser congelada em nitrogênio líquido e acondicionado em freezer -80°C. Em seguida o material foi cortado em criostato RM 2035 (Reichert S, Leica), e coradas com solução de Oil Red O.

2.5. Análise bioquímica

Foram avaliados os níveis plasmáticos de glicose e de indicadores específicos de lesão hepática como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), albumina (ALB), globulina (GLOB) e proteína total (PT). Para isso, as amostras de plasma foram mantidas em freezer -80°C e determinadas com o auxílio do analisador bioquímico Vet test 8008 (*Blood chemistry analyzer*).

2.6. Marcadores de estresse oxidativo tecidual

O estresse oxidativo tecidual foi avaliado através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) e níveis de glutathiona reduzida (GSH). Para isso, o fígado foi coletado e, fragmentos deste órgão foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C.

Parte do tecido hepático foi homogeneizado em solução contendo KCl 1,15% e EDTA 3mM (5 mL por grama de tecido) e mantido em banho de gelo. Em seguida, parte do homogenato foi adicionada a um meio de reação contendo SDS 0,4%, ácido acético 7,5%, e ácido tiobarbitúrico 0,3% (pH 3,5). Os tubos de reação foram selados e incubados à 95 °C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de *n*-butanol para cada volume de reação, e os tubos foram centrifugados a 1000 ×g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada à 535 nm. A concentração foi obtida por comparação à uma curva padrão de malonildialdeído. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

Os níveis de GSH foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não-protéicos (Sedlak; Lindsay 1968). Para essa determinação, outra porção do homogenato hepático obtido foi submetido à precipitação proteica através da adição de solução de TCA 5% (até concentração final de 20 mg de tecido/mL) seguida de centrifugação (800 × g por 10 minutos). Em seguida, um volume de sobrenadante foi adicionado a nove volumes de meio de reação contendo TRIS 200 mM, EDTA 2 mM e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) 4 mM em metanol. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, e a absorbância foi mensurada à 412 nm. A concentração foi obtida por comparação à uma curva padrão de cisteína. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

2.7. *Dosagem de óxido nítrico - Reação de Griess*

Amostras de fígado foram processadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão de lise TX-100 acrescido de inibidores de proteases. As amostras foram

centrifugadas a 14000 pm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método Bradford.

2.8. *Imunohistoquímica (IL6, TNF- α , VEGF)*

Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois, respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue) (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001).

2.10. *Índice apoptótico*

Para isso foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram inicialmente desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois, respectivamente, e em seguida, incubados em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram

lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (± 20 minutos), sendo contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013)

2.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada em um programa computacional InStat®, onde dados foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Histopatologia e histoquímica

O fígado dos animais do grupo controle apresentaram parênquima hepático sem alterações com cordões de hepatócitos organizados margeando a veia centro lobular,

entremeados por capilares sinusóides (Fig. 1A). Nos animais induzidos a cirrose sem tratamento com melatonina o fígado apresentou alterações estruturais caracterizadas pela presença de nódulos no parênquima hepático, indicando a instalação da cirrose (Figs. 1B e 1E). Já os fígados dos animais tratados com melatonina apresentaram características semelhantes ao controle (Figs. 1C e 1D).

A reação pelo Ácido Periódico de Schiff foi positiva em todos os fígados dos animais dos grupos controle e nos dois grupos tratados com melatonina, sendo mais expressiva nestes últimos. Quanto à quantificação verificou-se que os fígados dos animais dos grupos tratados com melatonina apresentaram maior reserva de glicogênio em relação aos demais grupos (Figs. 2A-F). A coloração pelo picrosírius revelou intensa fibrose no fígado dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina quando comparado aos demais grupos experimentais, o que foi comprovado pela quantificação do colágeno (Fig. 3A-F).

3.2. Detecção de lipídeos

Foi analisada a quantidade de lipídio no fígado através da coloração específica Oil red. Os animais dos grupos controle e tratados com melatonina apresentaram níveis de lipídios no fígado semelhantes. No entanto, nos animais cirróticos sem tratamento com melatonina houve um aumento significativo na quantidade de lipídio, comparado com os demais grupos (Fig. 4A-E).

3.3. Análise bioquímica

As análises bioquímicas da glicose e das enzimas hepáticas revelaram alterações significativas, caracterizadas pelo aumento do ALT, AST GGT e FA, e redução nos níveis

de ALB, Glicose, Globulina e PT, nos animais cirróticos em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 1).

3.4. Marcadores de estresse oxidativo hepático

A análise tecidual dos níveis de GSH foram significativamente reduzidos nos grupos dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina quando comparado aos demais grupos (Fig. 5). Em relação as concentrações hepáticas dos níveis de peroxidação lipídica através do TBARS obsevou-se um comportamento contrario, ou seja, aumento significativo nos animais cirróticos sem tratamento com melatonina em comparação aos demais grupos experimentais (Fig. 6).

3.6. Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem do NO revelou um aumento significativo no fígado dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina e uma redução significativa nos animais tratados com melatonina por oito semanas. Não houve diferença significativa entre os animais tratados com melatonina simultaneamente e o controle (Fig. 7).

3.7. Imunohistoquímica (IL6, TNF- α , VEGF)

A análise imunohistoquímica da expressão do IL6, TNF- α e VEGF no fígado dos animais experimentais, mostrou que os animais tratados com melatonina apresentaram índices semelhantes aos observados no controle. Já os fígados dos animais cirróticos mostraram maior expressão desses fatores (Figs. 8, 9 e 10).

3.8. Índice apoptótico

O índice apoptótico revelou um aumento significativo no fígado dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina, enquanto que nos animais tratados com melatonina esse índice não diferiu do controle (Fig. 11).

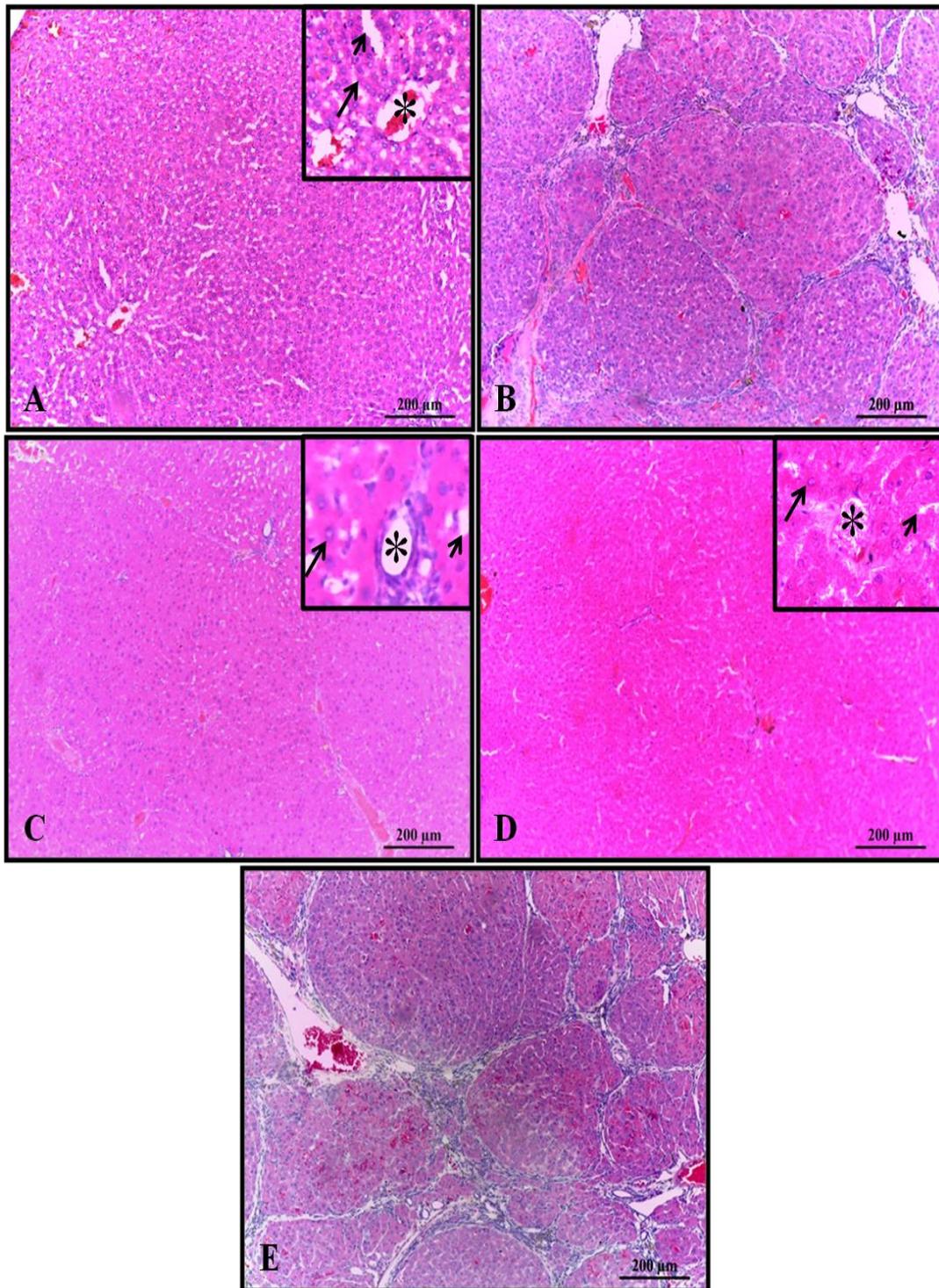


Figura 1: Fígado dos animais dos grupos experimentais. A – controle; B – induzidos à cirrose por 8 semanas; C – induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; em E - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Verificar presença de lóbulos irregulares em B e E. Asterisco - veia centro lobular, seta longa - hepatócito, seta curta - sinusóide. Coloração H.E.

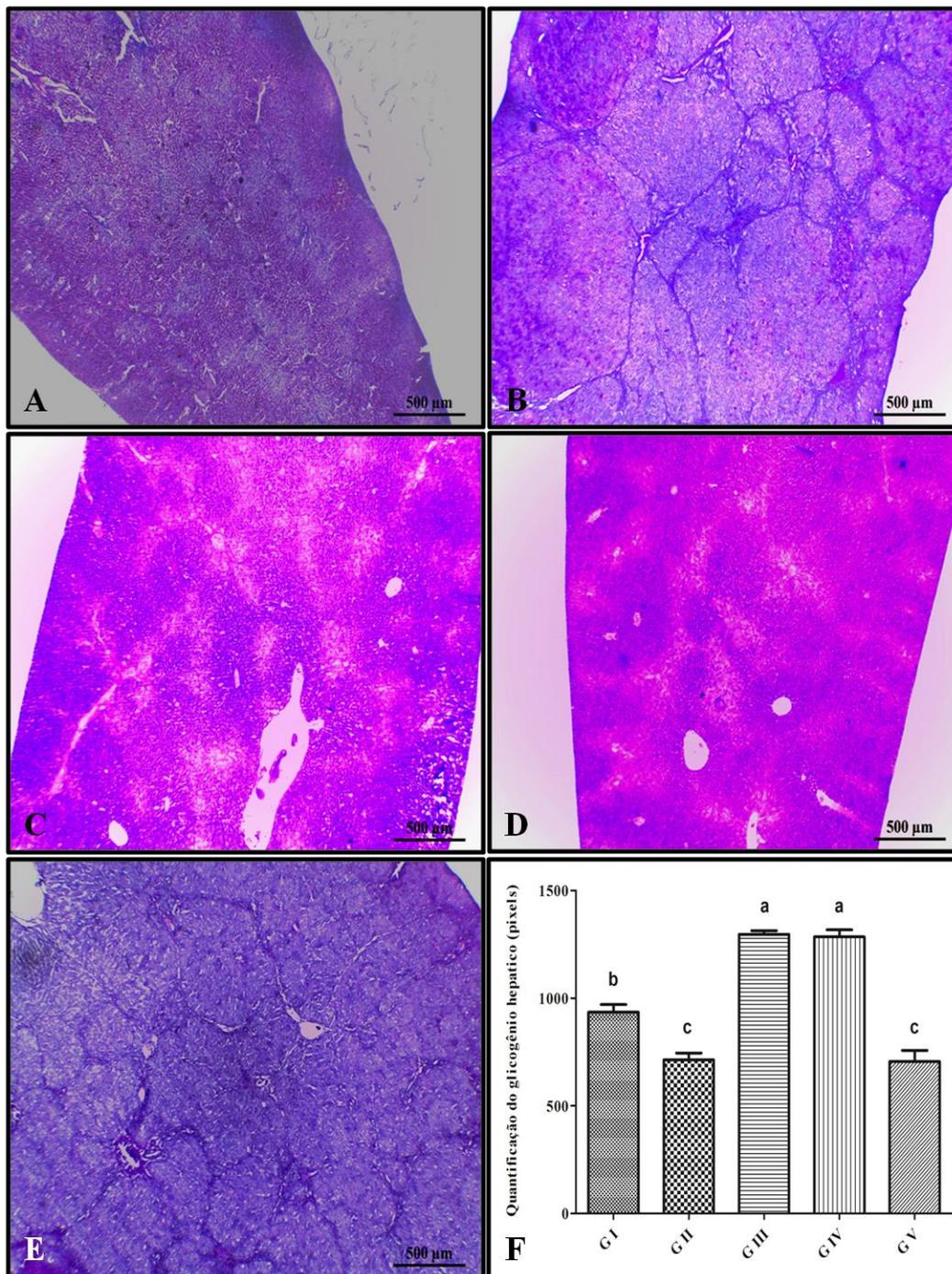


Figura 2: Fígado dos animais dos grupos experimentais corados pelo Ácido Periódico de Schiff e quantificação do glicogênio hepático. A e GI- controle; B e GII – induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels do glicogênio hepático. Verificar marcação intensa em C e D. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

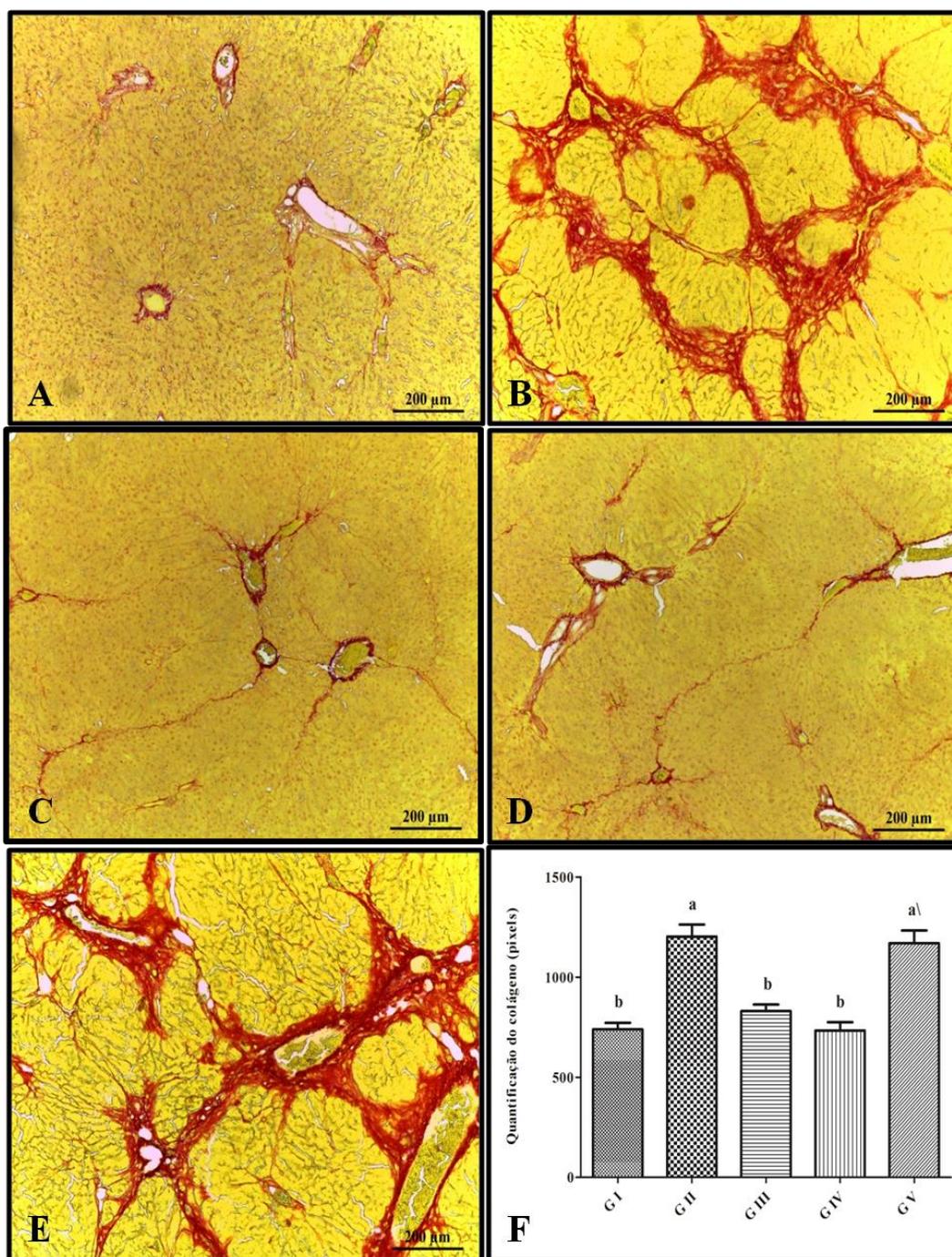


Figura 3: Fígado dos animais dos grupos experimentais corados pelo picrosírius e quantificação de fibras colágenas. A e GI– controle; B e GII – induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels de fibras colágenas. Verificar intensa marcação interlobular em B e E. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

