

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Curso de Biomedicina

Estágio em Pesquisa e Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Avaliação do Estresse Oxidativo no Intestino de  
Ratos submetidos à Carcinogênese Hepática e Ação  
da Melatonina**

Maira Silmara de Moraes

Porto Alegre

Maio/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Curso de Biomedicina  
Estágio em Pesquisa e Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

Maira Silmara de Moraes

**Avaliação do Estresse Oxidativo no Intestino de  
Ratos submetidos à Carcinogênese Hepática e Ação  
da Melatonina**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dra. Norma Marroni  
Co-orientador: Dr. Henrique Fillmann

Porto Alegre  
Maio/2014

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original." —*

Albert Einstein.

## AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Norma Possa Marroni, pela orientação, pela dedicação, pelos conhecimentos e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Doutor Henrique Fillmann, pela disponibilidade e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Às colegas de laboratório Andrea Moreira, Graziela Rodrigues e Sílvia Bona, pelas sugestões, pela companhia, pela paciência e pela compreensão.

Às colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA, Renata Hartmann, Elizângela Schemitt, Mariana Soares, Flávia Morales, Morgana Pivotto, Rosângela Sampaio e professora Maria Isabel Morgan-Martins, pela colaboração e pelo incentivo durante a realização do trabalho.

Às minhas amigas Jordana Souza, Clarissa Günther, Mariana Günther, pela força, pelo carinho, pelas experiências e pela amizade incondicional.

Aos meus pais e irmão, pelo amor e pela confiança.

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Índices microscópicos segundo Sandborn .....	30
Tabela 2. Valores médios das enzimas plasmáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ GT) dos diferentes grupos.....	33
Tabela 3. Valores médios dos índices de dano microscópicos no tecido intestinal de ratos.....	34
Tabela 4. Resultados do Ensaio Cometa no intestino dos diferentes grupos.....	35
Tabela 5. Correlação entre o grau microscópico e os parâmetros TBARS, SOD e GST.....	37

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Estrutura química da dietilnitrosamina.....	13
Figura 2. Formação das Espécies Ativas de Oxigênio.....	16
Figura 3. Ação das enzimas antioxidantes.....	18
Figura 4. Estrutura química da melatonina.....	21
Figura 5. Diagrama do desenho experimental.....	29
Figura 6. Valores médios da variação de peso (Peso Final – Peso Inicial) dos diferentes grupos.....	32
Figura 7. Avaliação histopatológica dos intestinos de rato dos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 8. Efeito da melatonina sobre as espécies que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de intestino de rato.....	35
Figura 9. Efeito da melatonina sobre os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados de intestino de rato.....	36
Figura 10. Efeito da melatonina sobre os níveis da enzima glutationala-S-transferase (GST) em homogeneizados de intestino de rato.....	37

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	9
I. INTRODUÇÃO .....	11
I.1. Doenças Hepáticas.....	11
I.2. Descrição do Xenobiótico indutor de CHC para avaliação das alterações intestinais.....	13
I.3. Espécies Ativas de Oxigênio e Radicais Livres.....	13
I.4. Defesas Antioxidantes.....	17
I.5. Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	18
I.6. Melatonina.....	21
II. OBJETIVOS .....	23
II.1. Objetivo Geral.....	23
II.2. Objetivos Específicos .....	23
III. TRABALHO EXPERIMENTAL .....	24
III.1. Resumo.....	24
III.2. Introdução.....	25
III.3. Materiais e Métodos.....	27

III.4. Resultados.....	32
III.5. Discussão.....	38
IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	42
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43



## ABREVIATURAS

2-AAF	Acetaminofluoreno-2
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifostato
CAT	Catalase
CHC	Carcinoma Hepatocelular
COX	Ciclo oxigenase
Cu <sup>+</sup>	Íon Cuproso
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
e <sup>-</sup>	Elétron
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
EO	Estresse Oxidativo
FA	Fosfatase Alcalina
Fe <sup>2+</sup>	Íon Ferroso
γGT	Gama glutamil transferase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina -6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Intraperitoneal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lipoperoxidação

LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MLT	Melatonina
Mn	Manganês
MN	Micronúcleo
NADPH	Nicotinamida Adenina Difosfato Reduzida
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
Nrf-2	Fator Nuclear Eritróide - 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Ânion Superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio <i>singlet</i>
OCl <sup>-</sup>	Ânion hipoclorito
OH <sup>•</sup>	Hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Radical Livre
RNA	Ácido Ribonucleico
RO <sup>•</sup>	Radical alcóxil
ROO <sup>•</sup>	Radical peróxil
SOD	Superóxido dismutase
TBA-RS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
VO	Via oral
Zn	Zinco

## I. INTRODUÇÃO

### I.1 Doenças hepáticas

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores mais comuns do mundo, com incidência anual estimada em 500 000 a 1 milhão de casos novos <sup>[1]</sup>, e tem como fatores de risco as doenças hepáticas inflamatórias crônicas como as hepatites crônicas B e C, esteatose, esteatohepatite, cirrose alcoólica, deficiência de  $\alpha$ -antitripsina, hemocromatose e tirosinemia <sup>[2][3][4]</sup>. A associação entre cirrose e CHC ocorre em 90% dos casos, no mundo ocidental, sendo rara a sua ocorrência em indivíduos sem cirrose <sup>[4]</sup>. A indução de mitoses, por agentes que danifiquem crônica e lentamente os hepatócitos, faz com que o seu DNA seja mais suscetível a alterações genéticas. As lesões hepáticas, mediadas por radicais livres, podem causar lesões ao DNA e originar tumor, por mutações ou deleções nos genes supressores tumorais, no sentido de provocar aumento aneuplóide da proliferação celular <sup>[5]</sup>.

O tratamento por ressecção cirúrgica convencional (ressecção parcial) do fígado é passível para a minoria de pacientes portadores de CHC, devido ao estágio avançado (metástases à distância) da doença e/ou ao comprometimento dos dois lobos. Mesmo nos passíveis de ressecção, os índices de recorrência tumoral são bastante elevados (50% a 70%) devido à hepatopatia prévia <sup>[6]</sup>. O transplante seria a medida terapêutica ideal indicada, por remover o tumor e o fígado doente não tumoral. Entretanto, seu alto custo e a carência de doadores têm dificultado esta abordagem <sup>[4]</sup>. Nos casos de pacientes com tumores irresssecáveis, o tratamento é limitado, pois a doença não responde à quimioterapia e o fígado não tolera altas doses de radiação.

A enzima AST está relacionada à lesão e necrose celular ou a alterações da permeabilidade da membrana celular do hepatócito, ocorrendo liberação e elevação dos valores enzimáticos na corrente sanguínea. Esta enzima catalisa a transferência do grupo  $\alpha$ -amino do ácido aspártico para o grupamento de  $\alpha$ -ceto do cetoglutarato, com formação de ácido oxalacético, e atua na gliconeogênese, facilitando a síntese de glicose a partir de fontes não glicídicas <sup>[7]</sup>. A enzima FA catalisa a hidrólise de ortofosfatos, em pH básico, com formação de fosfato inorgânico e radicais inorgânicos. Sua síntese é induzida pelos ácidos biliares e ela atua na membrana do hepatócito, rompendo organelas hepáticas e tornando a FA ligada às membranas

solúvel <sup>[8]</sup>. A enzima  $\gamma$ GT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil da glutatona para um aceptor (aminoácido ou peptídeo) com formação de glutamato <sup>[9]</sup>. Ela desempenha um papel chave no ciclo do gama-glutamil, uma via para síntese e degradação de glutatona e detoxificação de xenobióticos <sup>[10]</sup>.

Doenças hepáticas agudas e crônicas têm também um impacto na homeostase intestinal e leva à disbiose e permeabilidade da barreira intestinal, exacerbando a incidência de CHC induzido quimicamente ou por vírus <sup>[11]</sup>. Alterações na permeabilidade permitem que toxinas derivadas do intestino atravessem a barreira intestinal e ativem as células de Kupffer, que superproduzirão citocinas inflamatórias e poderão causar lesão/inflamação do fígado. Os mecanismos para as mudanças na permeabilidade intestinal são múltiplos e incluem alterações na microbiota, geração de acetaldeído do álcool, produção de óxido nítrico, alterações em nutrientes <sup>[12]</sup>. O ambiente imunológico no fígado tem sido atribuído à sua conexão próxima ao intestino. O fígado está constantemente exposto a produtos da microflora entérica <sup>[13]</sup>.

A inflamação intestinal causa liberação de citocinas pró-inflamatórias das células intestinais pelo infiltrado leucocitário, que podem também contribuir para o desenvolvimento de CHC em pacientes com doenças hepáticas inflamatórias crônicas. Há relatos de que o acúmulo de endotoxina e desregulação de citocinas na circulação sistêmica de animais tratados com carcinógeno pode levar à cirrose e CHC <sup>[14]</sup>. Altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) ocorrem em pacientes com cirrose por causa do aumento na permeabilidade da mucosa intestinal e na translocação bacteriana (definida como o deslocamento de bactérias e/ou seus produtos, como as endotoxinas, da luz do trato gastrointestinal para sítios estéreis), que produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) e metabólitos do ácido araquidônico que levam à inflamação e a uma sucessiva liberação de radicais livres de oxigênio que leva ao dano oxidativo <sup>[15][16]</sup>.

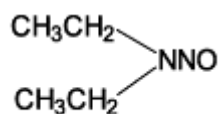
Os distúrbios intestinais inflamatórios correspondem aos processos que envolvem o trato gastrointestinal e podem ser agudos ou crônicos <sup>[17]</sup>. Eles são provenientes de uma resposta desregulada do sistema imunológico do paciente contra os componentes da microbiota intestinal, em associação aos fatores genéticos do hospedeiro e do ambiente (alimentação, radiação, xenobióticos) <sup>[18]</sup>. Ainda, há estudos que sugerem a presença do estresse oxidativo na atividade e no desenvolvimento desses distúrbios <sup>[19]</sup>.

## I.2 Descrição do Xenobiótico indutor de CHC para avaliação das alterações intestinais

A dietilnitrosamina (DEN) possui peso molecular 102,1, e apresenta na sua constituição um radical nitroso ligado a 4 átomos de carbono e 10 de hidrogênio –  $C_4H_{10}N_2$  <sup>[20]</sup>. Ela é um agente químico frequentemente usado como carcinógeno, capaz de desenvolver tumor no fígado, no trato gastrointestinal, na pele e no pulmão <sup>[21]</sup>. Sua capacidade carcinogênica se dá por causar dano na estrutura do DNA. A DEN é estável em pH fisiológico e hidrolizada para  $\alpha$ -hidroxilnitrosamina, a bioativação é dependente de oxigênio e de NADPH e mediada pelo Citocromo P450 (Cyp450). Em seguida há a formação do íon etil diazônio, que possui características eletrofílicas e é responsável pelos danos no DNA, devido à sua reação com nucleotídeos <sup>[22]</sup>.

O estresse oxidativo é potencializado pela DEN e contribui para a hepatocarcinogênese. O sistema Cyp450, ativado, aumenta a geração de espécies ativas de oxigênio (EAO), como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, ambos capazes de formar radical hidroxil e provocar danos a proteínas, lipídeos e DNA <sup>[23]</sup>.