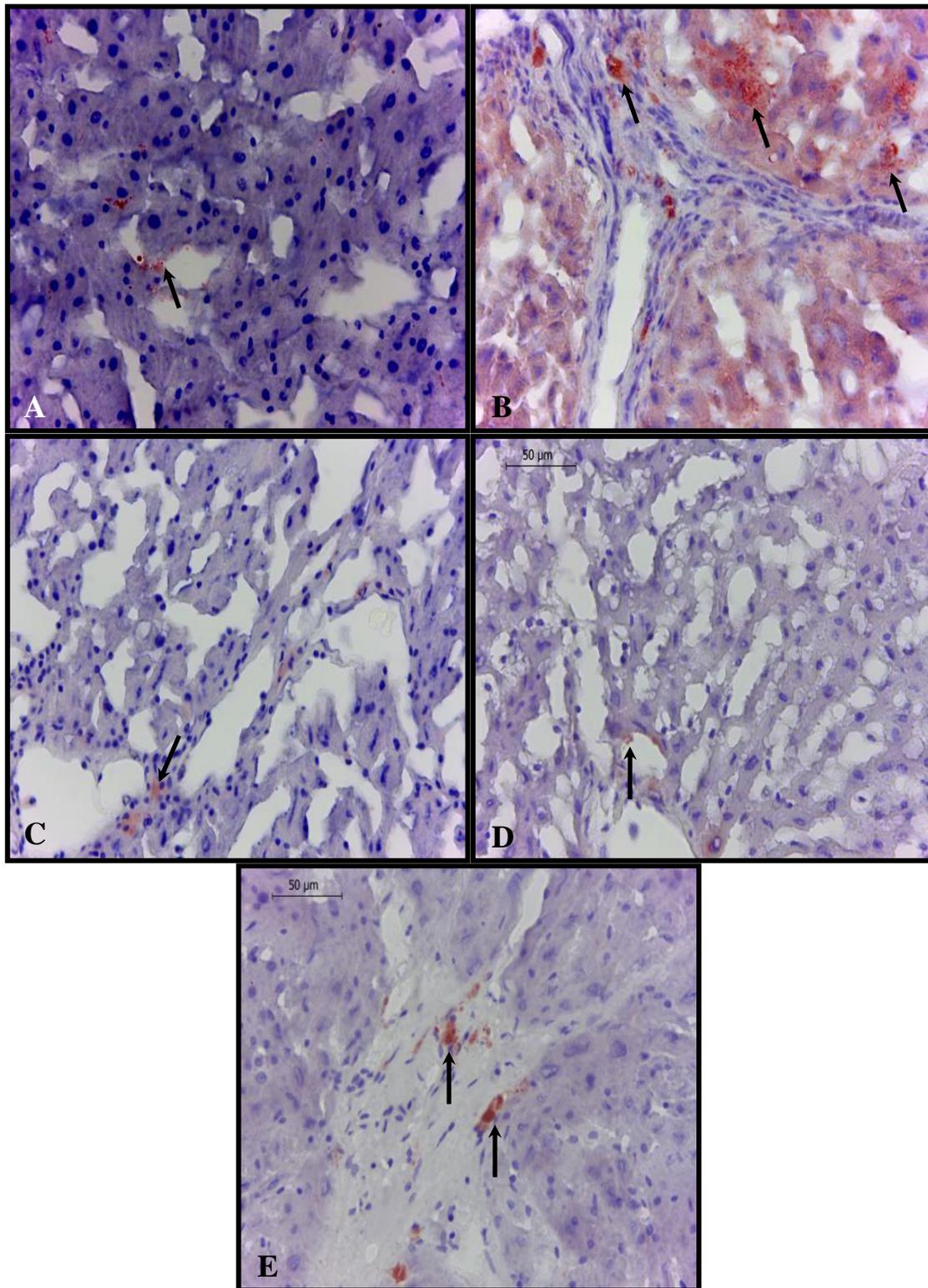


Figura 4: Detecção de lipídios. Coloração: Oil Red. A – controle; B – induzidos à cirrose por 8 semanas; C – induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; em E - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Verificar intensa marcação em B e E.

Tabela 1: Média das dosagens sericas das enzimas indicadoras da função hepática e glicose nos animais dos grupos experimentais.

Grupos	G I	G II	G III	G IV	G V	P
ALT (U/L)	96,80 ± 5,91b	179,00 ± 5,32 ^a	89,60 ± 4,87b	102,60 ± 7,54b	209,40 ± 4,77a	0,0169
AST (U/L)	290,00± 32,09b	773,60 ± 43,21 ^a	291,60 ± 28,55b	326,20 ± 23,90b	714,80 ± 52,87a	0,0051
GGT (U/L)	3,39 ± 0,21b	6,59 ± 1,12 ^a	3,60 ± 0,53b	3,50 ± 1,00b	7,17 ± 1,33a	0,0098
FA (U/L)	156,20 ± 7,66b	248,80 ± 4,97 ^a	169,80 ± 6,23b	163,20 ± 8,09b	242,80 ± 3,67a	0,0126
ALB (g/dL)	5,34 ± 0,13 ^a	1,51 ± 0,43b	5,01 ± 0,25 ^a	4,20 ± 0,77 ^a	1,96 ± 0,55b	0,0315
GLI (mg/dL)	111,40 ± 10,32 ^a	59,20 ± 7,10b	109,40 ± 6,59a	105,80 ± 6,12 ^a	61,60 ± 4,93b	0,0105
GLOB (g/dL)	1,75 ± 0,09 ^a	0,54 ± 0,01b	1,54 ± 0,11 ^a	1,81 ± 0,21 ^a	0,62 ± 0,08b	0,0287
PT (g/dL)	6,69 ± 1,18 ^a	2,25 ± 0,28b	5,95 ± 0,98 ^a	7,01 ± 0,24a	2,35 ± 0,16b	0,0498

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Gama-glutamil transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA), Albumina (ALB), Glicose (GLI), Globulina (GLOB) e Proteína total (PT). GI- controle; GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; GIII- induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; GV- induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas.

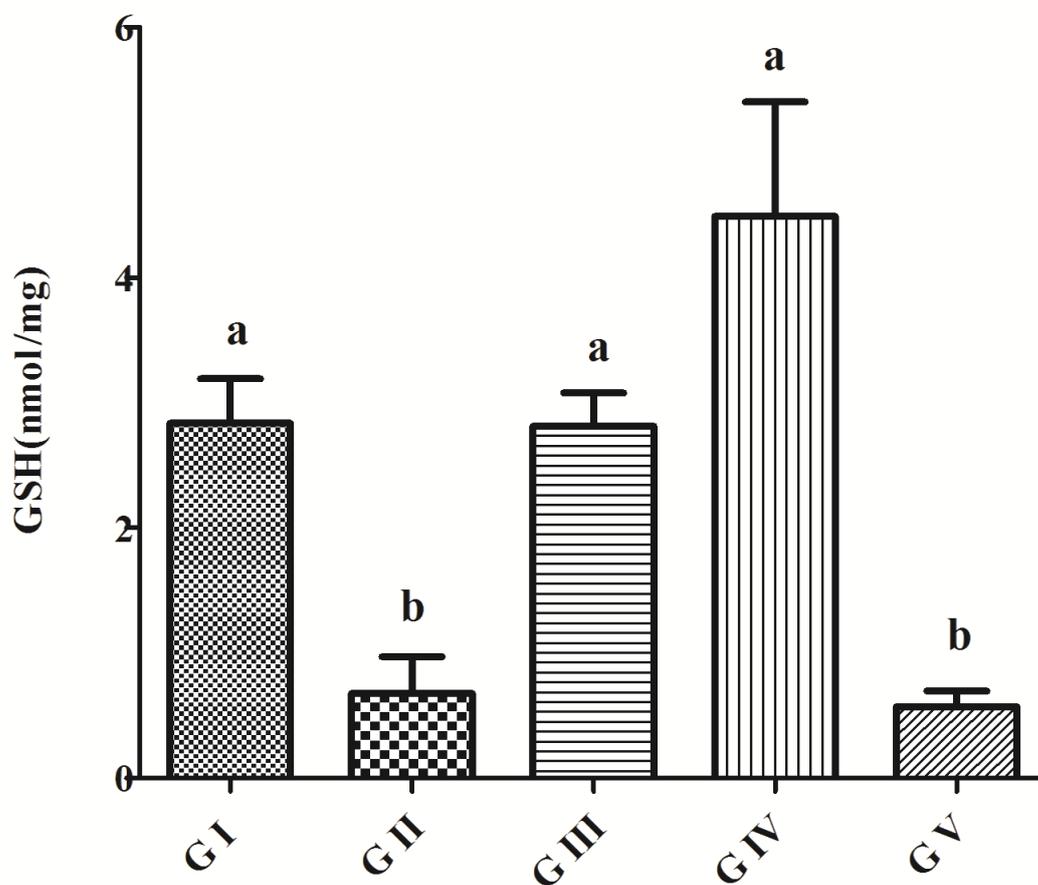


Figura 5: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. G I – controle; G II – induzidos à cirrose por 8 semanas; G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

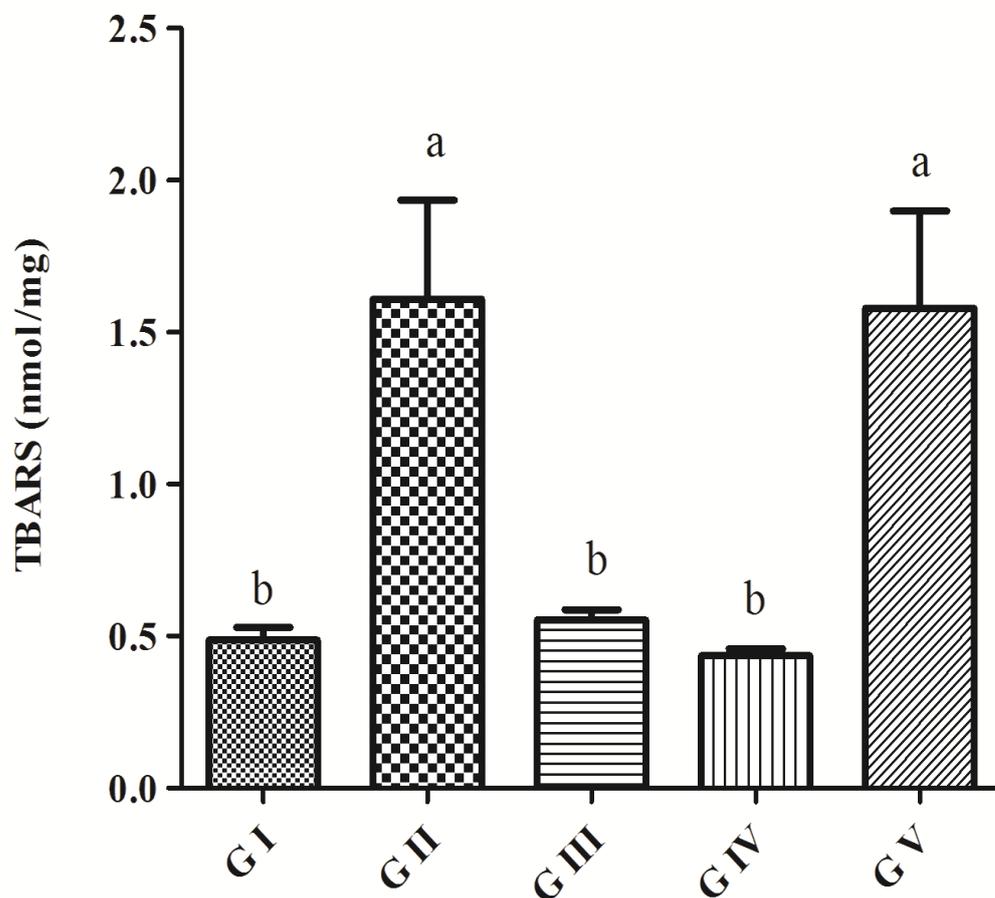


Figura 6: Peroxidação Lipídica (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

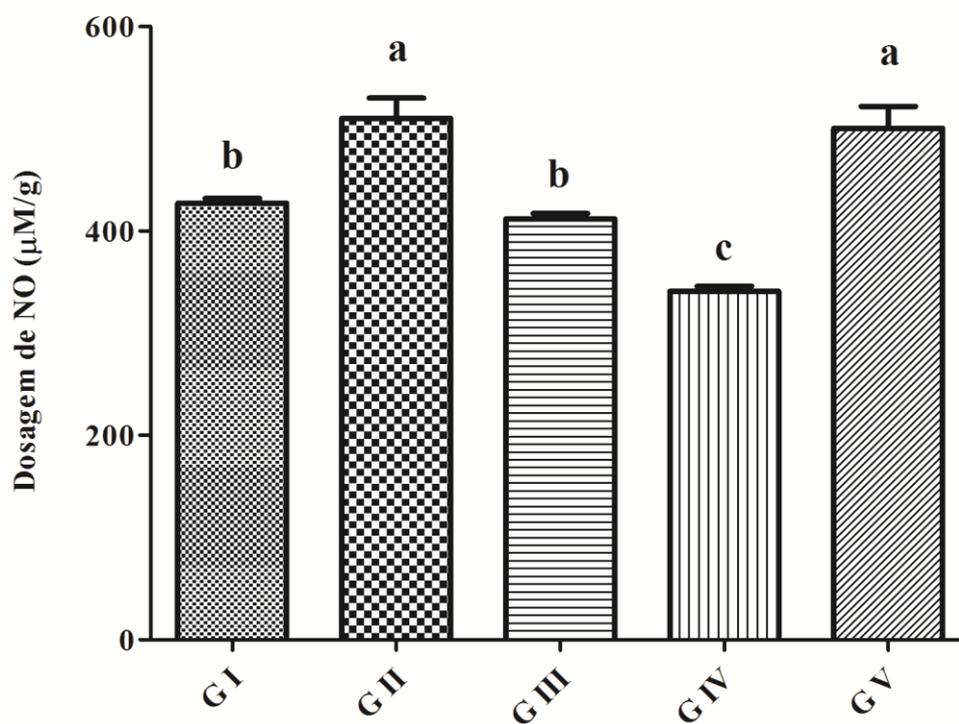


Figura 7: Dosagem de óxido nítrico no fígado dos animais dos grupos experimentais G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

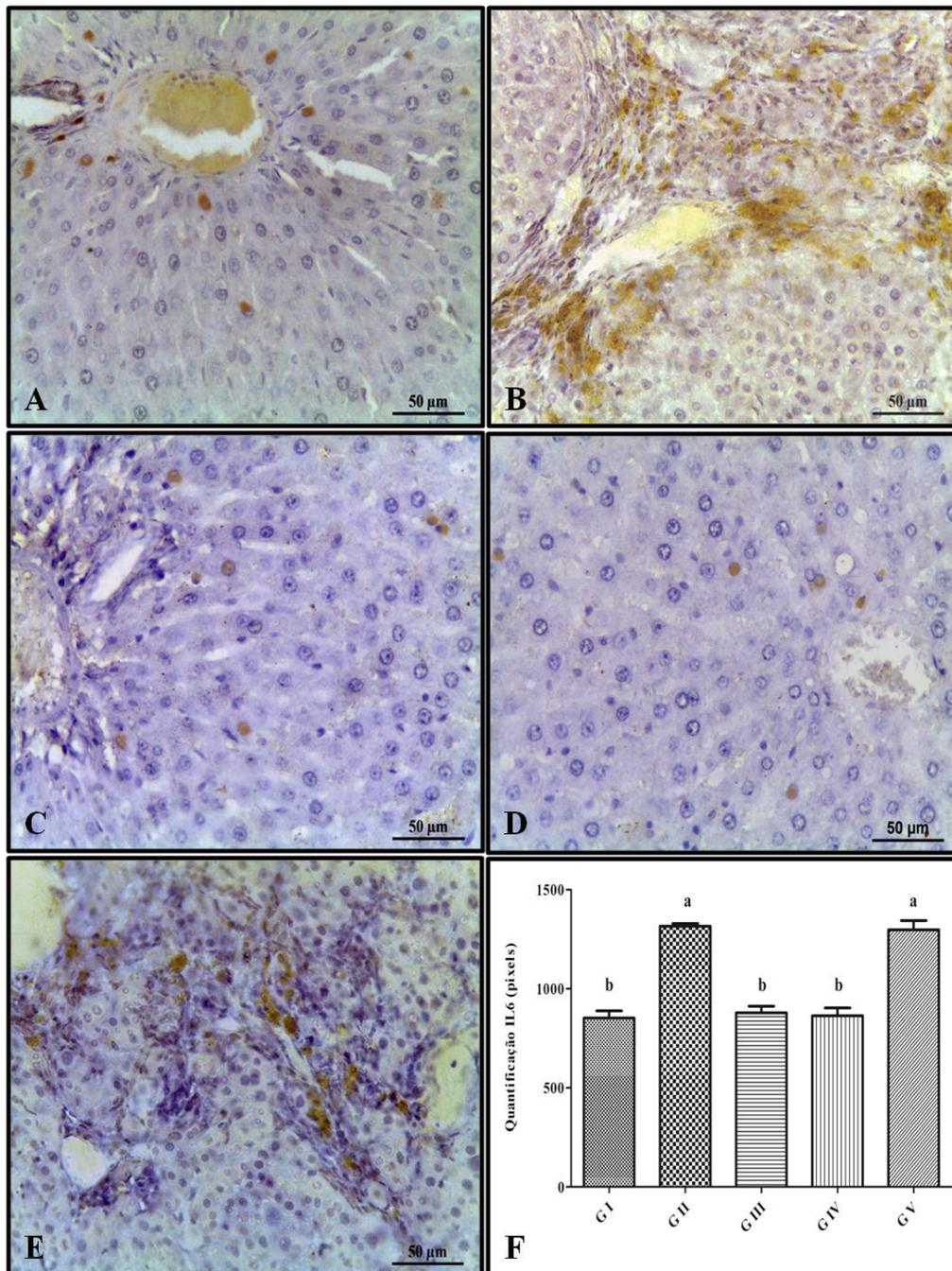


Figura 8: Imunohistoquímica e quantificação do IL6. A e GI – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL6. Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