O modelo animal de CHC foi proposto para estudar as fases evolutivas na doença hepática, com o desenvolvimento espontâneo do tumor, no ambiente fibrótico, mimetizando a evolução do crescimento do carcinoma. A reprodução do ciclo processo inflamatório-fibrose-esteatose-cirrose-malignidade foi uma grande vantagem desse modelo <sup>[24]</sup>.



**Dietilnitrosamina**  
**DEN**

Figura 1. Estrutura química da dietilnitrosamina.

## I.3 Espécies Ativas de Oxigênio e Radicais Livres

As espécies ativas são necessárias para o funcionamento normal da célula, atuando na fagocitose e regulação do crescimento ou como moléculas de sinalização celular para papéis fisiológicos fundamentais, como participar da síntese e regulação de algumas proteínas <sup>[33]</sup>. Elas são produzidas continuamente e estabilizadas por sistemas de defesa antioxidante. Em condições patológicas, a sua produção aumentada, em associação a uma resposta das defesas antioxidantes insuficiente, pode ser incapaz de restabelecer a homeostase redox e ser responsável pelo dano oxidativo de macromoléculas celulares e, geralmente, alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. O rompimento entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante, de forma que os primeiros sejam predominantes, é definido como estresse oxidativo, e pode representar um mecanismo fundamental de patologias humanas <sup>[34]</sup> <sup>[27]</sup>. O termo “Estresse Oxidativo” é utilizado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis, resultante tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes <sup>[35]</sup>. O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. No caso da adaptação, as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em “up-regulation” da síntese de sistemas de defesa antioxidante para a restauração do equilíbrio oxidante/antioxidante. No caso do dano celular, o estresse oxidativo pode danificar alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) <sup>[27]</sup>. Dentre os danos celulares causados ao organismo estão a peroxidação lipídica, na qual os radicais podem oxidar lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipídeos de membranas biológicas, causando quebras das pontes dissulfetos dos lipídeos e consequente rompimento de membranas e perda da integridade celular; oxidação de proteínas, com inativação enzimática; a alteração do estado redox intracelular e a oxidação de DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios na transcrição <sup>[36]</sup>.

Os radicais livres (RL) - em latim “radix” que significa raiz - são moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu último orbital e têm a capacidade de existir de forma independente <sup>[25]</sup>. As moléculas que apresentam dois elétrons nos seus orbitais são estáveis. Os radicais livres, por sua vez, apresentam apenas um elétron, tornando-os altamente instáveis e, por isso, consideradas moléculas reativas e danosas às células e ao organismo <sup>[26]</sup>. Os radicais livres podem ser formados por duas maneiras: ganho de um elétron por uma molécula não-radical ou perda de um

elétron de uma molécula não-radical. Outra maneira é pela fissão homolítica, onde há quebra de uma ligação covalente e cada átomo fica com um dos elétrons compartilhados <sup>[27]</sup>. Um radical livre tem a capacidade de gerar outro radical livre quando reage com uma molécula não-radical; a presença de um pode, então, levar a uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons, onde há a formação de um radical livre, que reagirá com outra molécula e gerará outro radical livre <sup>[28]</sup>. Eles podem provocar alterações em ácidos graxos insaturados das membranas celulares e no DNA <sup>[29]</sup>. Os dois principais radicais livres são o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e o radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), e podem ser pequenos como a hidroxila, ou grandes e complexos, contendo átomos de carbono e cadeias laterais <sup>[29]</sup>.

As formas que reagem para formar radicais livres e não têm número desemparelhado de elétrons são denominadas espécies ativas de oxigênio (EAO) e incluem o ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), o radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) e o alcoxil ( $\text{RO}\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ) <sup>[26]</sup>. Cada EAO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida <sup>[30] [31]</sup>.

No metabolismo dos organismos aeróbios, o oxigênio ( $\text{O}_2$ ) é reduzido à água no final da respiração mitocondrial, aceitando quatro elétrons, para a formação de ATP. A molécula de  $\text{O}_2$  se mantém unida ao complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial até ocorrer a redução total do  $\text{O}_2$  em água, entretanto, 5% do oxigênio utilizado não é completamente reduzido à água e é convertido em intermediários reativos. Nesse processo, ocorre a redução parcial do oxigênio, por receber apenas um elétron de cada vez, e gera ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) que, com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, se reduz a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se, entretanto, um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), conforme a figura 2. Assim, a formação de radicais livres ou de espécies ativas de oxigênio (EAO) acontece pelo fato do  $\text{O}_2$  se reduzir à água de forma monovalente, permitindo a geração de moléculas ou íons reativos durante o seu processo de redução <sup>[32]</sup>.

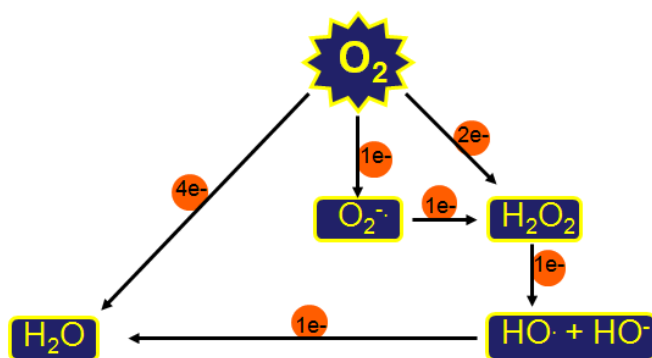
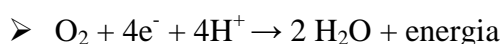


Figura 2. Formação das Espécies Ativas de Oxigênio.

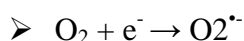
Um radical, ao reagir com proteínas da membrana celular, ocasiona dano estrutural e funcional <sup>[37]</sup>. A capacidade dos RL de reagir com DNA e proteínas permite ativar ou inativar enzimas envolvidas na carcinogênese e também ativar fatores de transcrição pró-tumorais, além de causar alteração de bases púricas e pirimídicas. Dessa forma, a geração de EAO e RL contribui para um ambiente favorável aos processos que envolvem o crescimento tumoral <sup>[38]</sup>.

A exposição crônica e intermitente a químicos carcinógenos, por exemplo, provoca dano oxidativo ao DNA, pela alquilação da guanina, a qual resultará em mutação e subsequente expansão clonal da célula mutada. Vias de transdução de sinal também podem ser estimuladas pelas EAO e, assim, ativar de fatores chave de transcrição favorecendo à carcinogênese <sup>[38]</sup>.

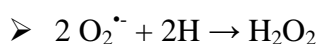
Quanto à formação das EAO, na cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase adiciona quatro elétrons ao O<sub>2</sub> para formar água, reação conhecida como redução tetravalente do oxigênio:



Entretanto, o oxigênio tem tendência a receber um elétron por vez, em função de sua configuração eletrônica. A conversão univalente do oxigênio à água se dá pela reação de adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental que forma o radical superóxido (O<sub>2</sub>•-) <sup>[39]</sup>:

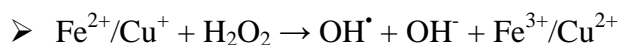


Este, por sua vez, ao receber outro elétron e dois íons hidrogênio gera peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reação de dismutação <sup>[30]</sup>:





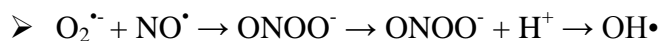
O peróxido de oxigênio, ao receber mais um elétron e um íon hidrogênio, forma o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), o mais reativo dos intermediários, que é gerado quando o peróxido reage com íons ferro ou cobre, chamada Reação de Fenton <sup>[40]</sup>:



A reação entre superóxido e peróxido também pode ser catalisada por metais de transição, na qual é produzido o radical hidroxil, chamada Reação de Haber-Weiss:



O radical superóxido também é capaz de reagir diretamente com o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), radical livre centrado no nitrogênio, e gerar peroxinitrito que, com adição de um hidrogênio forma o oxidante radical hidroxil <sup>[39]</sup>:



O desequilíbrio no estado redox tem efeito potencialmente deletério sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção da célula e do organismo para um eventual dano causado por quantidades excessivas dos mediadores altamente reativos <sup>[37]</sup>.

#### I.4 Defesas antioxidantes

Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que diminuem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, estabilizando-os. Os RL são eliminados do organismo ao reagirem com outro radical ou com o sistema antioxidante, que age de várias formas para anular a ação do radical livre, inativando as EAO ou se ligando aos íons metais de transição <sup>[27]</sup>. As defesas antioxidantes foram desenvolvidas durante o processo evolutivo para inibir as espécies tóxicas. O sistema de defesa antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático <sup>[37]</sup>. Os sistemas de proteção endógena são chamados de reserva antioxidante e incluem as defesas enzimáticas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona dissulfeto redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) <sup>[41]</sup>. As defesas não enzimáticas são:  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico ou vitamina C, glutatona, flavonóides, bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q e ácido úrico <sup>[42]</sup>. Embora a composição seja diferente de

tecido a tecido, de tipo de célula a tipo de célula e possivelmente de célula a célula do mesmo tipo em um dado tecido, as defesas antioxidantes se encontram amplamente distribuídas no organismo [27] e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres (antioxidantes enzimáticos); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre) ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio, como glutathiona reduzida (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina. Podem ser divididas em 3 grupos: antioxidantes primário, secundário e terciário. O primeiro previne a formação de novos RL e é representado pela superóxido dismutase (SOD), pela glutathiona peroxidase (GPx) e pelas proteínas de união com metais (ferritina e ceruloplasmina). O segundo capta os radicais, evitando as reações em cadeia, e é representado pela vitamina E, pela vitamina C, pelo ácido úrico e pela albumina. O terceiro repara moléculas lesadas por radicais, por exemplo, a enzima reparadora de DNA.

### I.5 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O sistema antioxidante enzimático é responsável por manter o equilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, às quais o organismo fica exposto. Esse sistema compreende enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona S-transferase (GST), que desempenham um papel específico no controle do balanço oxidativo, como demonstra a figura 3 [27].

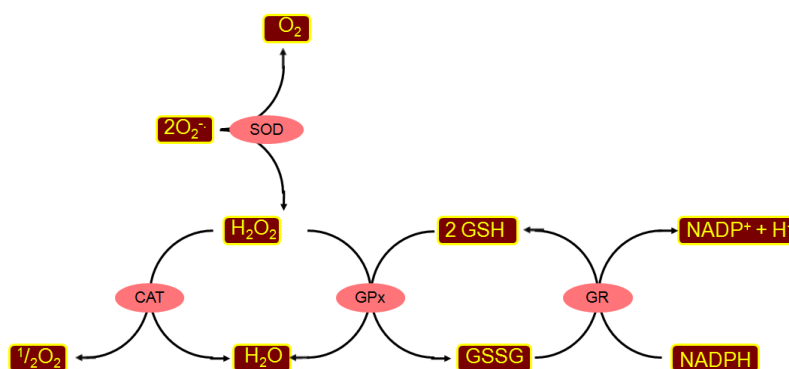
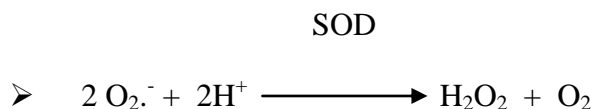


Figura 3. Ação das enzimas antioxidantes.