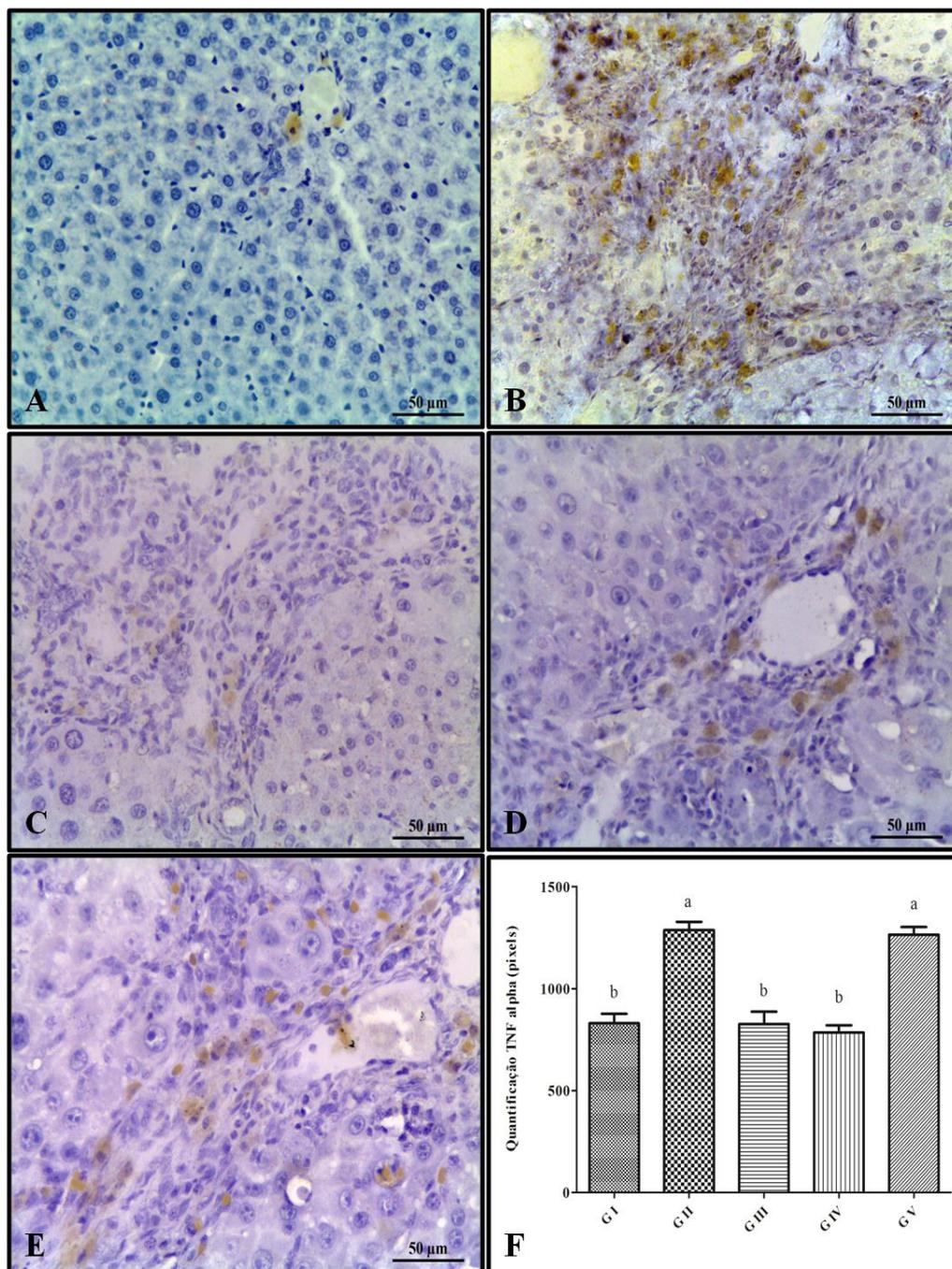


Figura 9: Imunohistoquímica e quantificação do TNF α . A e GI – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do TNF α . Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

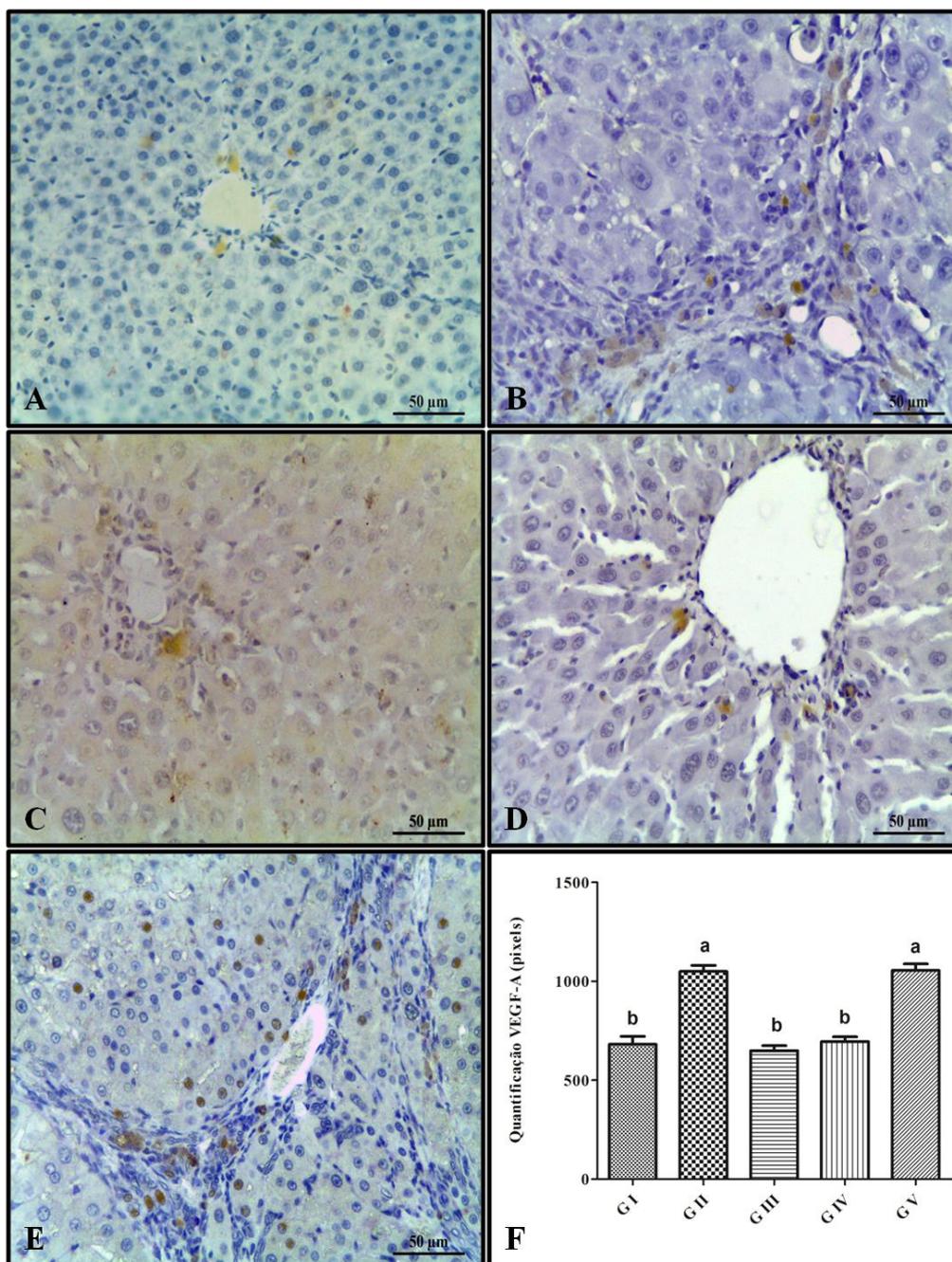


Figura 10: Imunohistoquímica e quantificação do VEGF. A e G1 – controle; B e GII– induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII– induzidos à cirrose + melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV- induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do VEGF. Observar em A, C e D fraca marcação, em B e E forte marcação. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV em relação aos outros. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

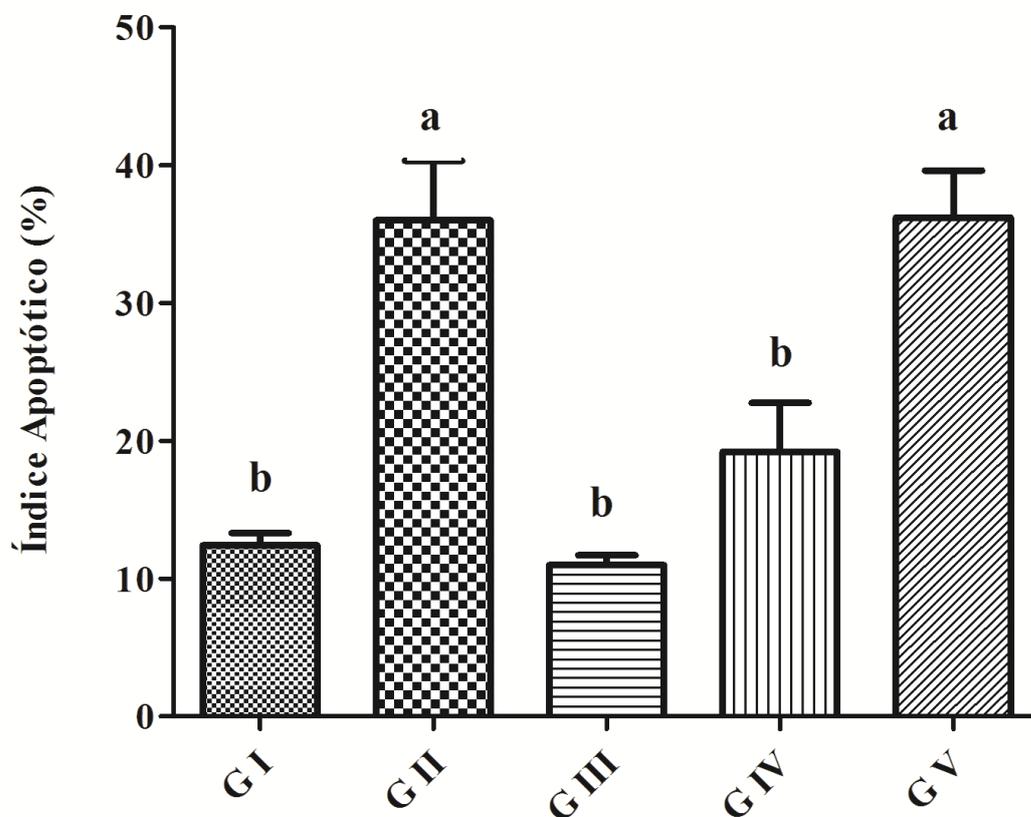


Figura 11: Índice apoptótico. G I - controle, G II – induzidos à cirrose por 8 semanas, G III - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, G IV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e G V - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Observar aumento significativo nos grupos G II e G V. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A lesão hepática induzida por drogas é um problema clínico importante e até agora sem solução. Ela surge através de complexos mecanismos de várias etapas, que são iniciadas pelo dano químico às células do fígado, desencadeando respostas biológicas, que podem ser protetoras ou resultar em toxicidade (Kaplowitz, 2005). Assim, estratégias terapêuticas que proporcionem redução das agressões hepáticas crônicas e melhora da função do órgão, ou que pelo menos, forneça suporte funcional temporário até que um novo fígado esteja disponível para o transplante, torna-se necessário para a saúde pública.

Em nosso estudo, os fígados dos animais dos grupos tratados com melatonina, apresentaram parênquima hepático semelhante aos dos animais do grupo controle, mostrando um suposto efeito protetor e regressão dos efeitos tóxicos da tioacetamida (TAA) sobre o órgão, o que não aconteceu nos grupos que apenas foram induzidos à cirrose hepática, os quais apresentaram alterações estruturais caracterizadas pela presença de nódulos no parênquima hepático, indicando a instalação da cirrose. Tais resultados foram confirmados por meio de coloração específica (picrosírius), que revelou intensa fibrose no fígado dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina, os quais apresentaram maior quantidade de colágeno.

Diversos estudos evidenciam o envolvimento da melatonina em diversas funções no organismo, tais como: na atividade imunomodulatória (Carrillo-Vico et al., 2005), antiinflamatória (Chahbouni et al., 2010; Jung et al., 2010), funções homeostáticas na mitocôndria (Jou et al., 2010; Paradies et al., 2010), inibição da progressão do câncer (Jung-Hynes et al., 2010; Park et al., 2010) e como potente propriedades antioxidantes (Reiter et al., 2009; Romero, 2010; Galano; Tan; Reiter 2011), o que pode explicar os resultados nos animais tratados com esse hormônio. Estudos realizados por Cruz et al.

(2005), também confirmam efeito hepatoprotetor da melatonina sobre os efeitos da TAA em fígados de ratos.

Além disso, vários estudos revelaram a que o tratamento de camundongos e ratos com TAA induziu danos celulares no fígado, fibrose e/ou cirrose, associada ao aumento do estresse oxidativo e ativação das células estreladas hepáticas (Li; Benjamin; Alexander, 2002; Alshawsh et al., 2011), célula-chave na síntese dos elementos da matriz extracelular (Geerts, 2001; Andrade 2005).

Quanto a análise do conteúdo de glicogênio, nossos achados podem ser justificados quando verificamos na literatura que a melatonina tem participação no metabolismo energético da célula. Pois Mazepa et al. (2000), ao investigar o efeito da melatonina sobre vários parâmetros do metabolismo de carboidratos e lipídios em ratos, viram que houve um aumento do conteúdo de glicogênio hepático e muscular nos animais tratados com melatonina. Tiskou (2006), também observou uma redução substancial dos níveis de glicose no sangue de animais diabéticos que receberam melatonina, quando comparado com os que não receberam esse hormônio. Nesse contexto, Schinoni (2006) afirma que, quando a glicemia está elevada, o fígado sintetiza glicogênio; quando a glicemia cai, o fígado utiliza o glicogênio armazenado para sintetizar glicose (glicogenólise), liberando-a na corrente sanguínea. Além disso, segundo Nakaya et al (2007), pacientes com cirrose não têm estoque de glicogênio adequado por causa da atrofia do fígado. Isso confirma nossos resultados, pois tanto a coloração com P.A.S, quanto a quantificação do conteúdo de glicogênio e a dosagem bioquímica de glicose, mostram que nos animais dos grupos tratados com melatonina, houve uma diferença significativa em relação aos animais cirróticos.

Os níveis plasmáticos das enzimas ALT, AST, GGT, fosfatase alcalina, albumina, globulina (GLO) e proteínas totais (PT) nos animais que receberam melatonina,

apresentaram-se semelhantes aos do controle. As enzimas AST e ALT estão relacionadas com a integridade dos hepatócitos e quando ocorrem lesões ou destruição das células hepáticas, há liberação destas para a circulação sanguínea (Motta, 2000), Além disso, quando os níveis de GGT e fosfatase alcalina, apresentam-se elevados há distúrbio hepático (Mincis; Mincis, 2007; Motta, 2009), enquanto que a albumina, globulina e proteínas totais, sintetizadas exclusivamente pelo fígado, apresentam-se em concentrações baixas no plasma, em casos de doença hepática (Santos et al., 2004; Baynes, Dominiczak, 2007), características estas que foram confirmadas em nossa pesquisa nos grupos cirróticos sem tratamento com melatonina.

A redução dos níveis plasmáticos dessas enzimas nos grupos tratados com melatonina mostra que esse hormônio melhora e previne o tecido hepático dos danos causados pela TAA. Esta teoria é reforçada ao se analisar publicações de experimentos que utilizaram a melatonina como tratamento de injúrias hepáticas variadas, como esteatose hepática não alcoólica (Gonciarz et al, 2012), isquemia (Sener et al, 2003; Kim; Lee, 2008) e fibrose (Cruz et al., 2005), obtendo a redução dos níveis das enzimas hepáticas. Esses autores relacionaram essa redução ao aumento das enzimas antioxidantes, principalmente o GSH, o que também foi evidenciado nesta pesquisa, mostrando que além do efeito protetor, a melatonina apresenta uma capacidade de reverter os efeitos tóxicos da TAA sobre o fígado.

A literatura ainda relata que a cirrose hepática induzida pelo TAA está associada à exacerbação da peroxidação lipídica e ao esgotamento do estado antioxidante (Abul et al, 2002). Em contrapartida, a melatonina é um potente antioxidante, tendo sua atividade sequestradora de espécies reativas, evidenciada tanto in vivo quanto in vitro (Tan; Chen; Poeggeler, 1993). Ainda sabe-se que a TAA precisa passar por ativação metabólica através do complexo microsomal citocromo P-450, localizado no retículo

endoplasmático liso hepático (Baskaran, Periyasamy; Rajagopalan, 2010) e a base molecular para atribuir uma ação antioxidante à melatonina baseia-se na sua capacidade de atuar como um doador de elétrons em processos não enzimáticos, além de inibir enzimas da família citocromo P450 (Maganhin et al, 2008). Além disso, lesão hepática está associada à necrose celular, aumento da peroxidação lipídica do tecido, causado pelo estresse oxidativo, e depleção nos níveis de GSH tecidual (Alshawsh 2011), o que justifica o fato dos níveis de GSH terem se mostrado significativamente reduzidos e os níveis de peroxidação lipídica significativamente aumentado nos animais cirróticos sem tratamento com melatonina, em comparação aos demais grupos experimentais.