A SOD tem como função atuar na dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Esta enzima apresenta três formas: a Cu-ZnSOD,

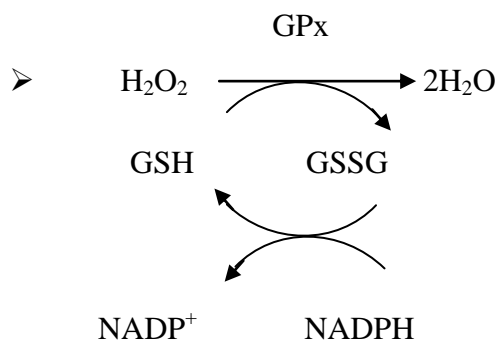
localizada no citosol; a Cu-ZnSOD localizada no endotélio vascular e a SOD-Mn, localizada na matriz mitocondrial. A ação catalítica da SOD é expressa como se segue:



O produto final da dismutação do ânion superóxido é o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apesar de não ser um radical, reage com facilidade originando o radical hidroxil. A remoção dos peróxidos ocorre por ação da catalase e da glutatona peroxidase, sendo que a catalase tem mais afinidade ao peróxido de hidrogênio de metil e etil, enquanto a glutatona peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos <sup>[41]</sup>. A ação da catalase sobre o peróxido é expressa como se segue:



A GPx está situada no citosol e na matriz mitocondrial, e tem como função reduzir o peróxido de hidrogênio à água, por meio da oxidação da glutatona reduzida (GSH). Para o restabelecimento da glutatona oxidada (GSSG) à reduzida, é necessário que haja a regeneração da GSSG por meio da Glutaciona Redutase (GR), com consumo de NADPH, conforme a reação expressa a seguir:



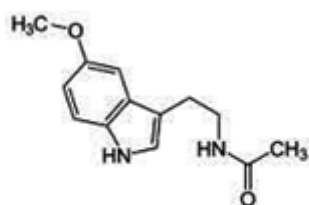
As glutatona S-transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutatona (GSH) a compostos que apresentam carbono, nitrogênio ou enxofre eletrofílico <sup>[43]</sup>. Elas podem ser divididas em três famílias: GST citosólica, GST mitocondrial e GST microsomal; as duas primeiras são enzimas solúveis, enquanto as do tipo microsomal estão associadas à membrana. Estas enzimas estão presentes no meio biológico na forma de homo ou heterodímeros, que possuem dois sítios ativos por

dímero com atividades independentes um do outro <sup>[44]</sup>. Cada um consiste de duas regiões de ligação, uma para a glutathione (GSH), específica para este tripeptídeo, e outra região com menor especificidade para os substratos eletrófilos <sup>[44]</sup>. Seus substratos mais comuns incluem haletos de alquila, epóxidos, compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados (quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos <sup>[45] [46] [47]</sup>. Glutathione transferases participam do metabolismo de compostos endógenos, como catabolismo de aminoácidos (fenilalanina e tirosina) <sup>[48]</sup>, conversão do colesterol em hormônios esteroidais (testosterona e progesterona) por reações de oxidação e isomerização <sup>[49]</sup>, e a sua presença na mitocôndria e nos peroxissomos sugere que elas também estariam envolvidas em processos de detoxificação dos subprodutos da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos <sup>[43]</sup>. A peroxidação de ácidos graxos das membranas celulares forma eletrófilos, como aldeídos, hidroxialdeídos, cetoaldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados e seus respectivos epóxidos, que são genotóxicos <sup>[50]</sup>, e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GSTs <sup>[51] [52]</sup>, pela adição conjugada da glutathione (GSH) a aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados <sup>[53]</sup>.

Além disso, estas enzimas participam do metabolismo de xenobióticos, compostos químicos naturais e/ou não naturais aos quais os seres vivos estão continuamente expostos que podem interagir de maneira deletéria ao organismo. A detoxificação enzimática de xenobióticos possui três fases diferentes. Nas primeiras duas fases, pode-se observar a transformação do xenobiótico em metabólitos mais solúveis em água e menos tóxicos, por conjugação com substratos endógenos. Na última fase, os metabólitos são transportados para o fora da célula e excretados, envolvendo a participação de transportadores específicos para reconhecer os conjugados glutathione-xenobióticos, onde são clivados pelas enzimas  $\gamma$ -glutamil transpeptidase ( $\gamma$ GT) e dipeptidases na membrana externa celular. A formação de conjugados com a glutathione é a principal reação, do ponto de vista quantitativo, para muitos xenobióticos, representando evolutivamente um mecanismo de defesa celular <sup>[31]</sup> (os níveis celulares de GSH, em condições normais, estão altamente elevados - aproximadamente 10 mM). Esse sistema de defesa integrado depende da ação combinada de outras enzimas, para fornecer glutathione, e de transportadores para facilitar a eliminação dos conjugados de GSH, que podem ser mais tóxicos que o próprio xenobiótico <sup>[54]</sup>.

## I.6 Melatonina

O estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese e progressão de doenças hepáticas e de tecidos adjacentes, como o tecido intestinal. Assim, o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico, para recuperar os danos sistêmicos e locais <sup>[55] [56] [57] [58] [59]</sup>. A melatonina (MLT) – N-acetil-5-metoxitriptamina - é uma indolamina lipofílica, derivada do triptofano e produzida principalmente pela glândula pineal dos vertebrados, mas também pode ser encontrada em outros órgãos <sup>[60] [61] [62] [63]</sup>. Sua utilização está relacionada ao controle e tratamento de alterações ligadas ao ritmo circadiano <sup>[61][64]</sup>, e as ações protetoras estão ligadas ao seu potente efeito antioxidante <sup>[65] [66] [67] [64]</sup>.



**Melatonina**  
**MLT**

Figura 4. Estrutura química da melatonina.

As características que conferem ação antioxidante à molécula baseiam-se na sua capacidade de atuar como um doador de elétrons em processos não enzimáticos, de atravessar facilmente barreiras morfofisiológicas e de acessar rapidamente locais de produção de radicais livres como, por exemplo, as mitocôndrias, onde a geração de radicais livres é especialmente elevada <sup>[66] [64]</sup>. A MLT também age sobre os radicais livres, indiretamente, pela estimulação de várias enzimas antioxidantes e pela ação de seus metabólitos que atuam como varredores de RL <sup>[64]</sup>. Além disso, ela exibe atividade anti-inflamatória significativa <sup>[67] [64]</sup>, cuja eficácia é resultante da sua capacidade de reduzir a expressão e a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da ciclo-oxigenase (COX), limitando a produção de várias moléculas pró-inflamatórias <sup>[68]</sup>. A melatonina é responsável pela modulação da produção destes fatores pela regulação de fatores de transcrição, como o fator nuclear-kB (NF-KB), o fator nuclear eritróide-2 (Nrf-2) e o fator induzível por hipóxia (HIF) <sup>[65] [66] [64]</sup>. Assim, é possível que sistemas biológicos expostos à MLT apresentem níveis

elevados de enzimas detoxificantes da fase I, cujos promotores são regulados direta ou indiretamente por fatores nucleares <sup>[69]</sup> <sup>[67]</sup>, o que contribui para as defesas antioxidantes das células, por meio da regulação gênica, e os torna mais preparados para situações de estresse oxidativo ou de toxicidade <sup>[70]</sup>.

Estudos realizados com melatonina demonstram sua atuação como neuroprotetora, cardioprotetora e anticarcinogênica <sup>[71]</sup>. Curiosamente, ela atua de forma oposta em células normais e em células tumorais <sup>[72]</sup>, dualidade que a permite ser considerada um bom recurso terapêutico no tecido hepático carcinogênico e no tecido intestinal adjacente. Em suma, a melatonina influencia os mecanismos que regulam o estresse celular e oxidativo, além de estimular e inibir diversas rotas moleculares, tornando-a um interessante agente farmacológico na carcinogênese e seus efeitos em tecidos adjacentes.

Com base nessas considerações, o estudo utilizou a indução química da carcinogênese por meio de agente carcinógeno hepático, dietilnitrosamina (DEN), e do composto genotóxico, acetaminofluoreno-2 (2-AAF), em uma única administração, para o desenvolvimento de um modelo experimental de carcinogênese hepática em ratos e avaliou, nesse modelo, o estresse oxidativo no intestino desses animais.

## II. OBJETIVOS

### II.1. Objetivo Geral

Avaliar, em um modelo experimental de carcinogênese hepática induzida por DEN em ratos, o estresse oxidativo no intestino e a ação da melatonina neste modelo.

### II.2. Objetivos Específicos

II.2.1. Avaliar as enzimas de integridade e função hepática aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA),  $\gamma$ -glutamil-transferase ( $\gamma$ GT) para verificação de função e integridade hepática;

II.2.2. Avaliar histologicamente o intestino desses animais pela coloração de HE;

II.2.3. Determinar o dano ao DNA pelo Ensaio Cometa no intestino desses animais;

II.2.4. Avaliar a Lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST no intestino desses animais.

### III. TRABALHO EXPERIMENTAL

#### 1. Resumo

As lesões hepáticas podem causar danos ao DNA e originar câncer através de mutações ou deleções nos genes supressores tumorais. Elas também levam a um impacto na homeostase intestinal por mecanismos que incluem alterações no estado redox. O dano oxidativo contribui para a patogênese e progressão de doenças hepáticas e de tecidos adjacentes e o uso de antioxidantes pode retardar a formação de radicais livres. O presente estudo propõe avaliar o estresse oxidativo no intestino de ratos e o efeito da melatonina, em períodos diferentes de tratamento, em um modelo de carcinogênese hepática induzida por dietilnitrosamina. Ratos *Wistar* machos foram utilizados, com peso médio de 140g, divididos em 5 grupos: Controle (CO); Controle + Melatonina (CO+MLT); de Dietilnitrosamina (DEN); DEN e melatonina a partir da 5ª semana (DEN+MLT<sub>5</sub>) e DEN e melatonina a partir da 12ª semana (DEN+MLT<sub>12</sub>). Os animais foram submetidos à administração intraperitoneal de dietilnitrosamina 50mg/kg de peso corporal, por um período crônico e intermitente. O tratamento com a melatonina via oral, diluído 20mg/L na água de beber, se iniciou na 5ª ou na 12ª semanas posteriores à exposição à DEN. As análises das enzimas de integridade hepática foram realizadas por métodos de rotina do HCPA. A avaliação da mutagenicidade nas células intestinais foi realizada pelo ensaio cometa. As análises histológicas do intestino foram realizadas pela coloração de Hematoxilina-Eosina. O homogeneizado do intestino foi utilizado para avaliação do estresse oxidativo através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST. A análise estatística utilizada foi ANOVA ONEWAY seguida de teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ . Nossos resultados mostraram que a melatonina não alterou o peso dos animais submetidos à indução da carcinogênese. O tratamento com melatonina foi capaz de diminuir as concentrações séricas das enzimas de integridade hepática AST e  $\gamma$ GT e de atenuar o processo inflamatório do intestino desses animais e os níveis de lipoperoxidação, em ambos os períodos de tratamento. Foi observada redução na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST dos animais tratados, o que demonstra que a melatonina interfere nas defesas antioxidantes do intestino. Esses resultados sugerem que a melatonina desempenhou um papel protetor no fígado e um papel anti-inflamatório e antioxidante no intestino de ratos submetidos à exposição



de um agente carcinogênico. Assim, podemos observar um potencial recurso terapêutico, dado que sua ação foi observada no tecido intestinal e em tecidos adjacentes.