Para adicionar justificativa a esses resultados, devemos ressaltar um estudo realizado por Weishaupt et al. (2006), relataram que a glutatona peroxidase, outra enzima de grande importância para a eliminação de radicais livres do organismo, sofreu aumento em sua síntese em cérebro de ratos tratados com melatonina, comprovando que este hormônio também exerce ação sobre outras enzimas protetoras contra reativos tóxicos.

Os indicadores histopatológicos de lesão identificados no parênquima hepático foram coerentes aos resultados imunohistoquímicos e bioquímicos, pois, os animais induzidos à cirrose apresentaram aumento significativo nos níveis de NO e maior expressão das marcações para IL-6, TNF- α e VEGF, em comparação com os animais dos outros grupos. Este resultado deve estar relacionado ao fato de a melatonina atuar no tecido danificado, devido sua ampla capacidade de distribuição (Tomás-Zapico; Coto-Montes 2005), com sua capacidade antioxidante e inibidora de enzimas pró-oxidantes, citocinas e enzimas pró-inflamatórias (Dominguez-Rodriguez et al., 2007; Kim et al., 2009). Além disso, ela atua como modulando a produção de fator de crescimento do endotélio, reduzindo a angiogênese (Alvarez-García et al., 2012).

Quanto ao índice apoptótico, alguns estudos mostram a ação antiapoptótica da melatonina em diferentes órgãos, como timo, rim, cérebro e fígado e, atribuem isso principalmente a suas propriedades antioxidantes (Koh, 2008; Molpeceres et al., 2007; Joubert; Marais; Maritz 2009) ao eliminar radicais hidroxila (OH⁻), peroxila (ROO⁻) 26, superóxidos (Choi et al., 2002) e a oxidação da cardiolipina nas mitocôndrias (Paradies et al., 2010). A modulação de elementos imunológicos também é um mecanismo pelo qual a melatonina pode inibir a apoptose, induzindo a liberação de citocinas como a interleucina 4 (IL-4) (Ferreira et al., 2010), mostrando assim, as várias vias de atuação desse hormônio no organismo.

Assim, conclui-se com este estudo, que a melatonina atua não apenas de forma protetora contra as ações da TAA, mas suas ações se estendem reduzindo os danos causados por esse xenobionte no tecido hepático.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

6. REFERÊNCIAS

- ABUL, H.; MATHEW, T. C.; DASHTI, H. M.; AL-BADER, A. Level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and uric acid in thioacetamide-induced cirrhotic rats. **Anat Histol Embryol.**, v. 31, n. 2, p. 66–71, 2002.
- ALEYNIK, S. I.; LEO, M. A.; MA, X.; ALEYNIK, M. K.; LIEBER, C. S. Polyenylphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. **J. Hepatol.**, v. 27, n. 3, p. 554-561, 1997.

- ALSHAWSH, M. A.; ABDULLA, M. A.; ISMAIL, S.; AMIN, Z. A. Hepatoprotective Effects of Orthosiphon stamineus Extract on Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 1-6, 2011.
- ALVAREZ-GARCÍA, V.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; COS, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **J Pineal Res.**, v. 54, n. 4, p. 373- 380, 2013.
- ALVES, R. S. C.; CIPOLLA-NETO, J.; NAVARRO, J. M.; OKAY, Y. Amelatonina e o sono em crianças. **Pediatria (São Paulo)**, v. 20, n. 2, p. 99-105, 1998.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev Soc Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.
- BASKARAN, M.; PERIYASAMY, L.; RAJAGOPALAN, R. Effect of Phyllanthus niruri on alcohol and polyunsaturated fatty acid induced oxidative stress in Liver. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 2, n. 4, p. 58–62, 2010.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. H. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 716 p.
- BRENNER, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, v. 120, p. 361-368, 2009.
- CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.**, v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.
- CHAHBOUNI, M.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; SEVILLA, B.; GARCIA, J. A.; LÓPEZ, L. C.; MUÑOZ-HOYOS, A.; MOLINA-CARBALLO, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. **J. Pineal Res.**, v. 48, n.3, p. 282-289, 2010.
- CHOI, B. M.; PAE, H. O.; JANG, S. I.; KIM, Y. M.; CHUNG, H. T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. **J Biochem Mol Biol.**, v. 35, n. 1, p. 116-126, 2002.

CRUZ, A.; PADILLO, F. J.; TORRES, E.; NAVARRETE, C. M.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; CABALLERO, F. J.; BRICEÑO, J.; MARCHAL, T.; TÚNEZ, I.; MONTILLA, P.; PERA, C.; MUNTANÉ, J. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 143–150, 2005.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A.; ABREU-GONZALEZ, P.; GARCIA-GONZALEZ, M. J.; KASKI, J. C.; REITER, R. J.; JIMENEZ-SOSA, A. A. Unicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of Melatonin as an adjunct in patients with acute myocardial infarction undergoing primary angioplasty: the melatonin adjunct in the acute myocardial infarction treated with angioplasty (MARIA) trial: Study design and rationale. **Contemp Clin Trials.**, v. 28, n. 4, p. 532-539, 2007.

FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E. C.; SOARES-JR, J. M. melatonina: modulador de morte celular. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 56, n. 6, p. 715-718, 2010.

FORBES, S. J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 207-217, 2011.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **J. Pineal Res.**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2011.

GARCIA-TSAO, G.; LIM, J. K. Management and treatment of patients with cirrhosis and portal hypertension: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 104, n. 7, p. 1802-1829, 2009.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Semin. Liver Dis.**, v.21, n. 3, p.311–335, 2001.

GONCIARZ, M.; GONCIARZ, Z.; BIELANSKI, W.; MULARCZYK, A.; KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 35-40, 2012.

GUERRA, R. R.; TROTTA, M.R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Modulation of

extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.

HEIDELBAUGH, J. J.; SHERBONDY, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. **Am. Fam. Physician.**, v. 74, n. 5, p. 767-776, 2006.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 3, p. 539-548, 2007.

JOU, M. J.; PENG, T. I.; HSU, L. F.; JOU, S. B.; REITER, R. J.; YANG, C. M.; CHIAO, C. C.; LIN, Y. F.; CHEN, C. C. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca^{2+} - mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. **J. pineal Res.**, v. 48, n. 1, p. 20-38, 2010.

JOUBERT, A.; MARAIS, S.; MARITZ, C. Influence of 2-methoxyestradiol on MCF-7 cells: an improved differential interference contrasting technique and Bcl-2 and Bax protein expression levels. **Biocell.**, v. 33, n. 1, p. 67-70, 2009.

JUNG, K. H.; HONG, S. W.; ZHENG, H. M.; LEE, H. S.; LEE, H.; LEE, D. H.; LEE, S. Y.; HONG, S. S. Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. **J Pineal Res.**, v. 48, n. 3, p. 239–250, 2010.

JUNG-HYNES, B.; HUANG, W.; REITER, R. J.; AHMAD, N. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. **J Pineal Res.**, v. 49, n. 1, p. 60–68, 2010.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nat. Rev Drug Discov.**, v. 4, n. 6, p. 489–499, 2005.

KIM, J. B.; JUNG, J. Y.; AHN, J. C.; RHEE, C. K.; HWANG, H. J. Antioxidant and anti-apoptotic effect of melatonin on the vestibular hair cells of rat utricles. **Clin Exp Otorhinolaryngol.**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 2009.

KIM, S. H.; LEE, S. M. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. **J Pineal Res.**, v. 44, n. 2, p. 165-171, 2008.

KOH, P. O. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. **J Rev Med Sci.**, v. 70, n. 7, p. 747-750, 2008.

- LEE, E. -S.; KIM, J. -H.; IM, S.; LEE, K. B.; SOHN, S.; KANG, W. H. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, n. 1, p. 45-49, 2001.
- LEWIS, B. S.; FLUGELMAN, M. Y.; WEISZ, A.; KEREN-TAL, I.; SCHAPER, W. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? **Cardiovasc. Res.**, v. 35, p. 490-497, 1997.
- LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thiocetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **J. Hepatol.** , v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.
- LYRA, A. C.; SOARES, M. B. P.; SILVA, L.F.M.; FORTES, M. F.; SILVA, A.G. P.; MOTA, A.C.A.; OLIVEIRA, S.A.; BRAGA, E.L.; CARVALHO, W.A.; GENSER, B.; SANTOS, R. R.; LYRA, L.G. C. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 7, p. 1067-1073, 2007.
- MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JR, M. J. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 54, n. 3, p. 267-271, 2008.
- MAZEPA, R. C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P. S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sci.**, v. 66, n. 2, p. 153-160, 2000.
- MEDINA, J.; ARROYO, A. G.; SANCHEZ-MADRID, F.; MORENO-OTERO, R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. **Hepatol.**, v. 39, n. 5, p. 1185-1195, 2004.
- MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: por que são importantes para o estudo de patologias do fígado. **Prática Hosp.**, Ano IX, n. 51, p. 44-48, 2007.
- MOLPECERES, V.; MAURIZ, J. L.; MEDIAVILLA, M. G. V.; GONZÁLEZ, P.; BARRIO, J. P.; GALLEGO, J. G. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. **J Gerontol A Bio Sci. Med Sci.**, v. 62, n. 7, p. 687-695, 2007.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora: Médica Massau, vol. 7, 2000.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. Editora: Mdbook, 2009.

NAKAYA, Y.; OKITA, K.; SUZUKI, K.; MORIWAKI, H.; KATO, A.; MIWA, Y.; SHIRAIISHI, K.; OKUDA, H.; ONJI, M.; KANAZAWA, H.; TSUBOUCHI, H.; KATO, S.; KAITO, M.; WATANABE, A.; HABU, D.; ITO, S.; ISHIKAWA, T.; KAWAMURA, N.; ARAKAWA, Y. BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. **Nutrition**, v.23, n. 2, p.113-120, 2007.

OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 105, n. 5, p. 333-355, 1996.

ONORI, P.; MORINI, S.; FRANCHITTO, A.; SFERRA, R.; ALVARO, D.; GAUDIO, E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl4- treated rats. **J. Hepatol.**, v. 33, n.4, p. 555-563, 2000.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; REITER, R. J.; RUGGIERO, F. M. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 4, p. 297-310, 2010.

PARK, S. Y.; JANG, W. J.; YI, E. Y.; JANG, J. Y.; JUNG, Y.; JEONG, J. W.; KIM, Y. J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. **J. Pineal Res.**, v. 48, n. 2, p. 178–184, 2010.

PENZ-ÖSTERREICHER, M.; ÖSTERREICHER, C. H.; TRAUNER, M. Fibrosis in Autoimmune and Cholestatic Liver Disease. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 245–258, 2011.

PERES, W.; TUÑÓN, M. J.; COLLADO, P. S.; HERMANN, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The flavanoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **J. Hepatol.**, v. 33, n. 5, p. 742-750, 2000.

PEREIRA-FILHO, G.; FERREIRA, C.; SCHWENGBER, A.; MARRONI, C.; ZETTLER, C.; MARRONI, N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 45, n. 2, p. 156-162, 2008.

- PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. C. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. *Braz. J. Medic. Biol. Res.*, v. 37, n.7, p. 987-995, 2004.
- REITER, R. J.; PAREDES, S. D.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 44, n. 4, p.175–200, 2009.
- ROMERO, A.; EGEA, J.; GARCÍA, A. G.; LÓPEZ, M. G. Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Pineal Res.*, v. 49, n. 2, p. 141–148, 2010.
- SANTOS, N. S. J.; DRAIBE, S. A.; KAMIMURA, M. A.; CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. nutrição*, v. 17, n. 3, p. 339-349, 2004.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.*, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.
- SENER, G.;TOSUN, O.; ŞEHIRLI, A. O.; KAÇMAZ, A.; ARBAK, S.; ERSOY, Y.; AYANOĞLU-DÜLGER, G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sciences*, v. 72, n. 24, p. 2707–2718, 2003.
- TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.*, v. 1, p.57– 60, 1993.
- TISKOU, G. Evaluación del estrés oxidativo en ratas com diabetes mellitus tipo I inducida por estreptozotocina: efecto protetor de la hormona melatonina. *Gaceta de ciencias veterinarias*, v. 12, n. 1, p. 19-26, 2006.
- TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J. Pineal Res.*, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2005.
- TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta.*, v. 364, n. 1-2, p. 33-60, 2006.

VARGAS, R. S.; FRANÇA, F. C. V. Processo de Enfermagem aplicado a um portador de Cirrose Hepática utilizando as terminologias padronizadas NANDA, NIC e NOC. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, n. 3, p. 348-352, 2007.

WANLESS, I. R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.124, n. 11, p.1599–1607, 2000.

WEISHAUPT, J. H.; BARTELS, C.; PÖLKING, E.; DIETRICH, J.; ROHDE, G.; POEGGELER, B.; MERTENS, N.; SPERLING, S.; BOHN, M.; HÜTHER, G.; SCHNEIDER, A.; BACH, A.; SIRÉN, A. L.; HARDELAND, R.; BÄHR, M.; NAVE, K. A.; EHRENREICH, H. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. **J Pineal Res.**, v. 41, n. 4, p. 313-323, 2006.

WU, X.; CHENG, B.; CAI, Z. D.; LOU, L. M. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. **Cancer Cell Int.**, v. 13, n. 56, p. 1-4, 2013.

CAPÍTULO III

Efeito da melatonina exógena sob o rim e baço de ratos cirróticos

Welma Emidio da Silva¹; Leucio Duarte Vieira Filho²; Valéria Wanderley Teixeira¹,
Carolline Guimarães D'assunção¹; Cintia Giselle Martins Ferreira¹; Álvaro Aguiar
Coelho Teixeira^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros Rs/n
Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br (TEIXEIRA, A. C.)

RESUMO

Distúrbios hepáticos geram consequências desastrosas para o organismo como um todo, como é o caso da cirrose. Entre as complicações causadas por essa hepatopatia, problemas renais e no baço são recorrentes, o que torna preocupante, pois esses órgãos são fundamentais para o corpo. Dados na literatura mostram que a melatonina, além de ter ação contra radicais livres, apresenta ação nos sistemas renal e imunitário. Assim, avaliou-se o efeito da melatonina exógena sobre parâmetros morfométricos, bioquímicos, hematológicos, estresse oxidativo tecidual e perfil imunohistoquímico nos rins e baços de ratos cirróticos. Para isso, utilizou-se 25 ratos albinos, com 60 dias de idade, divididos nos seguintes grupos: I - ratos sem indução à cirrose (controle); II – ratos induzidos à cirrose com tioacetamida; III- ratos induzidos à cirrose com tioacetamida e tratados com melatonina, simultaneamente; IV- ratos induzidos à cirrose com tioacetamida e depois tratados com melatonina por oito semanas; V - ratos induzidos à cirrose com tioacetamida e depois mantidos sem tratamento com melatonina por oito semanas. A cirrose foi induzida com três aplicações semanais de tioacetamida na dosagem de 200 mg/Kg.i.p., durante 8 semanas. A melatonina foi administrada na dosagem de 20mg/Kg i.p. Os resultados mostraram que a melatonina preveniu e melhorou os efeitos da cirrose hepática nos rins e baços de ratos, mantendo a estrutura e função dos glomérulos renais, bem como o perfil hematológico. Também aumentou GSH, reduziu a peroxidação lipídica e os níveis de citocinas próinflamatórias. Assim, conclui-se que a melatonina atua nos rins e baço protegendo e reduzindo os danos causados pela cirrose hepática nesses órgãos, o que torna esse hormônio uma excelente opção de estudo quanto aos danos causados no organismo por essa patologia.

Palavras-Chave: Melatonina, rins, baço, cirrose, ratos albinos.

ABSTRACT

Liver disorders have disastrous consequences for the organism as a whole, such as cirrhosis. Among the complications caused by this liver disease, kidney problems and spleen are recurrent, which makes it worrying, since these organs are fundamental for the body. Data in the literature show that melatonin, besides having action against free radicals, has action in the renal and immune systems. Thus, the effect of exogenous melatonin on morphometric, biochemical, hematological parameters, tissue oxidative stress and immunohistochemical profile in the kidneys and spleens of cirrhotic rats was evaluated. For this, 25 albino rats, 60 days old, were divided into the following groups: I - rats without induction of cirrhosis (control); II - rats induced cirrhosis with thioacetamide; III - rats induced cirrhosis with thioacetamide and treated with melatonin simultaneously; IV - rats induced cirrhosis with thioacetamide and then treated with melatonin for eight weeks; V - rats induced cirrhosis with thioacetamide and then maintained untreated with melatonin for eight weeks. Cirrhosis was induced with three weekly applications of thioacetamide at the dosage of 200 mg / kg body weight for 8 weeks. Melatonin was administered at the dosage of 20mg / kg i.p. The results showed that melatonin prevented and improved the effects of thioacetamide on the kidneys and spleens of rats, maintaining the structure and function of the renal glomeruli, as well as the hematological profile. It also increased GSH, reduced lipid peroxidation and proinflammatory cytokine levels. Thus, it is concluded that melatonin acts in the kidneys and spleen protecting and reducing the damage caused by liver cirrhosis in these organs, which makes this hormone an excellent option to study the damage caused in the organism by this pathology.

Key words: Melatonin, kidneys, spleen, cirrhosis, albino rats

1. INTRODUÇÃO

O fígado tem um papel fundamental na homeostasia do organismo atuando de diferentes formas na regulação deste (Cotran et al., 2000; Smeltzer; Bare, 2005). Portanto, os distúrbios hepáticos geram consequências desastrosas para o organismo como um todo (Vargas; Fraça, 2007). A cirrose hepática surge em decorrência de agressões crônicas do fígado, que pode ser de natureza inflamatória, tóxica, viral, metabólica ou congestiva (Heidelbaugh; Sherbondy, 2006; Tsukada; Parsons; Rippe, 2006), acarretando alterações na arquitetura tecidual e importantes alterações funcionais.

Com a progressão da doença, a deterioração das funções hepáticas se agrava, podendo chegar a um estágio irreversível, gerando danos ao organismo e colocando em risco a vida do indivíduo (Vargas; Fraça, 2007). Estudos clínicos demonstram diversas complicações relacionadas ao processo patológico da cirrose, tais como o comprometimento da função pulmonar, ascite, encefalopatia hepática, icterícia, perda de massa e da função muscular, alterações da pressão na veia porta e alterações cardíacas com consequente redução na qualidade de vida (Barcelos et al., 2008; Carvalho et al., 2008).

Entre as complicações causadas por essa hepatopatia, problemas renais (Garcia-Tsao; Parikh; Viola, 2009) e no baço (Bem et al., 2006; Coelho et al., 2010) são recorrentes, o que torna preocupante, pois esses órgãos são fundamentais para a manutenção das funções do corpo humano. O baço contém aproximadamente 30% do total de linfócitos de um indivíduo, funcionando como filtro pela ação dos macrófagos, que retiram de circulação as hemácias senescentes e partículas estranhas como as bactérias (Zago; Falcão; Ricardo, 2013). Por não existir exame específico para as funções do baço, é difícil estabelecer a relação entre drogas e disfunções esplênicas, entretanto, o

aumento deste órgão pode ser o primeiro ou o mais evidente sinal decorrente de hepatopatias (Petroianu, 2011).

Já o rim, além de filtrar o sangue do corpo, é muito importante para o metabolismo e eliminação de fármacos, assim como dos seus metabolitos (Seeley; Stephens; Tate, 2003). A imunodepressão dos cirróticos aumenta a chance de ocorrer doenças infecciosas (Wasmuth et al., 2005), que podem agravar a vasodilatação sistêmica e precipitar injúria renal aguda. Ainda, a eliminação de fármacos, decorrentes da desintoxicação pelos hepatócitos, pode acarretar em nefrotoxicidade (Dekant, 2001). Segundo Garcia-Tsao, Parikh e Viola (2009), a injúria renal aguda ocorre em aproximadamente 19% dos pacientes hospitalizados com insuficiência hepática, aumentando o risco de morte na cirrose.

Diante do exposto, podemos enfatizar que a cirrose hepática apresenta uma série de alterações clínicas sistêmicas, que vão além de alterações na estrutura e função do fígado (Iida et al., 2005). Entretanto, muitos estudos têm ignorado o complexo de alterações que acompanha essa doença, o que se torna preocupante, visto que a alta morbidade e mortalidade da cirrose são secundárias a complicações do quadro patológico da cirrose hepática (Coelho et al., 2010).

Sendo assim, estudos que busquem uma alternativa terapêutica que possa aumentar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes com cirrose, que podem ser melhoradas pela prevenção e pelo tratamento das complicações, torna-se de suma importância no prognóstico da doença. Neste sentido, dados da literatura mostram que a melatonina apresenta ação direta nos sistemas renal (Song et al., 1996; Soares Jr et al., 1999) e imunitário (Claustrat et al., 2005), sendo este hormônio, uma excelente opção de estudo para os efeitos da cirrose hepática em órgãos sequelados em decorrência do quadro patológico desta doença.

As interações entre a melatonina e o sistema imunológico têm sido bastante estudadas, e em praticamente todos os casos, a melatonina mostrou ter efeitos imunomoduladores da resposta imune (Esquifino et al., 2004; Faas et al., 2005). Araújo et al (2013), também comprovaram que a melatonina é importante para a modulação de elementos hematológicos e para o desenvolvimento normal do baço de ratos.

Os rins apresentam receptores de melatonina na membrana basolateral do epitélio tubular proximal (Song et al., 1996) e de acordo com Sener et al (2003), a melatonina preveniu danos oxidativo nos rins de ratos submetidos a lesões térmicas. Além disso, deve ser mencionado que a melatonina induz ao aumento da filtração glomerular de sódio e água no filtrado urinário e estimula o transporte tubular de sódio (Pishak VP, Kokoshchuk, 1995). Entretanto, ao estudar a influência da glândula pineal sobre a ingestão de água e NaCl em ratas normais e ooforectomizadas, Soares Jr et al (1999) afirmam que futuros experimentos poderão desvendar incógnitas sobre a atuação exata da melatonina sobre o rim.

Assim, apesar de se ter relatos da ação da melatonina no baço e rins, não são conhecidos o papel desempenhando por esse hormônio nas lesões nesses órgãos decorrente da cirrose hepática. Desse modo, essa pesquisa tem como objetivo, avaliar a ação da melatonina exógena nos rins e baço de ratos cirróticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e grupos experimentais

Grupo I - ratos sem indução à cirrose (controle);

Grupo II – ratos induzidos à cirrose experimental com a tioacetamida por 8 semanas;

Grupo III- ratos induzidos à cirrose experimental com a tioacetamida por 8 semanas e tratados com melatonina, simultaneamente, por 8 semanas;

Grupo IV- ratos induzidos à cirrose experimental com a tioacetamida por 8 semanas e depois tratados com melatonina por mais 8 semanas;

Grupo V - ratos induzidos à cirrose experimental com a tioacetamida por 8 semanas e depois mantidos sem tratamento melatonina por 8 semanas.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 23082.013261/2014.

2.2. Indução da cirrose

A tioacetamida foi diluída em água destilada e administrada intraperitonealmente na dosagem de 200 mg/1000g de peso corporal, três vezes por semana, durante 8 semanas (Alshawsh et al., 2011). As doses da droga foram ajustadas de acordo com o peso individual de cada animal, como preconiza Li; Benjamin; Alexander (2002) e Guerra et al. (2009).

2.3. Tratamento com melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima, Baracat e Simões (2004). Foi administrada 20mg/1000g de peso corporal do animal por meio de injeções intraperitoneais no início da noite (18:00h), durante 8 semanas. A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02mL) e diluída em solução salina 0,9% (NaCl a 0,9%). Os animais do grupo placebo receberam, respectivamente, solução NaCl 0,9% e 0,02mL de etanol.

2.4. Análise morfológica

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após os períodos experimentais de cada grupo. Para tanto, os animais foram anestesiados com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular. Em seguida, procedeu-se à remoção dos rins e baço, os quais foram imersos em formol tamponado à 10%, permanecendo no mesmo por 24 horas. Após esse procedimento, os rins e baços foram clivados e submetidos à técnica histológica de inclusão em parafina. A seguir, os blocos foram cortados, corados com Hematoxilina e Eosina (H.E).

2.5. Análise morfométrica

Para a análise morfométrica dos rins, foram utilizadas três lâminas de cada grupo e analisados dez glomérulos em cada lâmina. As medidas foram restritas aos glomérulos que demonstraram, num único corte, os pólos vascular e urinário. Essa disposição indica a secção coincidente com a região equatorial do glomérulo. Para as mensurações foram utilizados os glomérulos selecionados ao acaso. A captura da imagem foi efetuada através de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao programa Optimas® 6.2 para Windows. Para a obtenção da área glomerular posicionará o cursor na área central do glomérulo, estabelecendo-se, a partir daí, uma linha circular externa, coincidente com os limites do tufo glomerular. Para mensuração da cápsula de Bowman foi adotado a mesma metodologia (Akaoka; White; Raafat, 1994). O volume glomerular e da cápsula de Bowman, foi calculado de acordo com os critérios preconizados por Pagtalunan; Drachman; Meyer (2000). Para essa estimativa, utilizar-se-

a a equação $4/3\pi r^3$, destinada ao cálculo do volume da esfera, na qual “r” representa o raio.

A quantificação dos glomérulos foi realizada utilizando-se uma ocular de 10X contendo internamente um retículo de WAIBEL com 25 pontos (Weibel; Kistler; Scherle, 1966) onde foram contados seis campos, todos aleatórios e em sentido horário, levando-se em consideração apenas os pontos que incidiram sobre os glomérulos. Este procedimento foi realizado utilizando a objetiva de 10X obtendo um aumento final de 100X. No total foram contados 150 pontos por animal totalizando 750 pontos por grupo.

2.6.Hemograma

Foi coletado 1 mL de sangue, antes e após os períodos experimentais de cada grupo, por meio de contenção mecânica (Fluttert et al., 2000) através da punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G). As amostras foram armazenadas em microtubos com EDTA e cuidadosamente homogeneizadas por inversão de 5 a 8 vezes para evitar hemólise e coagulação do sangue. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas para laboratório de análises clínicas veterinárias para a realização do hemograma.

2.7.Bioquímica

Foram avaliados os níveis plasmáticos de uréia e creatinina. Para isso, após 12h de jejum, foi coletado 1 mL de sangue dos animais, antes e após os períodos experimentais de cada grupo. As amostras foram armazenadas em tubos específicos para bioquímica e submetidas a centrifugação, a uma temperatura de 4°C com velocidade de 3000 rpm por 10 min. Em seguida, o soro foi transferido para ependofs e acondicionado em temperatura

de -80°C até o momento das dosagens. Para isso, utilizou-se kits da labtest®, específicos para cada dosagem; a análise realizada em triplicata e; determinadas com o auxílio do analisador bioquímico Vet test 8008 (*Blood chemistry analyzer*).

2.8. Marcadores de estresse oxidativo tecidual

O estresse oxidativo tecidual foi avaliado através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) e níveis de glutathiona reduzida (GSH). Para isso, os rins e baço dos animais foram coletados após o período experimental de cada grupo e, fragmentos destes órgãos foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C.

Parte do tecido renal e esplênico foram homogeneizados em solução contendo KCl 1,15% e EDTA 3mM (5 mL por grama de tecido) e mantidos em banho de gelo. Em seguida, parte dos homogenatos foram adicionados a um meio de reação contendo SDS 0,4%, ácido acético 7,5%, e ácido tiobarbitúrico 0,3% (pH 3,5). Os tubos de reação foram selados e incubados à 95 °C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de *n*-butanol para cada volume de reação, e os tubos foram centrifugados a 1000 ×g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada à 535 nm. As concentrações foram obtidas por comparação às curvas padrão de malonildialdeído. Os resultados foram corrigidos pelas concentrações de proteínas dos homogenatos.

Os níveis de GSH foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrila não-protéicos (Sedlak; Lindsay, 1968). Para essa determinação, outra porção dos homogenatos obtidos foram submetidos à precipitação proteica através da adição de

solução de TCA 5% (até concentração final de 20 mg de tecido/mL) seguida de centrifugação ($800 \times g$ por 10 minutos). Em seguida, os volumes de sobrenadantes foram adicionados a nove volumes de meio de reação contendo TRIS 200 mM, EDTA 2 mM e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) 4 mM em metanol. As reações foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, e as absorbâncias mensuradas à 412 nm. As concentrações foram obtidas por comparação às curvas padrão de cisteína. Os resultados foram corrigidos pelas concentrações de proteínas dos homogenatos.

2.9. Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)

Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e álcoois, respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue) (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001).

2.10. *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada em um programa computacional InStat[®], onde dados foram avaliados por meio de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. *Análise morfológica*

Nos rins a análise morfológica revelou aumento significativo no diâmetro e volume glomerular dos animais induzidos a cirrose e que não receberam tratamento com melatonina (Tabela 1).

3.2. *Hemograma*

Os dados referentes ao hematócrito (Ht) e à contagem total de hemácias (CTH) dos animais cirróticos sem tratamento com melatonina mostraram redução significativa desses parâmetros em relação aos animais dos demais grupos. No entanto, CLT e neutrófilos dos animais cirróticos e sem tratamento com melatonina mostraram aumento significativo desses parâmetros em relação aos animais dos demais grupos (Tabela 2).

3.3. *Bioquímica*

As análises bioquímicas revelaram que não houve alterações significativas nos níveis de uréia e creatinina nos animais tratados com melatonina em relação ao grupo controle. Entretanto, houve aumento significativo nos animais induzidos à cirrose e sem tratamento com melatonina, em relação aos demais grupos experimentais (Figuras 1 e 2).

3.4. Marcadores de estresse oxidativo tecidual

A análise dos níveis de GSH foram significativamente reduzidos nos rins e baços dos animais cirróticos e sem tratamento com melatonina quando comparado aos demais grupos experimentais (Figuras 3 e 4). Entretanto, as concentrações de TBARS foram significativamente aumentadas nos rins e baços dos animais cirróticos e sem tratamento com melatonina, quando comparados aos demais grupos experimentais (Figuras 5 e 6).

3.5. Imunohistoquímica (IL6 e TNF- α)

A análise imunohistoquímica da expressão do IL6 e do TNF- α nos rins e baço dos animais dos grupos experimentais, mostrou que os animais tratados com melatonina apresentaram índices semelhantes aos observados no controle. Já os dos animais induzidos à cirrose e sem tratamento com melatonina, mostraram maior expressão desses fatores (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Tabela 1: Morfometria dos rins dos animais dos grupos experimentais.

	GRUPOS					P
	G I	G II	G III	G IV	G V	
DG (μm)	155,19 \pm 9,14b	183,87 \pm 6,09a	149,51 \pm 16,23b	152,30 \pm 10,15b	179,54 \pm 5,12a	0,0014
VG (μm^3)	1150922,34 \pm 160176b	1614439,88 \pm 101918a	1203869,06 \pm 115733b	1040441,72 \pm 108744b	1729312,33 \pm 91581a	0,0125
DCB (μm)	185,21 \pm 11,44a	188,55 \pm 12,02a	180,68 \pm 12,61a	187,01 \pm 13,85a	185,98 \pm 16,49a	0,6081
VCB (μm^3)	1763156,24 \pm 200752a	1562831,11 \pm 339069a	1675544,31 \pm 272349a	1557558,75 \pm 296225a	1652518,05 \pm 277625a	0,3900

Média \pm desvio padrão do diâmetro glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos animais dos grupos experimentais. GI - controle; GII – induzidos à cirrose por 8 semanas; GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	IV	V	P
Ht (%)	54,25 ± 2,44a	39,75 ± 3,53b	51,00 ± 2,90a	53,25 ± 2,32a	41,50 ± 1,12b	0,0023
CTH (10⁶/µL)	6,23 ± 1,29a	3,66 ± 1,62b	5,91 ± 1,29a	5,88 ± 1,11a	4,92 ± 1,05b	0,0130
CTL (10³/µL)	4,13 ± 0,77b	7,44 ± 1,39a	4,50 ± 0,53b	4,64 ± 0,35b	7,14 ± 0,21a	0,0121
Neutrófilos (%)	12,50 ± 1,61b	16,20 ± 1,17a	11,65 ± 1,80b	13,46 ± 0,84b	15,77 ± 1,04a	0,0218
Linfócitos (%)	37,17 ± 2,78a	35,69 ± 3,23a	36,52 ± 3,08a	38,20 ± 4,33a	36,72 ± 2,71a	0,0675
Eosinófilos (%)	1,15 ± 0,11a	1,49 ± 0,36a	1,22 ± 0,18a	1,26 ± 0,41a	1,52 ± 0,51a	0,1243
Monócitos (%)	5,44 ± 0,63a	4,90 ± 0,99a	5,58 ± 0,58a	5,49 ± 0,75a	5,13 ± 0,87a	0,1432
Basófilos (%)	0,10 ± 0,09a	0,09 ± 0,17a	0,14 ± 0,11a	0,20 ± 0,15a	0,12 ± 0,10a	0,0701

Média ± desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais dos grupos experimentais. GI – controle; GII – induzidos à cirrose por 8 semanas; GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e; GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Ht- Hematócrito, CTH- Contagem total de hemácias, CTL- Contagem total de leucócitos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

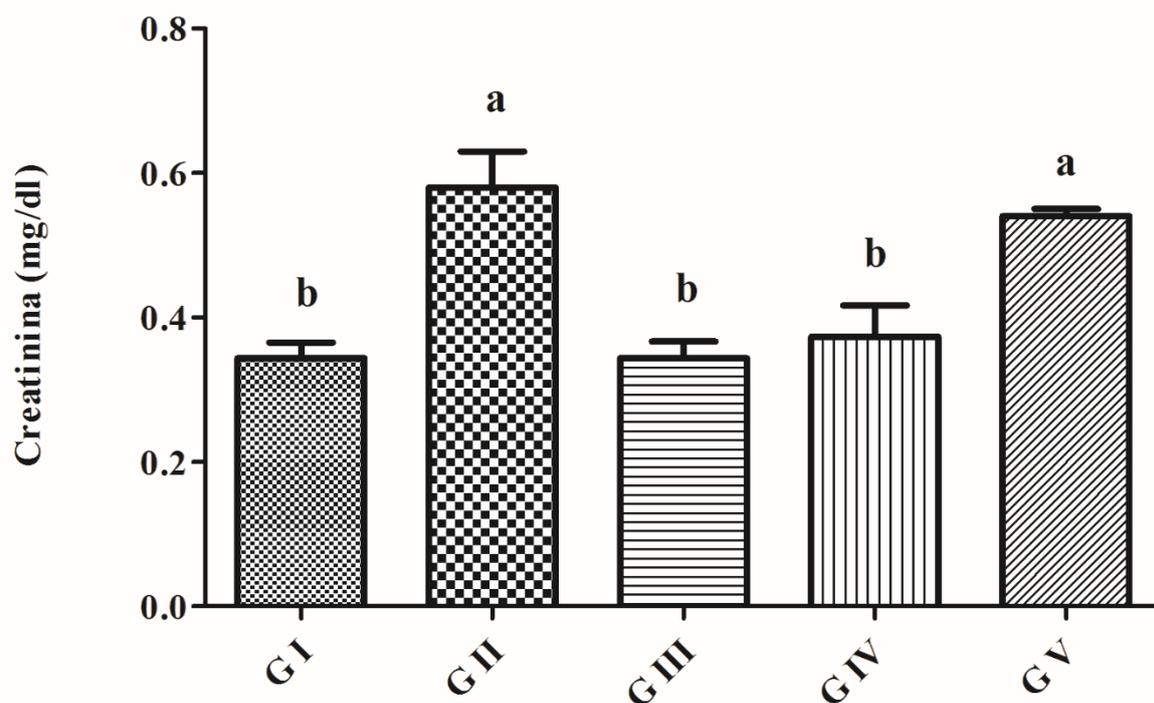


Figura 1: Níveis de ceatinina (mg/dl) no plasma dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