**Palavras-chave:** Carcinogênese hepática, estresse oxidativo, melatonina, intestino.

## 2. Introdução

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores mais comuns do mundo e a sua associação com cirrose ocorre na maioria dos casos <sup>[1][4]</sup>. As lesões hepáticas, mediadas por radicais livres, podem causar lesões ao DNA e originar o câncer, através de mutações ou deleções nos genes supressores tumorais <sup>[5]</sup>. A progressão da tumoração envolve fatores de ordem genética, como a angiogênese, fundamental para o crescimento e as metástases dos tumores <sup>[3]</sup>.

Doenças hepáticas têm também um impacto na homeostase intestinal, levando à disbiose e permeabilidade da barreira intestinal, o que exacerba a incidência de CHC quimicamente induzido <sup>[11]</sup>. Alterações na permeabilidade permitem toxinas atravessarem a barreira intestinal e ativar as células para superproduzirem citocinas pró-inflamatórias, que poderão causar lesão/inflamação do fígado. Os mecanismos para as mudanças na permeabilidade intestinal são múltiplos e incluem alterações no estado redox <sup>[12]</sup>. Esse aumento na permeabilidade da mucosa intestinal e a translocação bacteriana produzem altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS), citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) e leva à inflamação e ao dano oxidativo hepático <sup>[15][16]</sup>.

A geração de EAO e RL contribui com um ambiente favorável aos múltiplos processos que envolvem o crescimento tumoral e o estresse oxidativo desempenha um papel central na patogênese e progressão de doenças hepáticas e de tecidos adjacentes, por isso o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico <sup>[38]</sup>. A presença do dano oxidativo nas doenças intestinais e hepáticas compreende a peroxidação dos lipídios da membrana, a oxidação de proteínas e os danos ao DNA por espécies ativas de oxigênio (EAO) <sup>[36]</sup>. O sistema de defesa antioxidante, enzimático ou não-enzimático, evoluiu para mitigar a ação das EAO e incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona

peroxidase (GPx), glutathione disulfide reductase (GR) e glutathione transferase (GST), além de  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, ácido úrico, glutathione e flavonoides <sup>[41][42]</sup>.

Assim, a hipótese do presente estudo é que o processo de carcinogênese hepática pode levar a alterações fisiológicas no intestino, decorrentes da proximidade anatômica ao fígado, e que se houver inflamação estabelecida, esta possa ter repercussão sobre os parâmetros de estresse oxidativo.

O modelo experimental utilizado foi a carcinogênese hepática induzida pela dietilnitrosamina (DEN), um agente químico carcinógeno, que pode desenvolver tumor no fígado, trato gastrointestinal e em outros órgãos <sup>[21]</sup>. Estudos anteriores demonstraram que a capacidade carcinogênica da molécula se dá pelo dano na estrutura do DNA e pela potencialização do estresse oxidativo, o que contribui para a hepatocarcinogênese <sup>[22]</sup>. Neste modelo de CHC, o tumor se desenvolve espontaneamente, no ambiente da fibrose, e reproduz o ciclo inflamação – fibrose – esteatose – cirrose – malignidade, mimetizando a evolução do crescimento do carcinoma <sup>[24]</sup>.

Na patogênese da doença intestinal inflamatória, muitos fatores estão implicados, como a infiltração leucocitária e a superprodução de agentes pró-inflamatórios. A lesão tecidual vem sendo atribuída à sua capacidade de liberar grande variedade de EAO e de nitrogênio. Esses agentes estão envolvidos no desenvolvimento da lesão tecidual em várias doenças inflamatórias. A capacidade antioxidante do cólon é relativamente deficiente, quando comparada à de outros órgãos e tecidos. Assim, o dano oxidativo ocorre de forma intensa e marcada na mucosa colônica <sup>[73]</sup>. Aumento significativo da migração e adesão leucocitária aos vasos do segmento examinado é observado em animais com colite. Essa migração leucocitária é responsável pela elevada concentração de EAO no tecido afetado e esta elevação causa dano tecidual <sup>[74]</sup>.

A melatonina (MLT), N-acetil-5-metoxitriptamina, é uma indolamina lipofílica derivada do triptofano, produzida principalmente pela glândula pineal dos vertebrados e envolvida no controle do ciclo circadiano em mamíferos <sup>[60]</sup>. Sua síntese e secreção são rítmicas, com altas concentrações encontradas durante o período escuro e baixas durante o período claro <sup>[75]</sup>. Ela apresenta poder antioxidante e tem um papel hepatoprotetor, tanto em modelos celulares, como em modelos animais de doenças hepáticas <sup>[64]</sup>. Sua atuação ocorre nas defesas antioxidantes das

células pela regulação gênica, uma vez que os promotores de enzimas antioxidantes são regulados direta ou indiretamente por fatores nucleares, inibidos pela MLT [69]. Além disso, uma significativa atividade anti-inflamatória é observada, resultante da sua capacidade de reduzir a expressão e a atividade das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX), o que limita a produção de moléculas pró-inflamatórias [68]. Ela também varre o radical tóxico hidroxil, o ânion peroxinitrito, o radical peroxil e suprime o oxigênio *singlet* [76]. Altas concentrações foram encontradas no trato gastrointestinal [77] e a melatonina modula algumas funções gastrointestinais, como o tempo de trânsito alimentar e motilidade gastrointestinal [78] [79]. Essas características permitem que ela seja um bom recurso terapêutico no CHC, como um agente farmacológico na carcinogênese. Esse estudo se propõe a avaliar o aspecto histológico e os parâmetros de estresse oxidativo intestinais, bem como a ação da melatonina no modelo experimental de carcinogênese hepática induzida por DEN.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Animais e reagentes

Os procedimentos com os animais foram de acordo com o preconizado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Goldin e Raymundo, 1997). O estudo também obedeceu e seguiu à Legislação Brasileira que rege o uso científico de Animais (Lei Federal nº 11.794/08) e o Código Estadual de Proteção aos Animais (Lei Estadual nº 11.915/2003), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética local, FIPE 12-0355.

Ratos machos da linhagem *Wistar*, provenientes da FEPES, com peso de aproximadamente 140g foram utilizados. Os animais receberam alimentação recomendada pelo National Institute of Health – U.S.A. e água "*ad libitum*", e foram mantidos no Centro de Experimentação Animal do HCPA durante o experimento, acondicionados em caixas plásticas de 47 x 34 x 18 cm forradas com maravalha (5 animais em cada caixa), em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 20 e 25°C.

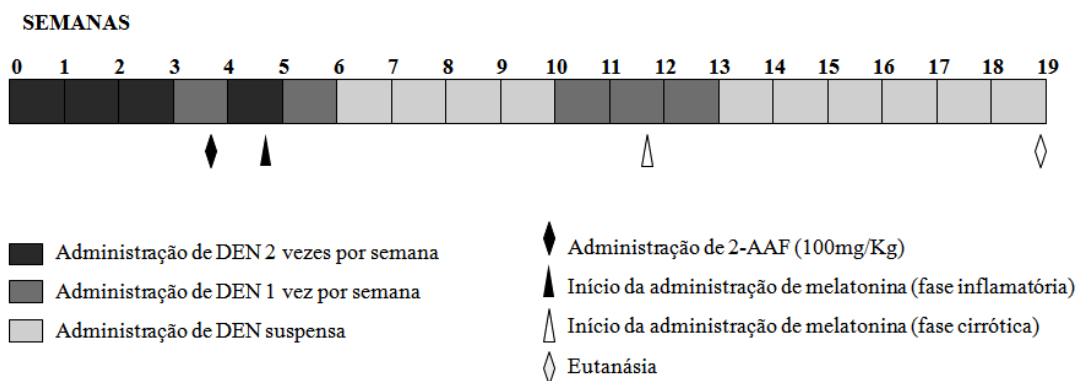
A Melatonina utilizada neste estudo (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo) foi administrada via oral (VO) e preparada 3 vezes por semana. Foram pesados 16mg de MLT dissolvidos em etanol (1mL 100%, vol/vol), solução diluída na água de beber na concentração final de 20mg/L (Molperces et al., 2007) <sup>[80]</sup>. Para ter o volume ingerido controlado, os animais foram colocados em caixas separadas e seus volumes de água foram medidos a cada dois dias.

### *3.2 Delineamento Experimental*

Na etapa de desenvolvimento do modelo experimental (19 semanas) foi realizada a indução química do CHC e posteriormente o tratamento com a melatonina, que teve início na 5ª e na 12ª semana, tempos escolhidos com base em estudo prévio de carcinogênese experimental que caracterizou a fase inflamatória na 5ª semana e a fase cirrótica na 12ª semana de exposição ao DEN (Diethylnitrosamine Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), cuja administração foi realizada via intraperitoneal (IP) na concentração final de 50mg/kg de peso corporal, sendo esta parte desenvolvida para o trabalho de doutorado do grupo de pesquisa ao qual este trabalho está vinculado.

Com o desenho experimental apresentado na Figura 1, foi possível acompanhar a ação da melatonina sobre processo inflamatório no tecido hepático em processo de carcinogênese e sobre tecido hepático cirrótico em processo de carcinogênese.

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=12): grupo controle (CO), grupo controle com administração de melatonina (CO + MLT), grupo submetido à administração de DEN (DEN), grupo submetido à administração de DEN com administração de melatonina iniciada na 5ª semana (DEN+MLT<sub>5</sub>) – tratamento precoce - e grupo submetido à administração de DEN com administração de melatonina iniciada na 12ª semana (DEN+MLT<sub>12</sub>) – tratamento tardio, sendo que o grupo controle foi submetido à administração intraperitoneal de solução fisiológica e os grupos experimentais, de dietilnitrosamina 50mg/kg.



**Figura 5.** Diagrama do desenho experimental.

Transcorrido esse período, os animais foram eutanasiados. O processo iniciou-se com a anestesia do animal mediante a administração de fármacos anestésicos, uma mistura de Cloridrato de Xilazina 2% 50mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Cetamina 100mg/Kg de peso corporal, intraperitonealmente. Foi retirado o sangue do seio orbital para as análises e, após, foi realizada tricotomia manual da região abdominal, seguida de intervenção cirúrgica, com uma laparotomia ventral média, onde, foi realizada uma análise qualitativa avaliando o aspecto do tumor e foram retirados os demais tecidos a serem avaliados, como o intestino grosso distal.

### 3.3 Análises das enzimas de função e Integridade Hepática

O sangue foi coletado pela técnica da punção do plexo venoso retro-orbital com tubo de capilar de vidro heparinizado e foi acondicionado em frascos devidamente preparados para serem realizadas as análises de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA),  $\gamma$ -glutamil-transferase ( $\gamma$ GT). As dosagens séricas foram realizadas por métodos de rotina do HCPA para AST, ALT,  $\gamma$ GT e FA.