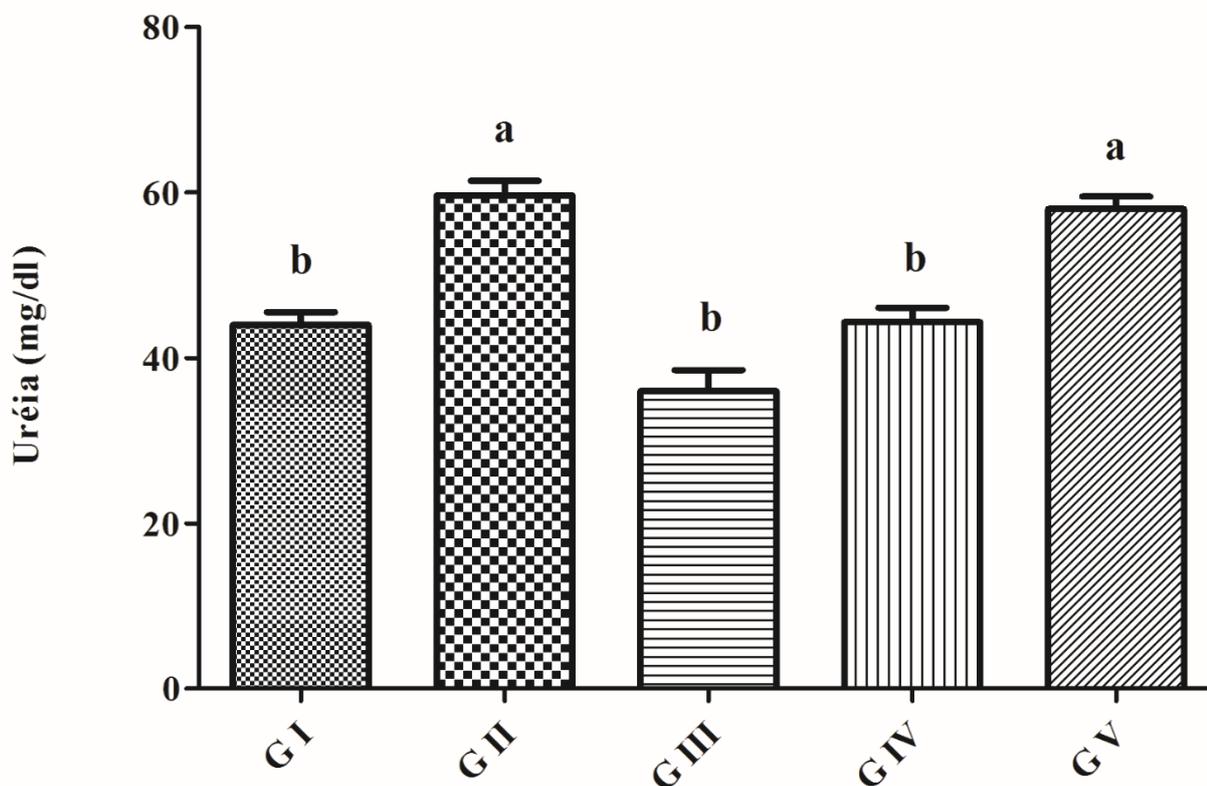


Figura 2: Níveis de uréia (mg/dl) no plasma dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

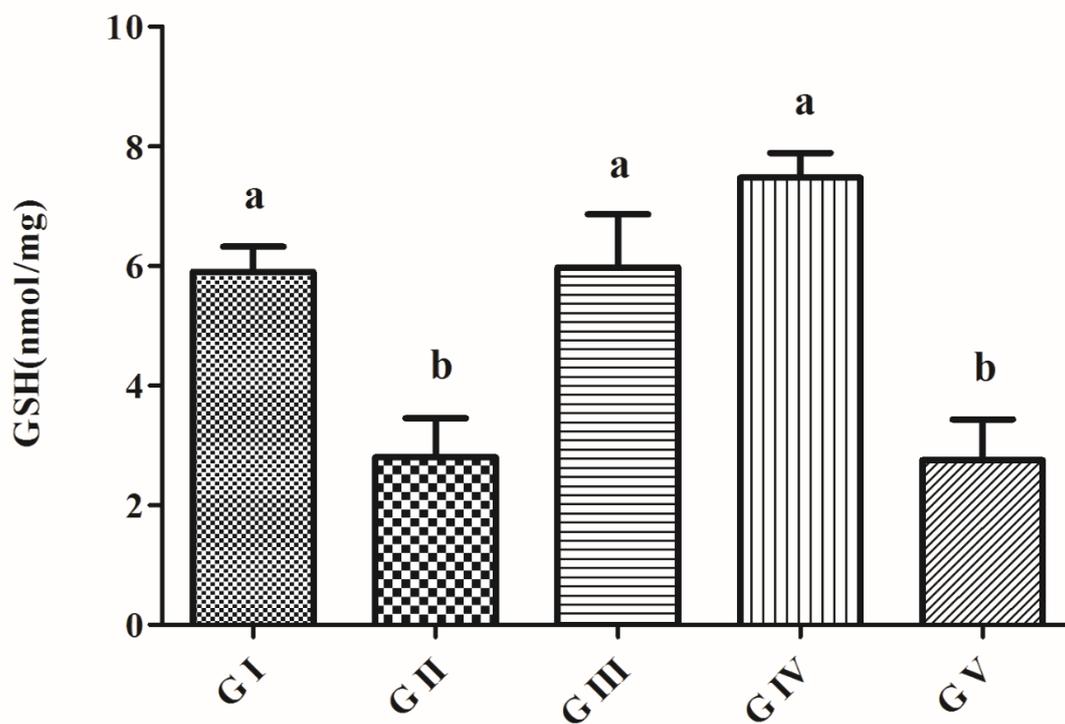


Figura 3: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

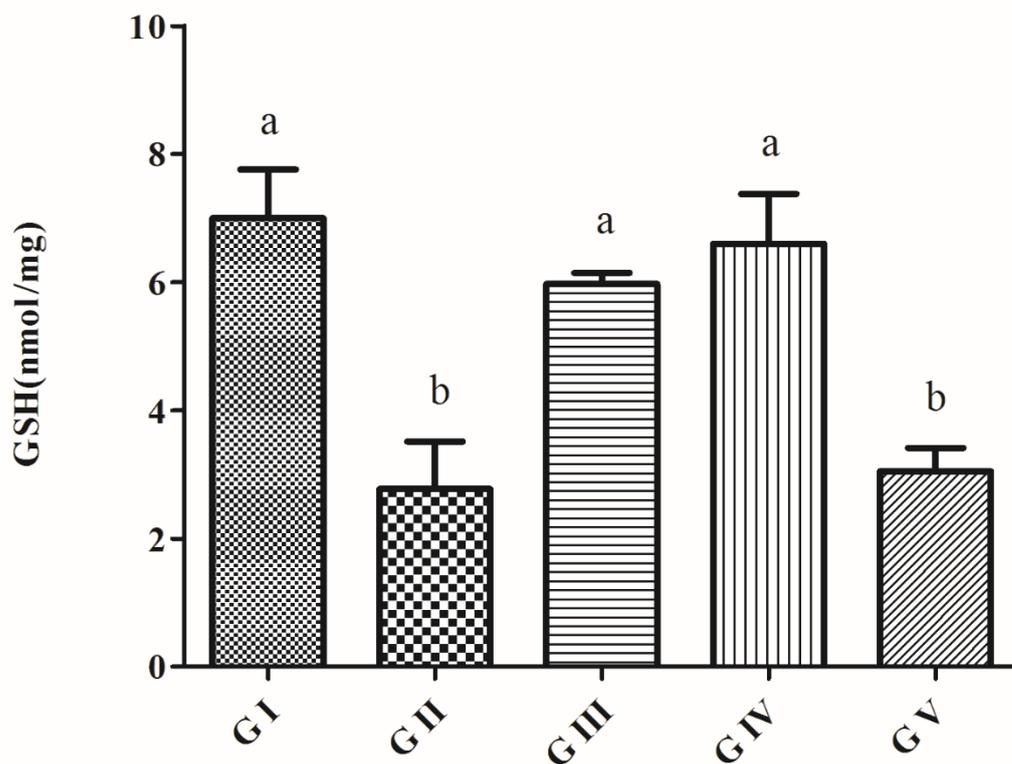


Figura 4: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos baços dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

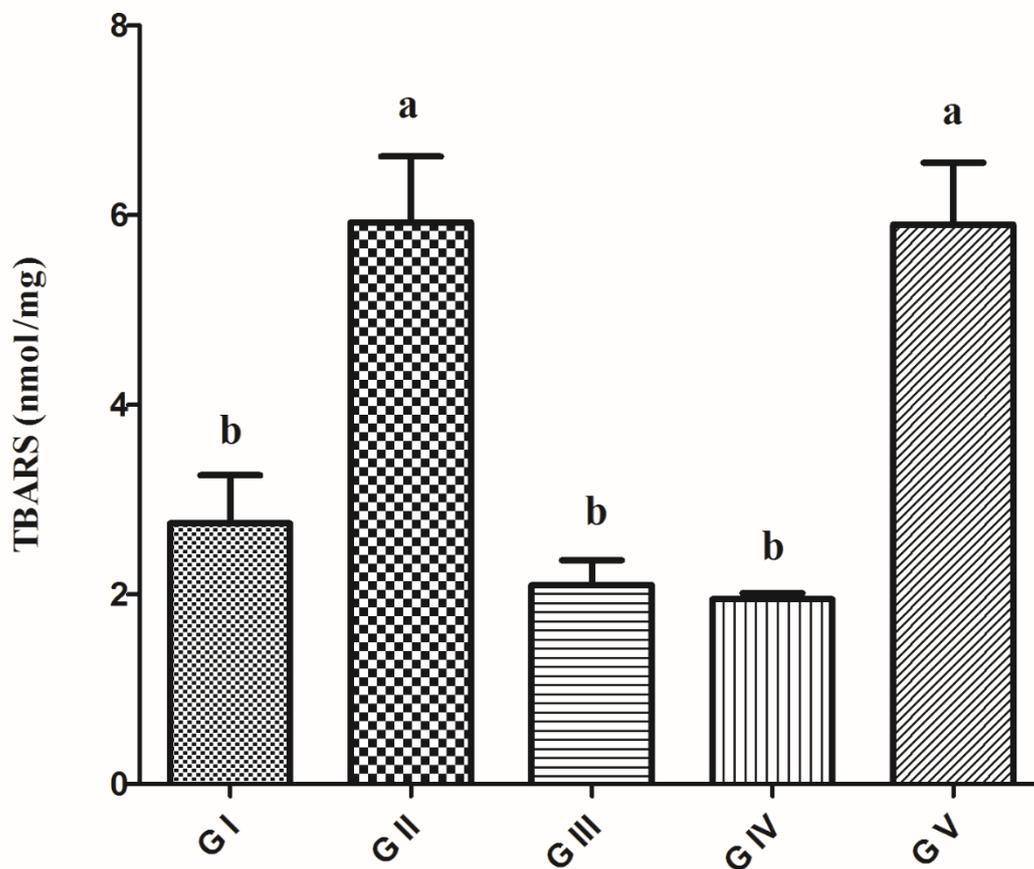


Figura 5: Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

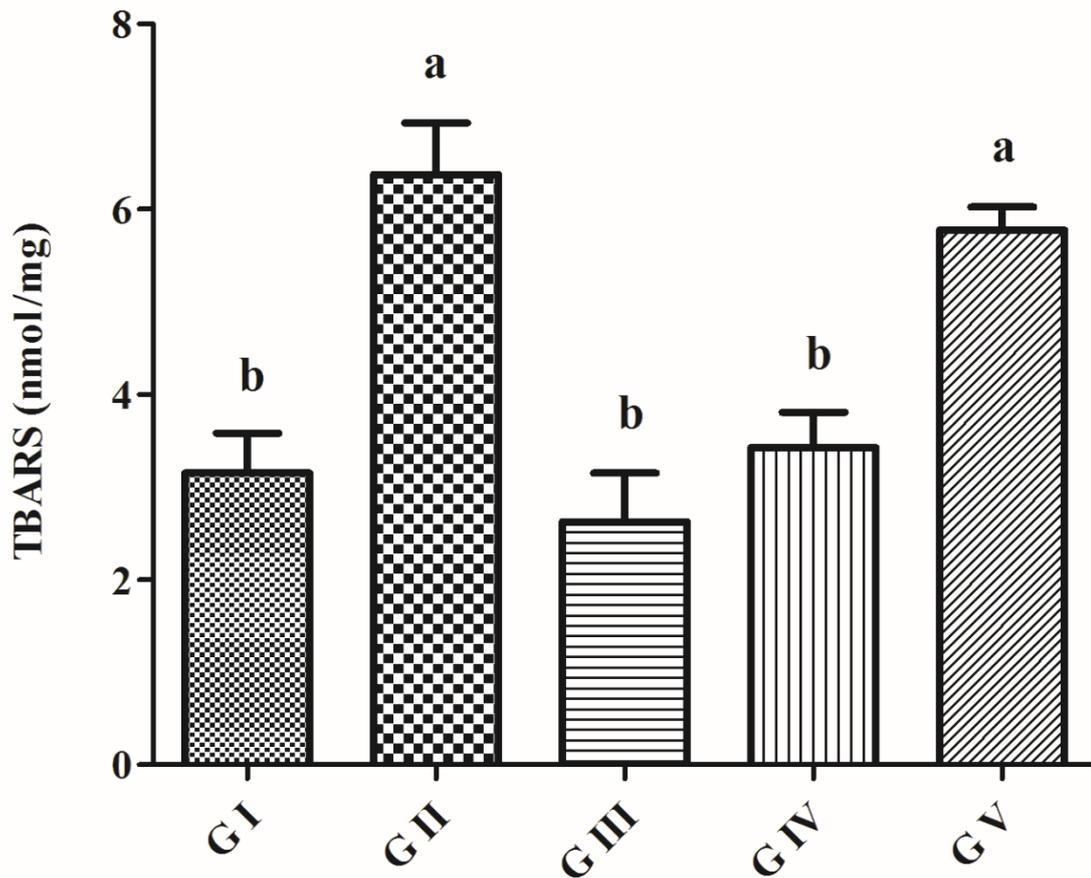


Figura 6: Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) nos baços dos animais dos grupos experimentais. GI - controle, GII – induzidos à cirrose por 8 semanas, GIII - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, GIV - induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas e GV - induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

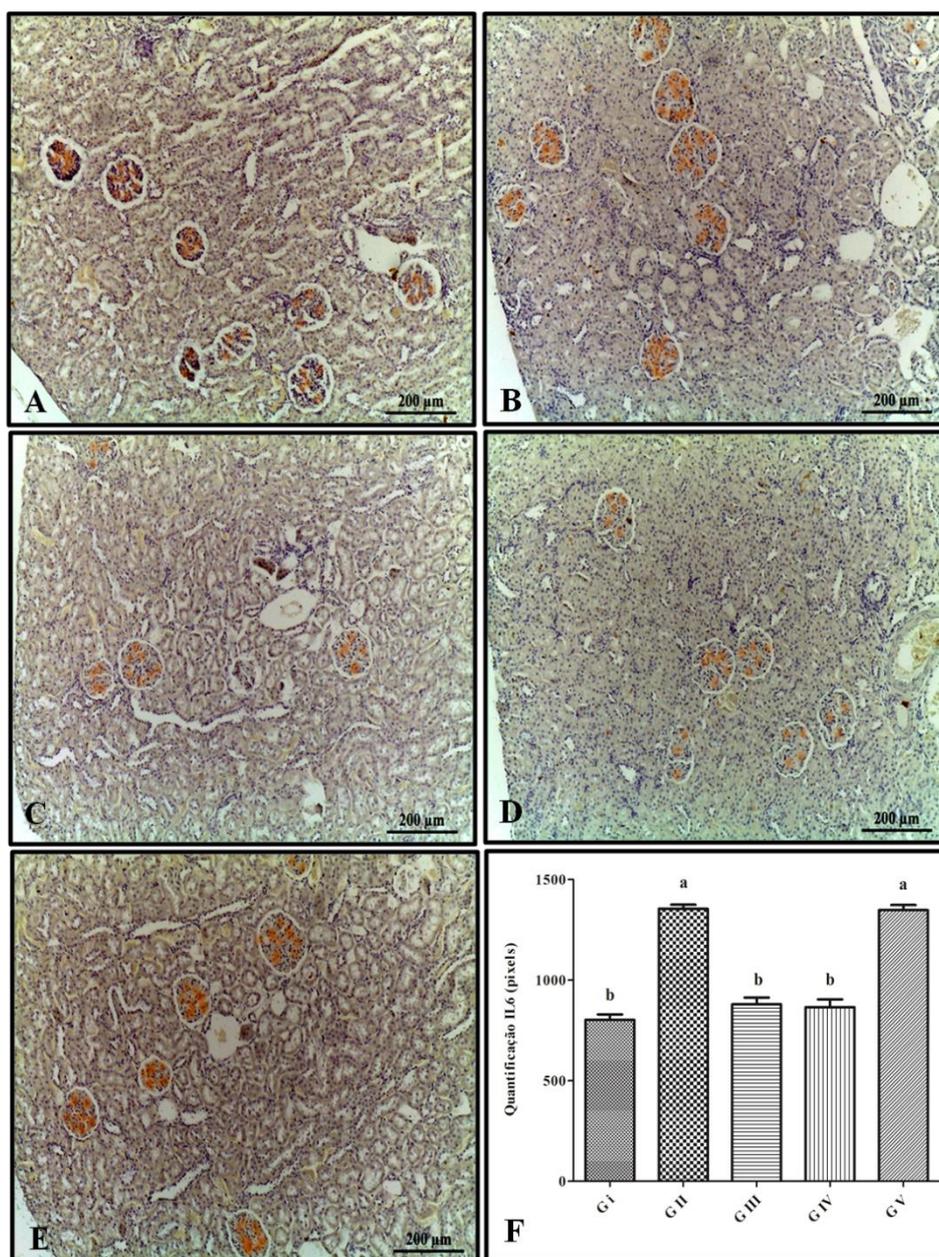


Figura 7: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 nos rins dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle, B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas, C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas, D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas, E e GV- induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas, F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL-6. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