### 3.4 Análises Anatomopatológicas

O material retirado foi fixado em formalina tamponada. A seguir, foi impregnado em blocos de parafina, subsequentemente cortados em micrótomo rotativo com espessura de 6  $\mu$ m. As lâminas contendo os cortes foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação do aspecto histológico nas amostras e analisadas em microscópio binocular *Nikon Labophot* nos aumentos de

100X e 200X. O protocolo para avaliação histológica da mucosa baseou-se no Índice Histológico de Atividade Inflamatória, descrito por Sandborn (1995) <sup>[81]</sup>, de acordo com a Tabela 1:

Grau	Achados Microscópicos
<b>0 Normal</b>	
<b>1 Leve</b>	Polimorfos nucleares (PMN) difusos na lâmina própria Criptite ocasional Mínima destruição glandular e ulceração
<b>2 Moderado</b>	Moderado número de PMN na lâmina própria com criptite e abscessos Alguma destruição glandular
<b>3 Grave</b>	Numerosos PMN com abundante criptite Abscessos críticos Destruição celular extensa Ulceração pode ser proeminente

**Tabela 1.** Índices microscópicos segundo Sandborn (1995).

### 3.5 Determinação da mutagenicidade pelo Ensaio Cometa

A versão alcalina do teste cometa foi utilizada. Alíquotas de 10 µl das amostras foram misturadas com uma fina camada de agarose “low melting” e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu a migração dos fragmentos de DNA por eletroforese. Após, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino, estabilizadas após a eletroforese com tampão Tris e coradas com solução de prata. Os resultados serão expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano, que variam de 0 a 4. A FD foi calculada baseada no número de células com cauda *versus* aquelas sem cauda (Speit & Hartmann 1999; Tice, Agurell et al. 2000) <sup>[82][83]</sup>.

### 3.6 Preparação do homogeneizado

Os intestinos foram pesados e homogeneizados durante 1 minuto em ULTRA-TURRAX à temperatura de 0-4°C em solução tampão fosfato 1,15% (5 mL por grama de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL/mL de KCl). Após, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (4 °C). O

precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado, pipetado em ependorfes e armazenado a -80 °C para as posteriores análises (Llesuy *et al.*, 1985) <sup>[84]</sup>.

### 3.7 Determinação de proteínas

A quantificação das proteínas do homogeneizado foi determinada pelo método de Bradford, utilizando solução de albumina bovina como padrão para a curva de concentração do cálculo. Uma alíquota de 1 µL foi adicionada a 40 µL de reativo Coomassie Brilliant Blue durante 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 595nm e os valores foram expressos em mg/ml (Bradford, 1976) <sup>[85]</sup>.

### 3.8 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A quantidade de malondialdeído (MDA) gerada pela peroxidação lipídica é mensurada pela técnica de TBARS, que mensura a quantidade de substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico com formação de um produto corado. As amostras foram incubadas a 100°C durante 15 minutos após a adição de 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e de 0,75 mL ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após, foi retirada a fração com o produto corado e realizada a leitura em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 535 nm (Buege & Aust, 1978) <sup>[86]</sup>.

### 3.9 Avaliação da Atividade das Enzimas Antioxidantes

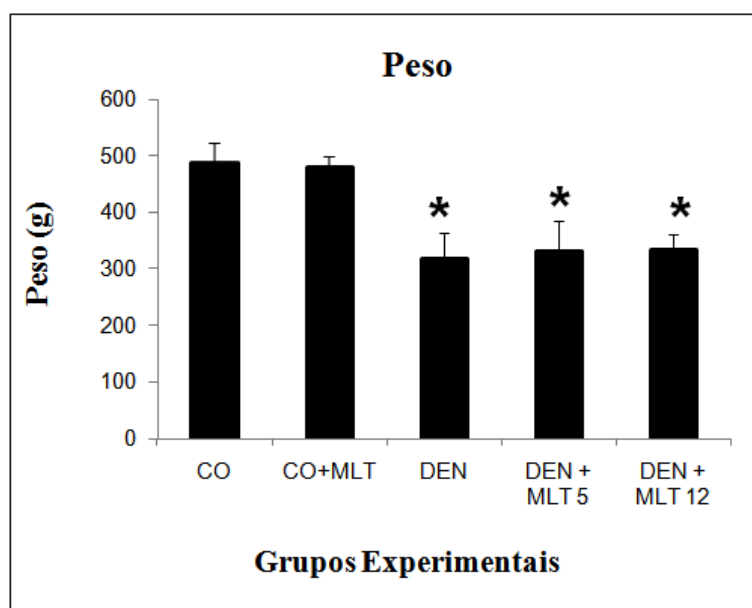
A análise da enzima superóxido dismutase (SOD) é baseada na capacidade de inibir a reação do radical superóxido (substrato enzimático) com adrenalina (detector). No meio alcalino, a adrenalina se transforma em adrenocromo. A leitura foi realizada a 480 nm e os dados foram expressos em Unidades de SOD por miligrama de proteína ( $U_{SOD}/\text{mg}$  proteína) (Misra & Fridovich, 1972) <sup>[87]</sup>. As GSTs, catalisadoras de reações de conjugação de glutathiona reduzida (GSH) com diversos xenobióticos, são ativas com o composto 1-cloro-2,4-dinitro benzeno (CDNB). O ensaio realizado foi baseado na capacidade da GST de combinar o CDNB com a GSH, formando 2,4-dinitro-fenil-glutathiona (DNP-SG), um composto corado. A formação do DNP-SG foi avaliada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm durante 1 minuto e os resultados foram expressos em µmoles/minuto/mg de proteína (Mannervik & Gluthemberg, 1981) <sup>[88]</sup>.

### 3.10 Análise Estatística

Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e desvio padrão. A comparação dos grupos foi realizada pelo procedimento de análise de variáveis de medidas repetidas ou de acordo com o modelo experimental por ANOVA ONEWAY. A localização de diferença foi executada pelo procedimento de Tuckey, considerado com significância estatística o  $p < 0,05$ . Para análise de correlação foi utilizado o teste de Pearson (chi-square) com significância estatística de  $p < 0,05$ . Todos os dados analisados com o programa SPSS versão 17.0.

## 4. Resultados

O peso final dos animais é demonstrado na Figura 6. Foi observada diferença significativa no peso final dos animais dos grupos DEN, DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> em relação aos grupos controles, indicando que os animais que receberam administração intraperitoneal de dietilnitrosamina obtiveram peso menor em comparação aos animais controles. Não houve variação na ingesta de melatonina na água de beber em mg/kg/dia entre os grupos (CO + MLT =  $1,46 \pm 0,17$ ; DEN + MLT<sub>5</sub> =  $1,59 \pm 0,17$  e DEN + MLT<sub>12</sub> =  $1,63 \pm 0,26$ ).



**Figura 6.** Valores médios do Peso Final dos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). A notação \* indica diferença significativa em relação aos grupos controles ( $P < 0,05$ ).



Foram analisadas as enzimas de integridade hepática, conforme mostrado na Tabela 2. Em relação à AST, o grupo DEN apresentou níveis aumentados significativamente em relação aos grupos controles e o grupo DEN + MLT<sub>12</sub> apresentou níveis diminuídos significativamente em relação ao grupo DEN. Em relação à ALT, não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação à FA, o grupo DEN apresentou níveis aumentados significativamente em relação aos grupos controles, mas nenhuma diferença foi observada nos grupos tratados. Em relação à  $\gamma$ GT, os grupos DEN, DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> apresentaram níveis aumentados significativamente em relação aos grupos controles, e o grupo DEN + MLT<sub>12</sub> apresentou níveis diminuídos significativamente em relação ao grupo DEN.

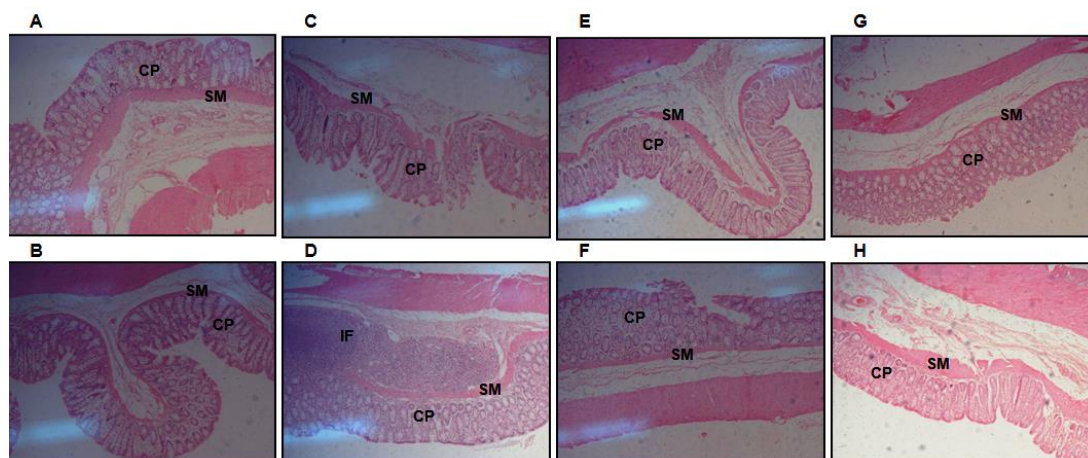
Enzimas (U/L)	Grupos Experimentais				
	CO	CO + MLT	DEN	DEN + MLT <sub>5</sub>	DEN + MLT <sub>12</sub>
<b>AST</b>	134,6 ± 11,7	107,5 ± 7,78	235 ± 71 *	165,5 ± 59,47	143,28 ± 27,9 #
<b>ALT</b>	68,4 ± 14,6	54 ± 15,5	124,2 ± 39,8	102 ± 36,8	95,8 ± 18,8
<b>FA</b>	127,8 ± 59,2	111,5 ± 50,2	316 ± 98,97 *	215,3 ± 98,7	212,5 ± 46,58
<b><math>\gamma</math>GT</b>	0,6 ± 0,89	0,0 ± 0,0	49,75 ± 9 *	28,57 ± 16,92 *	25, ± 14,54 # *

**Tabela 2.** Valores médios das enzimas plasmáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase ( $\gamma$ GT) dos diferentes grupos. Os resultados acima são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM), A notação \* indica diferença significativa em relação aos grupos controles e a notação # indica diferença significativa em relação ao grupo DEN. P<0,05 (teste *post hoc* de Tukey).

Os índices de dano histológicos na avaliação do intestino dos diferentes grupos estudados estão apresentados na Tabela 3. Houve aumento significativo no índice de dano dos animais do grupo DEN em relação aos grupos controles e diminuição significativa dos grupos DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN. Foi observado um infiltrado inflamatório, destruição das criptas e da submucosa nos animais submetidos à dietilnitrosamina, conforme Figura 7, e o tratamento com melatonina atenuou estas alterações.

Grupos Experimentais	CO	CO + MLT	DEN	DEN + MLT <sub>5</sub>	DEN + MLT <sub>12</sub>
Índice de Dano	0 ± 0	0 ± 0	2,25 ± 0,5 *	# 1 ± 0,756	# 1 ± 0,632

**Tabela 3.** Valores médios dos índices de dano microscópicos no tecido intestinal de ratos. Os resultados acima são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM), A notação \* indica diferença significativa em relação aos grupos controles e a notação # indica diferença significativa em relação ao grupo DEN. P<0,05 (teste *post hoc* de Tukey).



**Figura 7.** Avaliação histopatológica dos intestinos de rato dos diferentes grupos experimentais (coloração H&E x100). (A) e (B) grupo controle (CO), (C) e (D) grupo dietilnitrosamina (DEN), (E) e (F) grupo de tratamento com melatonina a partir da 5ª semana (DEN +MLT<sub>5</sub>) e (G) e (H) grupo de tratamento com melatonina a partir da 12ª semana (DEN +MLT<sub>12</sub>).

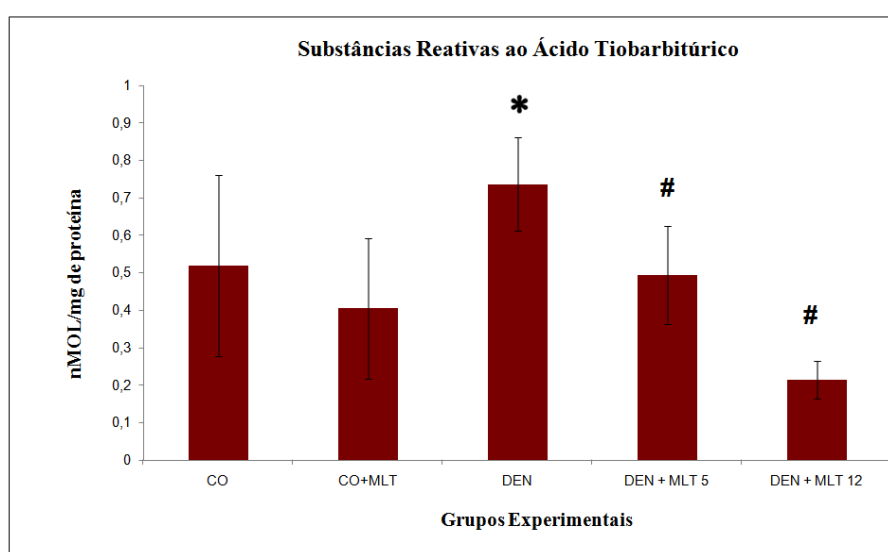
**Legenda:** criptas (CP), submucosa (SM) e infiltrado inflamatório (IF).

O ensaio cometa detecta danos de DNA em células eucarióticas, e foi utilizado para avaliar as células do intestino. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4, o índice de dano (ID) nas células intestinais e a frequência de dano (FD) não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Grupos	Índice de Dano	Frequência de Dano
CO	217 ± 23,4	78,3 ± 17,5
CO + MLT	272,5 ± 0,7	85 ± 1,4
DEN	276 ± 64,9	93 ± 6,7
DEN + MLT <sub>5</sub>	302 ± 65,7	89,8 ± 13,4
DEN + MLT <sub>12</sub>	264,1 ± 89,3	84,3 ± 84,2

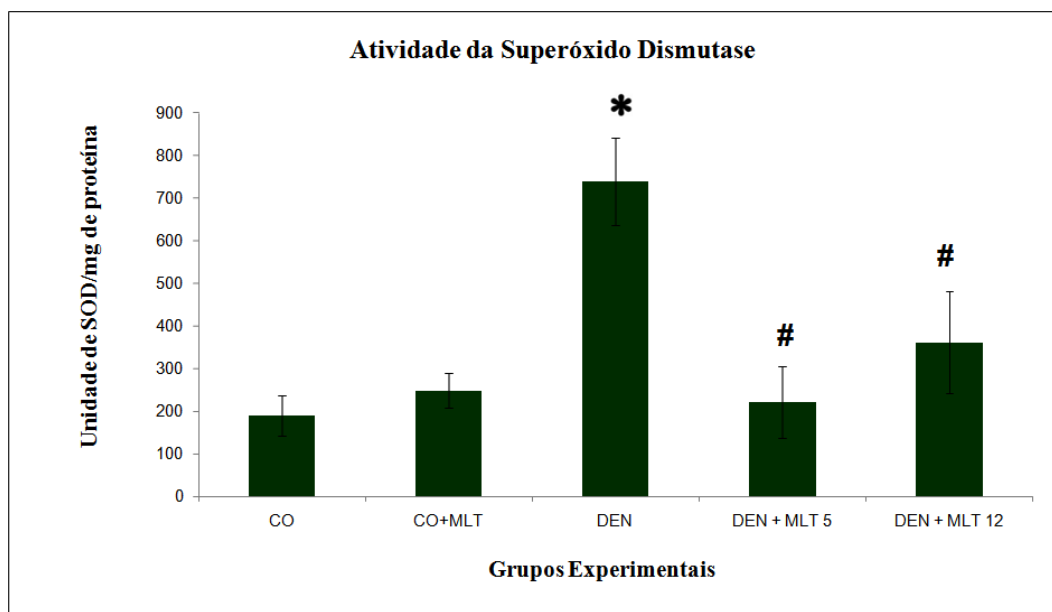
**Tabela 4.** Resultados do Ensaio Cometa no intestino dos diferentes grupos. Os valores acima são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM). Índice de Dano: 0 (sem dano, 100 células x 0) a 400 (com dano máximo, 100 células x 4); Frequência de Dano (%): cálculo baseado no número de células com cauda *versus* o número de células sem cauda.  $P > 0,05$  (teste *post hoc* de Tukey).

Os valores de lipoperoxidação no tecido intestinal, mostrados na Figura 8, avaliados pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, demonstraram aumento significativo do grupo DEN em relação aos grupos controles e diminuição significativa dos grupos DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN, observando-se redução da lipoperoxidação intestinal nesses animais submetidos à administração do antioxidante melatonina.



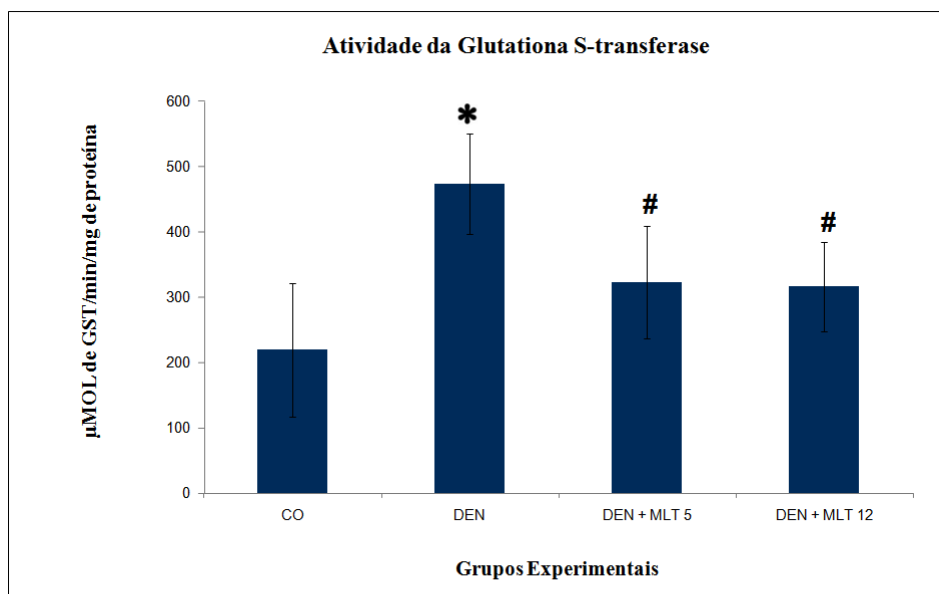
**Figura 8.** Efeito da melatonina sobre as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizados de intestino de rato. Os valores são expressos como a média ± desvio padrão da média (DPM) de experimento feito em duplicata. Foi observada uma diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos controles (notação \*) e uma diferença significativa dos grupos DEN+MLT<sub>5</sub> e DEN+MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN (notação #).  $P < 0,05$  (teste *post hoc* de Tukey).

Os resultados da atividade da enzima SOD em homogeneizado de intestino são apresentados na Figura 9. Houve aumento significativo da atividade da SOD nos animais do grupo DEN em relação aos grupos controles e redução significativa da atividade enzimática nos animais dos grupos DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN, sendo que no grupo DEN + MLT<sub>5</sub>, a atividade da enzima retorna aos valores dos grupos controles; evidenciando o efeito do tratamento com melatonina na redução da atividade enzimática da SOD.



**Figura 9.** Efeito da melatonina sobre os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) em homogeneizados de intestino de rato. Os valores são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) de experimento feito em duplicata. Foi observada uma diferença significativa do grupo DEN em relação aos grupos controles (notação \*) e uma diferença significativa dos grupos DEN+MLT<sub>5</sub> e DEN+MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN (notação #).  $P < 0,05$  (teste *post hoc* de Tukey).

Os valores da atividade da enzima GST em homogeneizado de intestino de ratos são ilustrados na Figura 10. A GST apresentou atividade significativamente aumentada nos animais do grupo DEN em relação ao grupo controle e significativamente diminuída nos animais do grupo DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN, mostrando o efeito do tratamento com melatonina também na redução da atividade enzimática da GST. Não foram mostrados os dados do grupo CO + MLT por não haver amostra suficiente para realizar o experimento.



**Figura 10.** Efeito da melatonina sobre os níveis da enzima glutathiona S-transferase (GST) em homogeneizados de intestino de rato. Os valores são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) do experimento. Foi observada uma diferença significativa do grupo DEN em relação ao grupo controle (notação \*) e uma diferença significativa dos grupos DEN+MLT<sub>5</sub> e DEN+MLT<sub>12</sub> em relação ao grupo DEN (notação #).  $P < 0,05$  (teste *post hoc* de Tukey).

Foram realizadas correlações entre o grau histológico de lesão observado no intestino (0 – Normal, 1 – Leve, 2 – Moderado e 3 – Grave) e valores dos níveis de TBARS, SOD e GST. Todas as relações foram diretamente proporcionais com significância estatística, sendo  $p < 0,05$ , conforme mostra a Tabela 5.

Correlação	r	R square	Nível de Significância
Grau histológico vs. TBARS	0,429	0,184	0,046
Grau histológico vs. SOD	0,627	0,393	0,001
Grau histológico vs. GST	0,462	0,213	0,035

**Tabela 5.** Correlação entre o grau microscópico (0, 1, 2 e 3) e os valores obtidos de TBARS, SOD e GST. Teste de Pearson (chi-square).  $P < 0,05$  é considerado com significância estatística.

## 5. Discussão

No presente estudo, os animais foram expostos ao carcinógeno dietilnitrosamina por um período crônico e intermitente, nomeados grupos DEN, DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub>. Essa exposição provocou diminuição de peso desses animais em comparação aos animais controles, que não foram expostos, e não se observou ação da MLT sobre o peso (Figura 6).