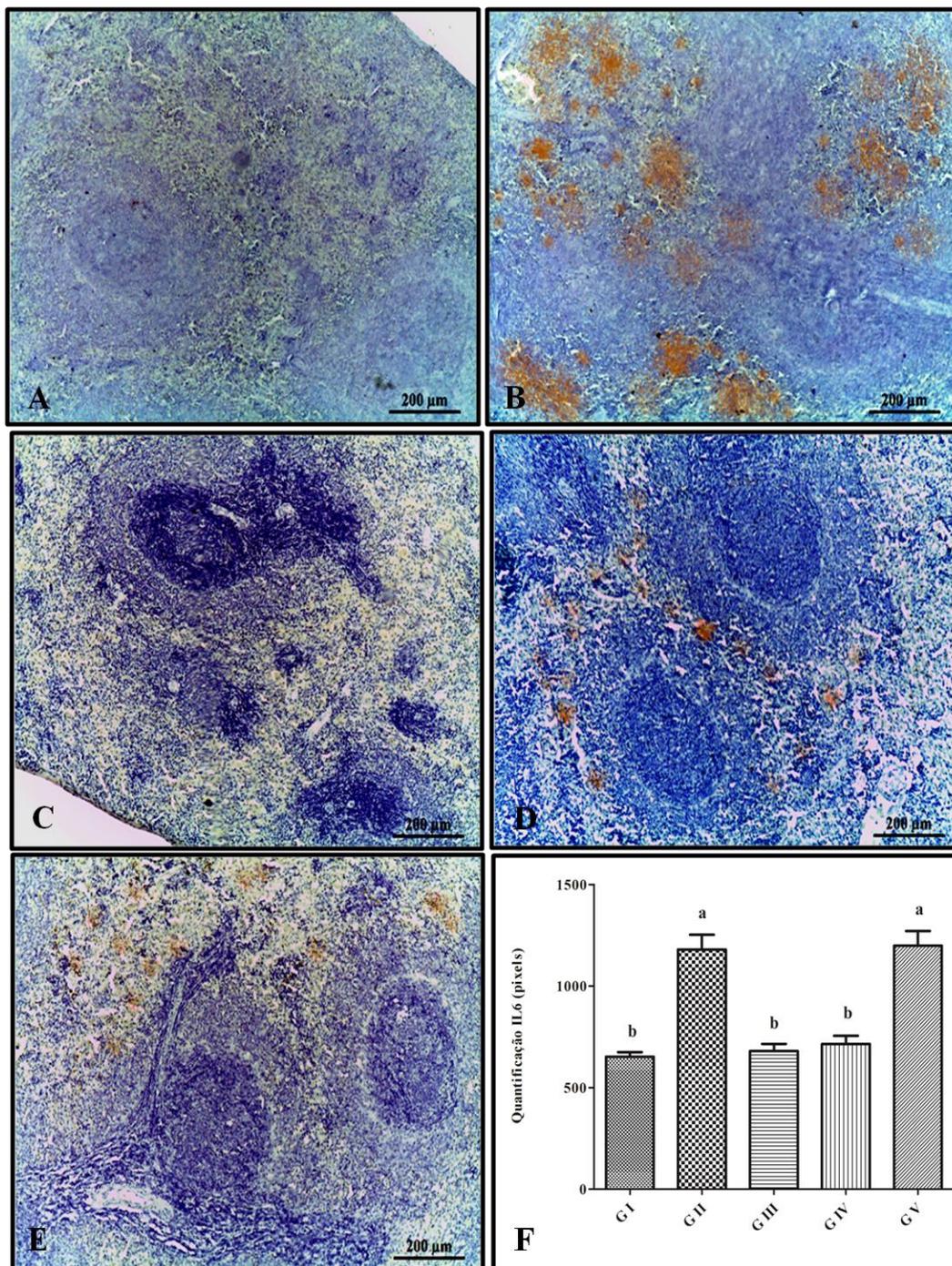


Figura 8: Imunohistoquímica e quantificação do IL-6 no baço dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV- induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator IL-6. Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

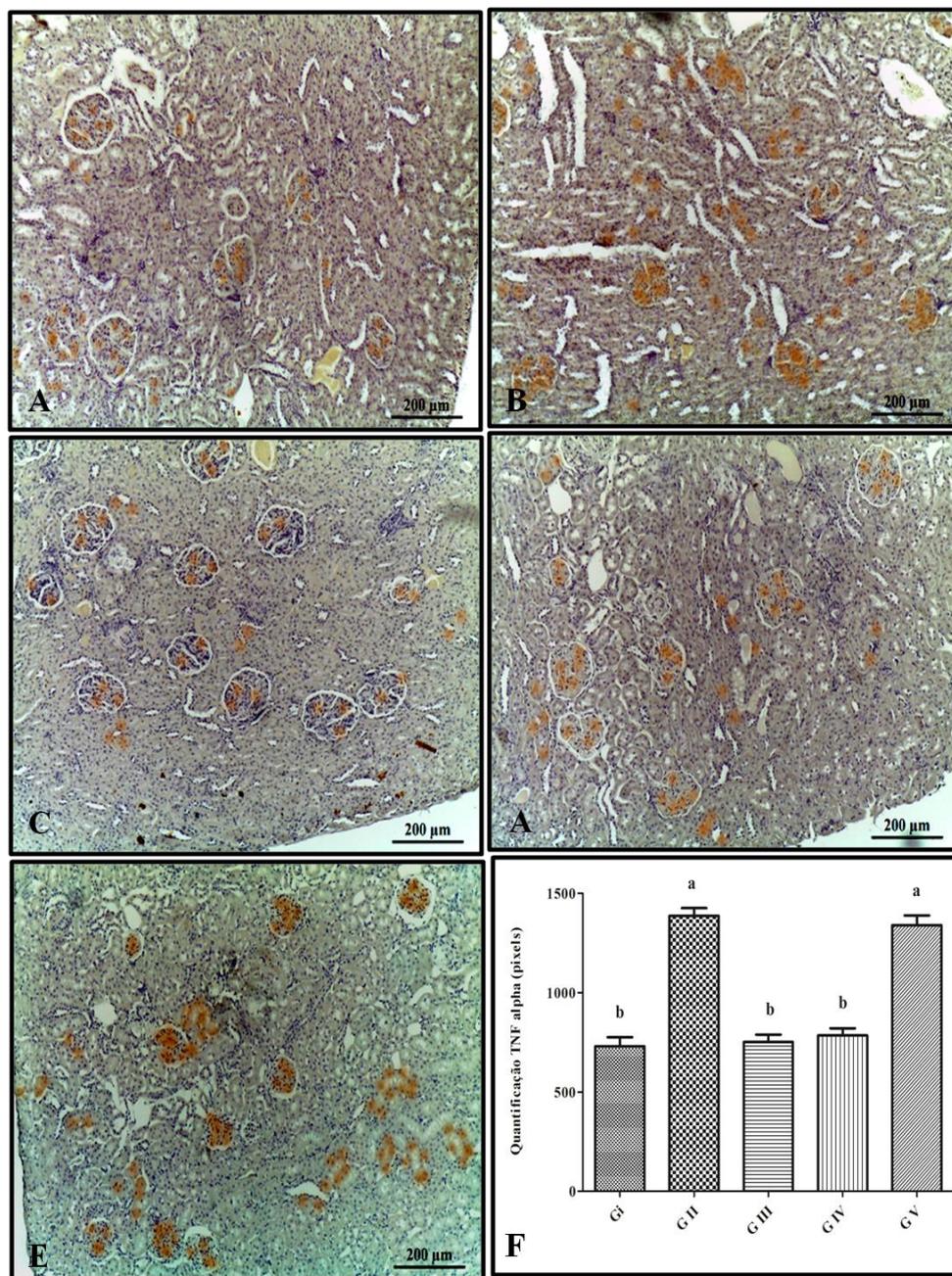


Figura 9: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α nos rins dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV- induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF- α . Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

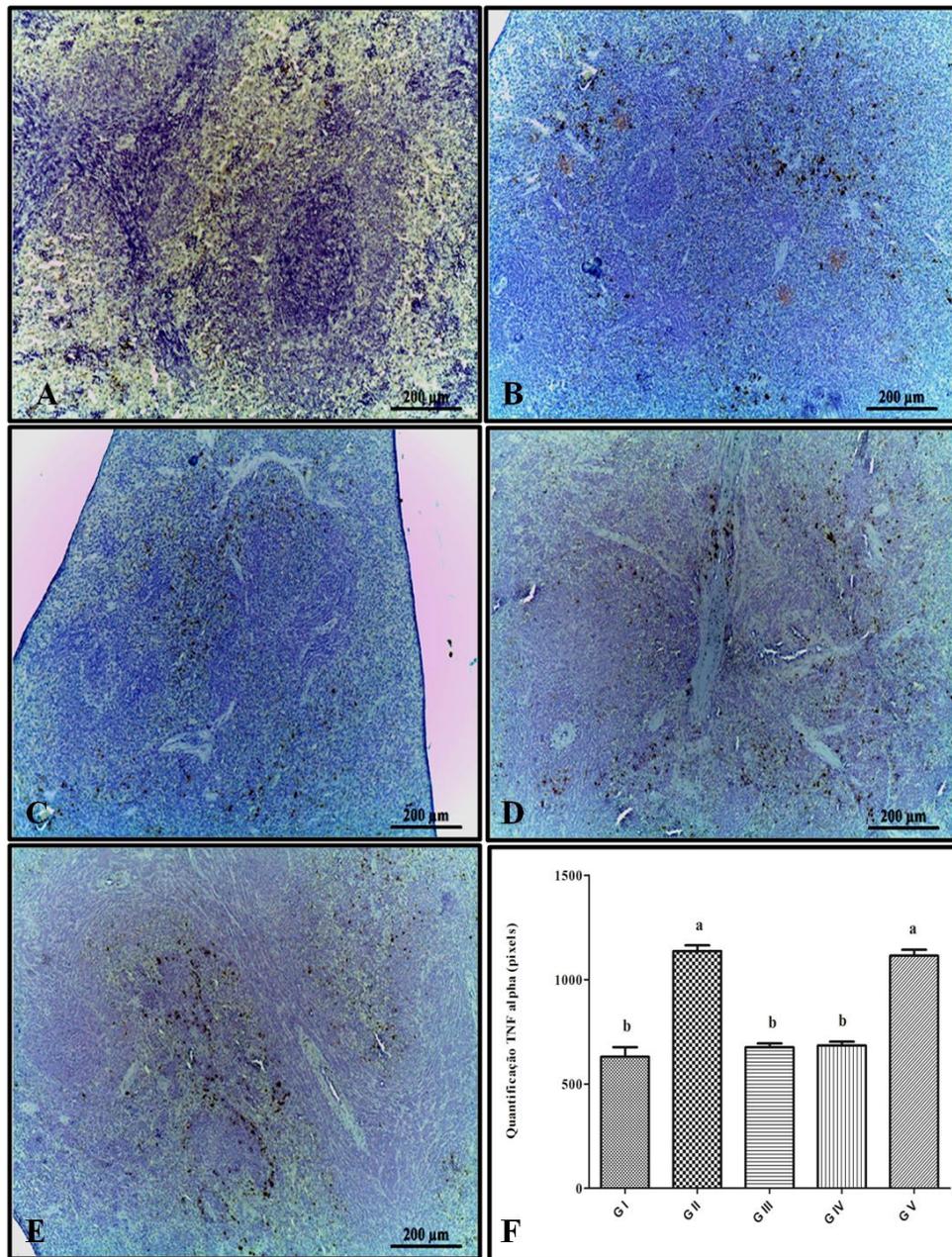


Figura 10: Imunohistoquímica e quantificação do TNF- α no baço dos animais dos grupos experimentais. A e GI – controle; B e GII- induzidos à cirrose por 8 semanas; C e GIII – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina, simultaneamente por 8 semanas; D e GIV – induzidos à cirrose + tratamento com melatonina por 8 semanas; E e GV- induzidos à cirrose + sem tratamento com melatonina por 8 semanas e; F – Quantificação em pixels da expressão do fator TNF- α . Notar aumento significativa dos pixels nos grupos GII e GV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A Cirrose Hepática, doença crônico-degenerativa, figura entre as principais doenças gastrintestinais constituindo um sério problema de saúde pública. Estudos indicam que os distúrbios hepáticos, desenvolvidos com a progressão da doença, geram conseqüências desastrosas para o organismo como um todo (Vargas; França, 2007), afetando outros órgãos, também essenciais para o funcionamento saudável do corpo, como é o caso dos rins e baço.

Com os resultados deste estudo foi visto que houve um aumento significativas no diâmetro e volume glomerular dos animais induzidos a cirrose e que não receberam melatonina. Segundo Chilapakati et al (2004), a tioacetamida é um carcinógeno fraco que afeta principalmente o fígado. Entretanto, em doses excessivamente altas, os rins também são afetados (Chilapakati et al, 2005; Hasegawa et al., 2007; Rekha et al., 2008). Ainda devemos ressaltar que eliminação de fármacos, decorrentes da desintoxicação pelos hepatócitos, ocorrem por via biliar ou por via renal, após passagem pela circulação sanguínea no último caso. Este processo é muito importante para o metabolismo e eliminação de fármacos, assim como dos seus metabolitos (Seeley; Stephens; Tate, 2003), no entanto pode acarretar em nefrotoxicidade (Dekant, 2001).

Alguns pesquisadores relatam também que na cirrose hepática avançada, há uma forte vasoconstrição renal, resultando em uma intensa redução no ritmo de filtração glomerular, enquanto que na circulação extrarrenal há predomínio de vasodilatação, levando a hipotensão sistêmica (Waidei, 2006; Garcia-Tsao; Parikh; Viola, 2008). Esse fato pode explicar o aumento do diâmetro e volume glomerular, pois com a constrição dos vasos renais, o glomérulo pode sofrer aumento em suas dimensões a fim de compensar a redução da filtração nos glomérulos.

Devemos ressaltar também que dados da literatura mostram que a glândula pineal, principal produtora de melatonina (MEL), exerce ação direta no sistema renal (Soares-Júnior et al., 1999). Pishak e Kokoshchuk (1995) verificaram que esse hormônio induz o aumento da filtração glomerular de sódio e água no filtrado urinário e estimula o transporte tubular de sódio. No trabalho de Deniz et al (2006), onde foi empregado modelo experimental de isquemia/reperfusão (I/R) renal (síndrome complexa que envolve vários mecanismos como a vasoconstrição renal, necrose tubular, bloqueio do ritmo de filtração e lesão glomerulares levando o animal a desenvolver doença renal aguda), viram que a MEL foi capaz de atenuar as lesões renais após I/R. Esses dados encontrados na literatura nos permitem sugerir que a MEL agiu nos rins dos animais evitando/melhorando os danos causados pela cirrose, o que explica as dimensões dos glomérulos renais dos animais que receberam esse hormônio não diferirem dos animais do grupo controle.

Esses relatos encontrados na literatura explicam os resultados desta pesquisa quanto aos níveis séricos de creatinina e uréia. Foi observado um aumento significativo desses biomarcadores nos animais cirróticos não tratados com MEL. Al-habori et al (2002) afirmam que a creatinina é o principal indicador da função renal e a elevação de seus níveis no sangue é observada principalmente em lesões funcionais dos néfrons. Wadei et al (2006) ainda ressaltam que uma das características da deterioração da função renal é o aumento progressivo da creatinina sérica. Em relação aos níveis da uréia, estudos indicam que a insuficiência renal, comum em pacientes com cirrose hepática, é marcada pelo aumento dos níveis de uréia (Meyer et al., 2003) e alterações hemodinâmicas (Ginés et al, 2003; Garcia-Tsao; Parikh; Viola, 2008), corroborando assim com os resultados dessa pesquisa.

Quando avaliado os hemogramas dos animais dos grupos experimentais, observou-se que os induzidos a cirrose hepática e sem tratamento com MEL, tiveram uma redução significativa do hematócrito e contagem total de hemácias, quando comparados com os demais grupos. Para Rosenfelde (2012), a contagem das células do sangue tem sido uma informação importante, não somente para o diagnóstico de doenças, mas também como um “atestado de saúde” nos exames periódicos e no check-up.

Neste contexto, alterações em células do sangue em casos de cirrose hepática têm sido relatadas (Silva et al, 2007; Diaz-Gil, 2009). Silva et al (2007) ao avaliar os hemogramas de cães cirróticos, observaram anemia em 84,6% e leucocitose em 61,5%, dos casos. Ainda se sabe que a MEL atua na modulação do sistema imune (Claustrat et al., 2005; Faas et al., 2005) e elementos sanguíneos (Ozmerdivenli et al., 2011; Araújo et al, 2013). O estudo realizado por Araújo et al (2013) mostrou a redução do percentual do hematócrito em fêmeas pinealectomizadas, sugerindo que esse resultado está associado à ausência da melatonina. Estes mesmos autores perceberam também um aumento do percentual de neutrófilos, o que pode explicar o fato de os animais tratados com melatonina apresentarem porcentagem desses parâmetros semelhantes aos animais controles e os animais cirróticos terem esses parâmetros aumentados.