As enzimas AST, FA e  $\gamma$ GT séricas, marcadores de lesão hepática, estão aumentadas nos animais expostos à dietilnitrosamina, o que demonstra nitidamente as alterações hepáticas provocadas pelo agente carcinogênico. A enzima  $\gamma$ GT, por sua vez, obteve aumento também nos animais submetidos à administração da melatonina dos grupos DEN + MLT<sub>5</sub> e DEN + MLT<sub>12</sub>. A administração da melatonina a partir da décima segunda semana foi capaz de reverter os valores da AST, para os valores dos animais controles, e de diminuir os valores da  $\gamma$ GT em relação ao grupo não tratado, mas não o suficiente para os valores dos animais controles. Essas análises mostram que a MLT, pelo seu potencial antioxidante, apresenta uma ação hepatoprotetora (Tabela 2). Um estudo de Tieppo *et al.*, 2007, utilizando o antioxidante quercetina, demonstrou que ela reverteu a lesão hepática e diminuiu os níveis das enzimas de integridade hepática em ratos, semelhante aos nossos achados <sup>[89]</sup>. Oliveira *et al.*, 2014 também observou a ação da quercetina nessas enzimas no modelo de lesão hepática induzida por bifenilas policloradas e apresentou resultados semelhantes aos nossos <sup>[90]</sup>.

Os danos ao DNA são característicos em um tecido submetido ao estresse oxidativo. De acordo com a avaliação de ensaio cometa, nenhuma alteração foi revelada nas células do intestino, seja no índice ou na frequência de dano no nosso estudo. É importante mencionar que o trato gastrointestinal de vertebrados é uma fonte rica de melatonina extrapineal (Kolli *et al.*, 2012) <sup>[91]</sup>. Trivedi *et al.*, 2013 encontrou aumento de dano ao DNA em colon de camundongos num modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio e diminuição desse dano nos animais tratados com melatonina <sup>[92]</sup>.

A avaliação microscópica do intestino desses animais revelou aumento do processo inflamatório nos animais expostos ao carcinógeno, evidenciando sua capacidade de causar danos no trato gastrointestinal. Hartmann *et al.*, 2012 também observou inflamação no modelo químico por ácido acético, mimetizando o estado de

colite <sup>[93]</sup>. O uso de melatonina a partir da quinta e da décima segunda semana fez com que os valores do escore inflamatório diminuíssem. Assim, pode-se sugerir que a melatonina atenuou o processo inflamatório, na preservação das criptas, quando administrada nos períodos citados anteriormente (Tabela 3 e Figura 7). Num estudo realizado por Tahan *et al.*, 2010, foi observado que o uso da melatonina reduziu os escores de lesão microscópica do intestino de ratos submetidos ao modelo de colite induzida por ácido acético e também reduziu as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  <sup>[94]</sup>. Fillmann *et al.*, 2007 obtiveram resultados similares com o uso da glutamina no mesmo modelo <sup>[95]</sup>.

Na avaliação da LPO, foi observado aumento de 59,46% das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no intestino dos animais expostos à DEN em relação aos animais controles e sugere-se que esse processo esteja relacionado ao aumento do estresse oxidativo no tecido. Em animais tratados com MLT, observaram-se valores de TBARS similares aos dos animais controles, o que reforça o seu potencial antioxidante (Figura 8). Os animais tratados a partir da décima segunda semana apresentaram uma redução acentuada de TBARS em relação àqueles tratados a partir da quinta semana, que se pode explicar pelo fato de que o tratamento a partir da 12ª semana, após a instalação da doença, é mais efetivo. Em um estudo anterior de Fillmann *et al.*, 2007, o uso da glutamina foi capaz de atenuar o dano oxidativo num modelo experimental de colite induzida por ácido acético <sup>[95]</sup> e também no modelo experimental de colite induzida por ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico, conforme estudo de Kretzmann *et al.*, 2008 <sup>[96]</sup>.

As células possuem um sistema enzimático de defesa antioxidante, que inativa as espécies oxidantes em moléculas não-tóxicas, para proteger o organismo dos efeitos do estresse oxidativo (Formica & Regelson 1995), no qual a enzima superóxido dismutase representa a primeira linha de defesa celular (Santiard, Ribiere *et al.*, 1995) <sup>[97][98]</sup>. Neste estudo, observou-se aumento de 237,36 % da atividade da enzima SOD no intestino do grupo com exposição crônica à DEN em relação aos grupos controles. Os animais que receberam tratamento com melatonina, tanto a partir da quinta semana quanto a partir da décima segunda semana, mantiveram os valores da atividade da enzima SOD próximos aos valores dos grupos controles (Figura 9). Os animais tratados a partir da quinta semana, por sua vez, apresentaram uma redução da atividade da SOD em relação àqueles tratados a partir da décima segunda semana possivelmente pela mobilização das defesas endógenas ser mais

intensa no tratamento tardio, quando a doença já está instalada. O tratamento precoce de MLT é capaz de estabilizar parcialmente esses efeitos, sem a necessidade de mobilizar as defesas com a mesma intensidade. Hartmann *et al.*, 2012 também observaram aumento na atividade da SOD em intestino de ratos no modelo de colite experimental induzida por ácido acético e diminuição na atividade dessa enzima em animais tratados com extrato aquoso de *Boswellia serrata* <sup>[93]</sup>.

A formação de conjugados com a glutathione, catalisada pela GST, é a principal reação observada para os xenobióticos, indicando que o mecanismo de detoxificação pela glutathione representa uma adaptação biológica fundamental (Oktyabrsky e Smirnova, 2007) <sup>[99]</sup>. Foi observado, neste trabalho, aumento significativo de 115,68% da atividade da GST no intestino do grupo submetido à exposição de DEN, possivelmente pela função detoxificante da enzima, que teve sua atividade estimulada pela presença do xenobiótico. Nos grupos de animais tratados com MLT a partir da quinta e da décima segunda semana, a atividade da GST diminuiu, equiparando-se à atividade enzimática dos grupos controles, o que confirma a atuação da melatonina como antioxidante (Figura 10). Num trabalho realizado por Kolli *et al.*, 2012, a glutathione S-transferase apresentou atividade diminuída em intestino de ratos submetidos à exposição de metotrexato, diferentemente dos nossos achados, e a melatonina não mostrou efeito na atividade dessa enzima <sup>[91]</sup>.

As correlações observadas entre o grau histológico e os parâmetros oxidativos, mostradas na Tabela 5, nos permite sugerir que lesões inflamatórias mais intensas geram mais LPO e mais atividade de SOD e GST. Esses resultados sugerem que a MLT atua como antioxidante exógeno e assim diminui a sobrecarga sobre o sistema antioxidante enzimático.

A produção de radicais livres e os subsequentes danos microscópicos foram aumentados no intestino pela injeção de DEN ip, como mostrado pelo TBARS e pela histologia. Estudos têm mostrado que a melatonina e os seus metabólitos são potentes antioxidantes <sup>[91][92][94]</sup>. No presente estudo, em adição aos efeitos antioxidantes, foram observados efeitos anti-inflamatórios e esses achados estão de acordo com estudos anteriores citados. A suplementação com melatonina como uma terapia coadjuvante pode ser promissora na atenuação dos efeitos gastrointestinais do estresse oxidativo, porém, a melatonina pode atuar como um pró-oxidante em altas concentrações, embora doses farmacológicas não sejam tóxicas aos humanos



(Kadoma *et al.*,2011; Reiter *et al.*,1995) <sup>[100]</sup> <sup>[101]</sup> . Assim, pode-se sugerir que a melatonina, a partir dos resultados obtidos envolvendo a patogênese da doença inflamatória intestinal, seja um agente terapêutico para intervenção e melhora dos danos teciduais e sistêmicos.

#### IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com os dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- ❖ os níveis séricos das enzimas AST e  $\gamma$ GT, relacionadas à integridade e à função hepática, aumentaram em ratos submetidos à exposição de dietilnitrosamina e a administração de melatonina fez com que esses níveis diminuíssem nos animais tratados a partir da décima segunda semana;
- ❖ nos aspectos histológicos do intestino, o processo inflamatório, desenvolvido pelos animais expostos à DEN, foi atenuado mediante o uso da melatonina;
- ❖ o dano sobre os lipídios das membranas e os valores das enzimas antioxidantes SOD e GST no tecido intestinal aumentaram em ratos expostos à dietilnitrosamina, resultado observado pela elevação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e avaliação de atividades enzimáticas. A MLT reverteu esse dano e manteve os valores das enzimas SOD e GST similares aos dos animais dos grupos controles, tanto no tratamento precoce quanto no tratamento tardio;

A melatonina revelou seu potencial hepatoprotetor e também anti-inflamatório e antioxidante no intestino de ratos submetidos à exposição de DEN, observados pelos dados histológicos, que demonstraram diminuição do índice microscópico de dano inflamatório, e pelas análises oxidativas, que demonstraram redução da lipoperoxidação e aumento das atividades enzimáticas. Como perspectivas, serão realizadas a avaliação de outras enzimas antioxidantes e a quantificação de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e iNOS, pela técnica de *Western Blot*, para avaliar melhor o processo inflamatório intestinal.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haydon, G.H.; Jarvis, L.M.; Simmonds, P.; Harrison, D.J.; Garden, O.J.; Hayes, P.C. Association between chronic hepatitis C infection and hepatocarcinoma in a Scottish population. *Gut* 1997, 40:128-32.
2. Brechot, C. Molecular mechanisms of hepatitis B and C viruses related to liver carcinogenesis. *Hepatology* 1998; 45:1189-96.
3. Conte, V.P. Hepatocellular carcinoma. Part 1. General considerations and diagnosis. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(1):58-68.
4. De Mitri, M.S.; Poussin, K.; Baccarini, P.; Pontisso, P.; D'Errico, A.; Simon, N.; Grigioni, W.; Alberti, A.; Beaugrand, M.; Pisi, E. HVC-associated liver cancer without cirrhosis. *Lancet* 1995; 345:413-5.
5. Cervello, M.; Montalto, G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, v. 12, n. 32, p. 5113-21, Aug 2006. ISSN 1007-9327.
6. MacIntosh, E.L.; Minuk, G.Y. Hepatic resection in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Surg Gynecol Obstet*, 1992; 174:245-54.
7. Brandão, A.B. & Marroni, C.A. 2001. Testes de Função Hepática. In: Mattos, A.A. & W. Dantas. *Compêndio de Hepatologia*. São Paulo: Fundação BYK.
8. Fan, S.T.; Ng, I.O. et al. 1999. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: the surgeon's role in long-term survival. *Arch Surg* 134(10): 1124-30.
9. Tate, S.S.; Meister, A. 1985. Gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. *Meth Enzymol*. 113: 400-419.
10. Siest, G.; Courtay, C.; Oster, T.; Michelet, F.; Visvikis, A.; Diederich, M.; Wellman, M. 1992. Gamma-glutamyltransferase: nucleotide sequence of the human pancreatic cDNA. Evidence for a ubiquitous gamma glutamyltransferase polypeptide in human tissues. *Biochem. Pharmacol.* 43 (12): 2527-2533
11. Fouts, D.E.; Torralba, M.; Nelson, K.E.; Brenner, D.A.; Schnabl, B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 2012; 56:1283-1292.
12. Purohit, V.; Bode, J.C.; Bode, C. et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol*. 2008; 42(5):349-361.

13. Yu, L.X.; Yan, H.X.; Liu, Q.; Yang, W.; Wu, H.P.; Dong, W. et al. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology* 2010;52 (4):1322–1333.
14. Zhang, H.L.; Yu, L.X.; Yang, W.; Tang, L.; Lin, Y.; Wu, H.; et al. Profound impact of gut homeostasis on chemically-induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats. *Journal of Hepatology*. 2012; vol. 57, 803–812.
15. Nolan, J.P. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history. *Hepatology*. 2010; 52(5):1829-1835.
16. Grisham, M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*; vol. 344, p. 859-861, 1994.
17. Lanna, C.C.D.; Ferrari, M.L.A.; Carvalho, M.A.P. et al. Manifestações articulares em pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa. *Rev. Bras. Reumat.*, vol. 46, p. 45-51, 2006.
18. Kandhare, A.D.; Raygude, K.S.; Ghosh, P.; Ghule, A.E.; Gosavi, T.P.; Badole, S.L.; Bodhankar, S.L. Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. Leaves in experimental colitis in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*. vol. 2(5), p. 337-44, 2012.
19. Behera, J.P.; Mohanty, B.; Ramani, Y.R.; Rath, B.; Pradhan, S. Effect of aqueous extract of *Aegle marmelos* unripe fruit on inflammatory bowel disease. *Indian J Pharmacol*. vol. 44(5), p. 614-618, 2012
20. Lijinsky, W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. *Cambridge: Cambridge University Press*; 1992. Cambridge Monographs on Cancer Research.
21. Wang, Z.Y. et al. Protection against benzo[a]pyrene- and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis*, vol. 13, n. 8, p. 1491-4, Aug 1992. ISSN 0143-3334.
22. Verna, L.; Whysner, J.; Williams, G.M. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther*, vol. 71, n. 1-2, p. 57-81, 1996.
23. Qi, Y. et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, vol. 122, n. 12, p. 2682-8, Jun 2008. ISSN 1097-0215.

24. Heindryckx, F.; Colle, I.; Van Vlierberghe, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*, vol. 90, n. 4, p. 367-86, Aug 2009. ISSN 1365-2613.
25. Southorn, P.A.; Powis, G. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988b; 63:390-408.
26. Peres, W. Radicais livres em níveis biológicos. Pelotas: Educat, 1994.
27. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. *New York: Oxford*, 1999.
28. Maxwell, S.R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*. vol. 49, p. 345 – 361, 1995
29. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Clarendon Press*, 1989.
30. Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74:139-62.
31. Del Maestro, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980; 492:153-68.
32. Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(6): L1005-28.
33. Ward, R.J.; Peters, T.J. Free Radicals. In: Marshall, W.J.; Bangert, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. New York: Churchill Livingstone*, p. 765-777, 1995
34. Sies, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H., ed. *Oxidative Stress. London: Academic Press*. 1985
35. Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001; 18(9):685-716.
36. Favier, A.E. et al. Analysis of free radicals in biological systems. *Boston: Birkhäuser*, 1995.
37. Marroni, N.P.; Morgan-Martins, M.I.; Porawski, M. Radicais Livres no processo saúde-doença: da bancada à clínica.
38. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M.; Hocevar, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, vol. 38, n. 1, p. 96-109, Jan 2010. ISSN 1533-1601.

39. Schneider, C.; Oliveira, A. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*, Vol. 10, Nº 4, 308-313 – Jul/Ago, 2004.
40. Jenkins, R.R. Free radical chemistry relationship to exercise. *Sports Med* 1988;5:156-170
41. Travacio, M.; Llesuy, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions.
42. Koul, A.; Bhatia, V.; Bansal, M.P. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. *BMC Biochem*, vol. 2, p. 14, 2001. ISSN 1471-2091.
43. Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I.R.; Glutathione transferases; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005, 45, 51-88.
44. Danielson, U.H.; Mannervik, B.; Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat; *Biochem. J.* 1985, 231, 263-7.
45. Keen, J.H.; Jakoby, W.B. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.* 1978, 253, 5654-7.
46. Armstrong, R.N. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases; *Chem. Res. Toxicol.* 1997, 10, 2-18.
47. Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V.W.; Dowd, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily; *Biochem. J.* 2001, 360, 1-16.
48. Knox, W.E.; Edwards, S.W. The properties of maleylacetoacetate, the initial product of homogentisate oxidation in liver; *J. Biol. Chem.* 1955, 216, 489-98.
49. Johansson, A.S.; Mannervik, B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones; *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 33061-5.
50. Marnett, L.J.; Riggins, J.N.; West, J.D.; Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein; *J. Clin. Invest.* 2003, 111:583-93.
51. Hurst, R.; Bao, Y.; Jemth, P.; Mannervik, B.; Williamson, G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases; *Biochem. J.* 1998, 332:97-100.

52. Prabhu, K.S.; Reddy, P.V.; Jones, E.C.; Liken, A.D.; Reddy, C.C. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004, 424:72-80.
53. Hayes, J.D.; Pulford, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30:445-600.
54. Huber, B.; Almeida, W. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova*, vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008
55. Moreira, A.J. et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*, vol. 68, n. 10, p. 1939-46, Nov 15 2004. ISSN 0006-2952.
56. Vitaglione, P. et al. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 4, n. 7-8, p. 575-86, 2004. ISSN 1040-8398.
57. Pereira-Filho, G. et al. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol*, vol. 45, n. 2, p. 156-62, Apr-Jun 2008. ISSN 0004-2803.
58. Tieppo, J. et al. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr*, vol. 139, n. 7, p. 1339-46, Jul 2009.
59. Da Rosa, D.P. et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de Gastroenterologia*, vol. 47, 2010.
60. Fevre-Montange, M. Melatonin. *Presse Med*, vol. 14, n. 31, p. 1659-63, Sep 21 1985.
61. Arendt, J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. *London: Chapman & Hall*, 1995.
62. Reiter, R.J.; Tan, D.X. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci*, vol. 957, p. 341-4, May 2002. ISSN 0077-8923.
63. Reiter, R. et al. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet*, vol. 97, p. 211-30, 2007. ISSN 0084-2230.
64. Reiter, R.J. et al. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*, Oct 2013. ISSN 1460-2369.

65. Beyer, C.E.; Steketee, J.D.; Saphier, D. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, vol. 56, n. 10, p. 1265-72, Nov 1998. ISSN 0006-2952.
66. Reiter, R. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*, vol. 34, n. 2, p. 237-56, 2001. ISSN 1085-9195.
67. Mauriz, J.L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*, May 2012. ISSN 1600-079X.
68. Carbajo-Pescador, S. et al. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer*, vol. 109, n. 1, p. 83-91, Jul 2013. ISSN 1532-1827.
69. Cuzzocrea, S.; Reiter, R.J. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem*, vol. 2, n. 2, p. 153-65, Feb 2002. ISSN 1568-0266.
70. Tripathi, D.N.; Jena, G.B. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *J Pineal Res*, vol. 48, n. 4, p. 324-31, May 2010. ISSN 1600-079X.
71. Acuna-Castroviejo, D. et al. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci*, vol. 12, p. 947-63, 2007.
72. Sainz, R.M. et al. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, vol. 60, n. 7, p. 1407-26, Jul 2003. ISSN 1420-682X.
73. Tham, D.M.; Whitin, J.C.; Cohen, H.J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatric Research*, vol.51, p.641-646, 2002.
74. Panés, J. & Granger, D.N. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*, vol.114, p.1066-1090, 1998.
75. Reiter, R.J. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int*, 1995; 27:453-460.



76. Tan, D.X.; Reiter, R.J.; Manchester, L.C. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:181–188.
77. Bubenik, G.A.; Blask, D.E.; Brown, G.M. et al. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals Recept*, 1998; 7:195–219.
78. Bubenik, G.A.; Dhanvantari, S. Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal motility. *J Pineal Res.* 1989; 7:333–344.
79. Harlow, H.J.; Weekley, B.L. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *J Pineal Res.* 1986; 3:277–284.
80. Molpeceres, V.; Mauriz, J.L.; García-Mediavilla, M.V.; González, P.; Barrio, J.P.; González-Gallego, J. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007 Jul;62(7):687-95.
81. Sandborn, W.J. Cyclosporine therapy for inflammatory bowel disease: definitive answers and remaining questions. *Gastroenterology*, vol.1093, p.1001-1003, 1995.
82. Speit, G.; Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 1999; 113:203-12.
83. Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.C.; Sasaki, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35(3):206-21.
84. Llesuy, S.F.; Milei, J.; Molina, H.; Boveris, A.; Milei, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985 Jun 30; 71(3):241-9.
85. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7; 72:248-54.
86. Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-10.
87. Misra, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972 May 25; 247(10):3170-5.

88. Mannervik, B.; Guthenberg, C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol.* 1981; 77:231-5.
89. Tieppo, J.; Verdelino, R.; Dias, A.S.; Silva Vaz, M.F.; Silveira, T.R.; Marroni, C.A.; Marroni, N.P.; Henriques, J.A.; Picada, J.N. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jul; 45(7):1140-6.
90. Oliveira, C.R.; Ceolin, J.; Oliveira, R.R.; Schemitt, E.G.; Colares, J.R.; Bauermann, L.F.; Costabeber, I.H.; Morgan-Martins, M.I.; Mauriz, J.L.; Marroni, N.P. Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats. *Nutr Hosp.* 2014; 29(5): 1141-1148.
91. Kolli, V.K.; Abraham, P.; Isaac, B.; Kasthuri, N. Preclinical efficacy of melatonin to reduce methotrexate-induced oxidative stress and small intestinal damage in rats. *Dig Dis Sci.* 2013 Apr; 58(4):959-69.
92. Trivedi, P.P.; Jena, G.B. Melatonin reduces ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mice: investigation on possible mechanisms. *Dig Dis Sci.* 2013 Dec; 58(12):3460-74.
93. Hartmann, R.M.; Morgan-Martins, M.I.; Tieppo, J.; Fillmann, H.S.; Marroni, N.P. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Dig Dis Sci.* 2012 Aug; 57(8):2038-44.
94. Tahan, G.; Gramignoli, R.; Marongiu, F.; Aktolga, S.; Cetinkaya, A.; Tahan, V.; Dorko, K. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2011 Mar; 56(3):715-20.
95. Fillmann, H.S.; Kretzmann, N.A.; San-Miguel, B.; Llesuy, S.; Marroni, N.P.; González-Gallego, J.; Tuñón, M.J. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology.* 2007 Jul 17; 236(3):217-26.
96. Kretzmann, N.A.; Fillmann, H.S.; Mauriz, J.L.; Marroni, C.A.; Marroni, N.P.; González-Gallego, J.; Tuñón, M.J. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Nov; 14(11):1504-13.
97. Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995 Dec; 33(12):1061-80.

98. Santiard, D.; Ribière, C.; Nordmann, R.; Houee-Levin, C. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by free radicals derived from ethanol metabolism: a gamma radiolysis study. *Free Radic Biol Med.* 1995 Jul; 19(1):121-7.
99. Oktyabrsky, O.N.; Smirnova, G.V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Feb; 72(2):132-45.
100. Kadoma, Y.; Fujisawa, S. Radical-scavenging activity of melatonin, either alone or in combination with vitamin E, ascorbate or 2-mercaptoethanol as co-antioxidants, using the induction period method. *In Vivo.* 2011 Jan-Feb; 25(1):49-53.
101. Reiter, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995 Apr; 9(7):526-33.