Além disso, a melatonina exógena tem ação no baço de mamíferos (Pertsov, 2006; Wronka et al., 2008), órgão onde ocorre as respostas imunológicas a antígenos veiculados pela circulação e bioeliminação das células vermelhas senescentes (De Franceschi et al., 2005; Ertekin; Selimoglu; Pirim, 2005). A presença das células hematopoiéticas nesse órgão, também revela sua capacidade de gerar os glóbulos vermelhos (Slayton et al., 2002; Pacheco et al., 2003). Além disso, alterações no baço são relatadas tanto em pacientes cirróticos (Bem et al, 2006; Coelho et al., 2010) quanto na cirrose experimental (Soylu et al., 2006). Sendo assim, o fato de Ht, CTH, CTL e Neutrófilos não terem

diferido nos animais tratados com MEL, é justificado pela ação desse hormônio como modulador do sistema imune e no tecido esplênico. Esses resultados também são justificados pela ação antioxidante desempenhada pela MEL, pois Rosa et al (2010) relataram que esse hormônio protegeu os eritrócitos de ratos do estresse oxidativo.

Quanto aos marcadores de estresse oxidativo no tecido renal e esplênico, os resultados podem ser explicados pelo potencial antioxidante da melatonina. Pois esse hormônio é citado na literatura por ser um potente antioxidante, tendo sua atividade contra espécies reativas, evidenciada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Sofic et al., 2005). Deve-se ressaltar ainda que ela age tanto como antioxidante direto, neutralizando a maior parte dos radicais livres tóxicos (Reiter et al, 2003), como indireto, estimulando a atividade de várias enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase, glutatinoxidase, glutatinoxidase redutase e catalase apresentando, portanto, uma importante ação antioxidante, reduzindo danos oxidativos teciduais (Reiter et al, 2003; Tomás-Zapico; Coto-Montes, 2005).

A ação antioxidante da MEL parece ser ainda mais relevante devido a sua capacidade de atravessar todas as barreiras morfofisiológicas e de distribuir-se amplamente nos tecidos, células e compartimentos subcelulares (Tomás-Zapico; Coto-Montes, 2005). Isso, justifica o fato dos níveis de GSH terem se mostrado significativamente reduzidos e os níveis de peroxidação lipídica significativamente aumentado nos animais cirróticos sem tratamento com melatonina, em comparação aos demais grupos experimentais.

A expressão das marcações para interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), mostraram aumento significativo nos animais cirróticos, quando comparados com os animais dos outros grupos. A IL-6 e o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias, necessárias para conduzir a resposta inflamatória. No entanto, após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte (Lin;

Calvano; Lowry, 2000; Sommer; White, 2010), o que pode explicar a expressão dessas citocinas estarem mais elevadas nos rins e baço dos animais induzidos a cirrose, em comparação com os demais grupos experimentais.

Além disso, estudos que avaliam as interações entre a MEL e o sistema imunológico se mostraram satisfatórios (Esquifino et al., 2004; Faas et al., 2005). Estudos realizados por El-Sokkary et al (2003), mostrou que ratos portadores de tumor e que receberam melatonina, apresentam aumento na atividade proliferativa de linfócitos esplênicos e na produção de citocinas por macrófagos, reforçando assim a teoria da ação da MEL no sistema immune. A MEL também é citada por apresentar capacidade inibidora de citocinas e enzimas pró-inflamatórias (Dominguez-Rodriguez et al., 2007; Kim et al., 2009), explicando assim, a expressão da IL-6 e de TNF- α não diferirem significativamente do grupo controle.

Assim, conclui-se que a melatonina atua nos rins e baços de ratos, protegendo e revertendo a ação da tioacetamida e da insuficiência renal nesses órgãos, constituindo assim uma excelente opção para estudos que visem alternativas terapêuticas em pacientes com cirrose.

REFERÊNCIAS

AKAOKA, K.; WHITE, R.H.; RAAFAT, F. Human glomerular growth during childhood: a morphometric study. **J. Pathol.**, v. 173, p. 261-268, 1994.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.

ALSHAWSH, M. A.; ABDULLA, M. A.; ISMAIL, S.; AMIN, Z. A. Hepatoprotective Effects of Orthosiphon stamineus Extract on Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

ARAÚJO, A.C.C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; VILAÇA-JUNIOR, P.E.A.; SOARES, A.F.; LEMOS, A.J.J.M.; SILVA, F.C.A.; TEIXEIRA, A.A.C. Ação da melatonina sobre a dinâmica sanguínea de ratas prenhes e sobre a histogênese do baço e do timo da prole. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.2, p.404-414, 2013.

BARCELOS, S.; DIAS, A. S.; FORGIARINI, L. A.; MONTEIRO, M. B. Transplante hepático: repercussões na capacidade pulmonar, condições funcional e qualidade de vida. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 45, n. 3, 2008.

BEM, R. S.; LORA, F. L.; SOUZA, R. C.A.; TRIPPIA, M. A.; AMARANTE, H. M. B.; CARMES, E. R. Correlação das características do ecodoppler do sistema porta com presença de alterações endoscópicas secundárias à hipertensão porta em pacientes com cirrose hepática. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n. 3, p.178-183, 2006.

CARVALHO, E. M.; ISERN, M. R. M.; LIMA, P. A.; MACHADO, C. S.; BIAGINI, A. P.; MASSAROLLO, P. C. B. Força muscular e mortalidade na lista de espera de transplante de fígado. **Revista Brasileira de fisioterapia**, v. 12, n. 3, p. 235-240, 2008.

CHILAKAPATI, J.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. **Toxicology**, v. 230, n. 2-3, p. 105-116, 2007.

CLAUSTRAT, T.B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med. Rev.**, v.9, p.11-24, 2005.

COELHO, A. P. C. P.; GASSANI, B. C. A.; AZEVEDO, C. I.; OLIVEIRA, D. F. B.; ROCHA, D. M.; DUTRA, F. N.; RIOS, L. A.; MARTINS, R. M. F.; PENNA, F. G. C. Abordagem da injúria renal aguda em paciente com cirrose hepática. **Rev. Med. Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 144-146, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. In: Robins. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, p. 1-25.

DE FRANCESCHI, L.; SADA, S.; ANDREOLI, A.; ANGHEBEN, A.; MAROCCO, S.; BISOFFI, Z. Sick cell disease and hyperreactive malarial splenomegaly (HMS) in young immigrants from Africa. **Blood**, v.106, p. 4415-4417, 2005.

DEKANT, W. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. **Toxicol. Letteres**, v. 124, n. 1-3, p. 21-36, 2001.

DENIZ, E.; COLAKOGLU, N.; SARI, A.; SONMEZ, M. F.; TUGRUL, I.; OKTAR, S.; IHHAN, S.; SAHNA, E. Melatonin attenuates renal ischemia-reperfusion injury in nitric oxide synthase inhibited rats. **Acta Histochem.**, v. 108, n. 4, p. 303-309, Jun 2006.

DÍAZ-GIL, J. J.; GARCÍA-MONZÓN, C.; RÚA, C.; MARTÍN-SANZ, P.; CERECEDA, R. M.; MIQUILENA-COLINA, M. E.; MACHÍN, C.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A.; GARCÍA-CAÑERO, R. Liver growth factor antifibrotic activity in vivo is associated with a decrease in activation of hepatic stellate cells. **Histology and histopathology**, v. 24, n. 4, p. 473-479, 2009.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A.; ABREU-GONZALEZ, P.; GARCIA-GONZALEZ, M. J.; KASKI, J. C.; REITER, R. J.; JIMENEZ-SOSA, A. A. Unicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of Melatonin as an adjunct in patients with acute myocardial infarction undergoing primary angioplasty: the melatonin adjunct in the acute myocardial infarction treated with angioplasty (MARIA) trial: Study design and rationale. **Contemp Clin Trials.**, v. 28, n. 4, p. 532-539, 2007.

EL-SOKKARY, G.H.; REITER, R.J.; ABDELGHAFAR, S.K.H. Melatonin supplementation restores cellular proliferation and DNA synthesis in the splenic and thimic lymphocytes of old rats. **Neuroendocrinol. Lett.**, v.24, p.215-223, 2003.

ERTEKIN, V.; SELIMOGLU, M. A.; PIRIM, I. Familial Mediterranean fever in a childhood population in eastern Turkey. **Pediatr Int.**, v. 47, p. 640-644, 2005.

ESQUIFINO, A.I.; CHACON, F.; CANO, P. et al. Twenty-four-hour rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and amino acid content in submaxillary lymph nodes of growing male rats subjected to calorie restriction. **J. Neuroimmunol.**, v.156, p.66-73, 2004.

FAAS, M.M.; BOUMAN, A.; NIEUWENHOVEN, A.L.V.V. et al. Species differences in the effect of pregnancy on lymphocyte cytokine production between human and rat. **J. Leukocyte Biol.**, v.78, p.946-953, 2005.

FLUTTERT, M.; DALM, S.; OITZL, M. S. A refined method for sequential blood 2786 sampling by tail incision in rats. **Lab. Anim.** v.34, p.372 - 378, 2000.

GARCIA-TSAO, G.; LIM, J. K. Management and treatment of patients with cirrhosis and portal hypertension: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 104, n. 7, p. 1802-1829, 2009.

GARCIA-TSAO, G.; PARIKH, C. R.; VIOLA, A. Acute kidney injury in cirrhosis. **Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 2064-2077, 2008.

GATTONI A, MAROTTA F, VANGIERI B, PISANI G, CRISTIANO F. Hepatorenal syndrome. **Clin Ter.**, v. 155, n. 9, p. 375-389, 2004.

GILDEA, T. R.; COOK, W. C.; NELSON, D. R.; AGGARWAL, A.; CAREY, W.; YOUNOSSI, Z. M.; ARROLIGA, A. C. Predictors of long-term mortality in patients with cirrhosis of the liver admitted to a medical ICU. **Chest.**, v. 126, n. 5, p. 1598-1603, 2004.

GINÈS P; GUEVARA M; ARROYO V & RODÉS J. Hepatorenal syndrome. **Lancet**, v. 362, p. 1819-1827, 2003.

GUERRA, R. R.; TROTTA, M.R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.

HASEGAWA, M.; IDE, M.; TAKENAKA, S.; YAMATE, J.; TSUYAMA, S. Urinary metabolic fingerprinting for thioacetamide - induced rat acute hepatic injury using fourier transformion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS), with reference to detection of potential biomarkers for hepatotoxicity. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, p. 570-575, 2007.

HEIDELBAUGH, J. J.; SHERBONDY, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. **Am. Fam. Physician.**, v. 74, n. 5, p. 767-776, 2006.

IIDA, V. H.; SILVA, T. J. A.; SILVA, A. S. F.; SILVA, L. F. F.; ALVES, V. A. F. Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n.1, p. 29-36, 2005.

KIM, J. B.; JUNG, J. Y.; AHN, J. C.; RHEE, C. K.; HWANG, H. J. Antioxidant and anti-apoptotic effect of melatonin on the vestibular hair cells of rat utricles. **Clin Exp Otorhinolaryngol.**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 2009.

LEE, E. -S.; KIM, J. -H.; IM, S.; LEE, K. B.; SOHN, S.; KANG, W. H. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. **Int. J. Dermatol.**, v. 40, n. 1, p. 45-49, 2001.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thiocetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **J. Hepatol.**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

Silva, m. c.; Fighera, r. a.; Brum, j. s.; Graça, d. l.; Kommers, g. d.; Irigoyen, l. f.; Barros, c. s. Cirrose hepática em cães: 80 casos (1965-2003). **Pesq. Vet. Bras**, v. 27, n. 11, p. 471-480, 2007.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2003. p.111-115.

OBERHOLZER, M.; ÖSTREICHER, M.; CHRISTEN, H.; BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 105, n. 5, p. 333-355, 1996.

OZMERDIVENLI, R.; KARACABEY, K.; GUNDOGDU, C. et al. Protective role of melatonin on blood parameters following irradiation in rat. **Afr. J. Biotechnol.**, v.10, p. 18564-18568, 2011.

PACHECO, M.R.; NAKAGHI, L.S.O.; ARTONI, S.M.B. et al. Morfologia da megacariocitopoiese esplenica em coelhos da raça Nova Zelandia Branco, no final da gestação e pos-natal. **Acta Sci.**, v.25, p.109-114, 2003.

PAGTALUNAN, M.E.; DRACHMAN, J.A.; MEYER, T.W. Methods for estimating the volume of individual glomeruli. **Kidney Int.** v. 57, p. 2644-2649, 2000.

- PETROIANU, A. Esplenomegalia induzida por drogas, **Acta Med. Port.** v. 24, n. 4, p. 977-982, 2011.
- PERTSOV, S. Effect of melatonin on the thymus, adrenal glands, and spleen in rats during acute stress. B. **Exp. Biol. Med.**, v.141, p.292-295, 2006.
- PISHAK, V. P.; KOKOSHCHUK, H. I. The renal effects of melatonin in intact and epiphysectomized rats. **Fiziol Zh**, n. 41, p. 23-26, 1995.
- PRATA-LIMA, M. F.; BARACAT, E. C.; SIMÕES, M. C. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Braz. J. Medic. Biol. Res.**, v. 37, n.7, p. 987-995, 2004.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochim. Pol.**, v. 50, p. 1129-1146, 2003.
- REKHA, R.D.; AMALI, A.A.; HER, G.M.; YEH, Y.H.;GONG, H.Y.; HU, S.Y.; LIN, G.H.; WU, J.L. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. **Toxicology**, v. 243, p. 11-22, 2008.
- ROSA, D. P.; BONA, S.; SIMONETTO, D.; ZETTLER, C.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq Gastroenterol**, v. 47, n.1, p. 72-78, 2010 2.
- ROSENFELD, R. Hemograma-Complete blood count. **J Bras Patol Med Lab.** v.48, n.4, 2012.
- SLAYTON, W.B.; GEORGELAS, A.L.; PIERCE, J. et al. The spleen is a major site of megakaryopoiesis following transplantation of murine hematopoietic stem cells. **Blood**, v.100, p.3975-3982, 2002.
- SEELEY, R.R., STEPHENS, T.D., TATE, P. **Anatomy & Physiology**. In: Seeley et al.. (Ed.). *Aparelho Urinário*. 6ª Edição. McGraw-Hill Companies. 2003, p. 990-992.
- SELDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellm's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 1192-1205, 1968.

- SENER, G.;TOSUN, O.; ŞEHIRLI, A. O.; KAÇMAZ, A.; ARBAK, S.; ERSOY, Y.; AYANOĞLU-DÜLGER, G. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. **Life Sciences**, v. 72, n. 24, p. 2707–2718, 2003.
- SMELTZER, S. G.; BARE, B. G. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, 2396 p.
- SOARES-JÚNIOR, J. M.; BARACAT, E. C.; OLIVEIRA, S.; HAIDAR, M. A.; SIMÕES, M. J.; REIS, L. C. Influência da Glândula Pineal sobre a Ingestão de Água e NaCl em Ratas Normais e Ooforectomizadas. **RBGO**, v. 21, n. 6, p. 317-321, 1999.
- SOFIC, E.; RIMPAPA, Z.; KUNDUROVIC, Z.; SAPCANIN, A.; TAHIROVIC, I.; RUSTEMBEGOVIC, A.; CAO, G. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. **J. Neural Transm.**, v. 112, n. 3, p. 349-58, 2005.
- SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines, and pain, em: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F.; et al. **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010;279-302.
- SONG, Y.; PANG, C. S.; AYRE, E. A.; BROWN, G. M.; PANG, S. F. Melatonin receptors in the chicken kidney are upregulated by pinealectomy and linked to adenylate cyclase. **Eur J Endocrinol**, v. 135, p. 28-33, 1996.
- SOYLU, A.; AYDOĞDU, N.; BASARAN, U.; ALTANER, S.; TARCIN, O.; GEDIK, N.; UMIT, H.; TEZEL, A.; DOCKMECI, G.; BALOĞLU, H.; TURE, M., KUTLU, K.; KAYMAK, K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 42, n. 12, p. 6835-6841, 2006.
- TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 99-104, 2005.
- TSUKADA, S.; PARSONS, C. J.; RIPPE, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. **Clin. Chim. Acta.**, v. 364, n. 1-2, p. 33-60, 2006.
- VARGAS, R. S.; FRANÇA, F. C. V. Processo de Enfermagem aplicado a um portador de Cirrose Hepática utilizando as terminologias padronizadas NANDA, NIC e NOC. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, n. 3, p. 348-352, 2007.

WADEI, H. M.; MAI, M. L.; AHSAN, N.; GONWA, T. A. Hepatorenal syndrome: pathophysiology and management. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 1, n. 5, p. 1066-1079, 2006.

WASMUTH, H. E.; KUNZ, D.; YAGMUR, E.; TIMMER-STRANGHÖNER, A.; VIDACEK, D.; SIEWERT, E.; BACH, J.; GEIER A, PURUCKER EA, GRESSNER AM, MATERN S, LAMMERT F. Patients with acute on chronic liver failure display “sepsis-like“ immune paralysis. **J. Hepatol.**, v. 42, n. 2, p. 195-201, 2005.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. - Practical stereological method for morphometrics cytology. **J. Cell Biol.**, v. 30, p. 23-38, 1966.

WRONKA, M.; MALESZEWSKA, M.; STĘPIŃSKA, U.; MARKOWSKA, M. Diurnal differences in melatonin effect on intracellular Ca²⁺ concentration in chicken spleen leukocytes in vitro. **J. Pineal Res.**, v.44, p.134-140, 2008.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. 1ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2013, 1064p.