

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

SILVIA BONA

**MELATONINA PROTEGE O FÍGADO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
CIRROSE**

Porto Alegre

2014

SILVIA BONA

**MELATONINA PROTEGE O FÍGADO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
CIRROSE**

Orientadora: Dra. Norma Possa Marroni

*Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor.*

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho à minha família:

*A minha **filha**, Julia Bona Ferreira, a qual tanto amo. Obrigada minha filha.
Você surgiu em meio a esta trajetória e iluminou minha vida.*

*Ao meu **marido**, Jader Finkler Ferreira, agradeço pela luz constante em
minha vida.*

*Aos meus pais, em especial minha mãe Teresinha Taffarel Bona, que mesmo
distante com suas orações e pensamento positivo me guiaram nesta caminhada.*

*Aos meus irmãos, Alexandre, Eleandro, Adroir, Cassiana e Paula, obrigada.
Sei que posso contar com vocês.*

*As minhas queridas sobrinhas: Nicolý e Caroline, pelos momentos alegres em
família.*

*Enfim, dedico a toda minha família, de antes e depois do casamento, pois
todos vocês representam um pouco da minha história e um pouco do que sou.*

AGRADECIMENTOS

Depois de muitos protocolos, manchas, asteriscos, artigos e horas no laboratório chega a hora de escrever a tese e de praxe os agradecimentos. Conseqüentemente, surge a percepção que um dos pontos mais valiosos da tese de doutorado são todos aqueles que de uma forma ou de outra estiveram juntos nesta jornada, ajudando no crescimento científico e pessoal. E constatar que a amizade nos faz sentir queridos, respeitados e valorizados. Aumenta nossa autoestima e nos leva a acreditar que somos capazes sim de progredir. É um vínculo que precisamos cultivar com todo carinho. Espero ter vocês sempre em minha vida.

Portanto, eu gostaria de agradecer:

A minha querida orientadora, Profa Dra Norma Possa Marroni, pela orientação, dedicação e ensinamentos e, principalmente, pela acolhida e amizade mantida desde a iniciação científica. Obrigada também pela paciência e compreensão nas vezes em que necessitei me afastar para cumprir meu papel de mãe. É exemplo de vida, de vida com alegria.

Ao Dr. Claudio Marroni, sou grata ao seu apoio e dedicação e também às suas críticas e sugestões que contribuíram para o enriquecimento científico deste trabalho.

A minha amiga, agora já Doutora, Graziella Rodrigues, companheira de longa data. Muitas vezes rimos e choramos juntas. Sempre prestativa e solidária, obrigada por me ajudar em mais essa caminhada.

A minha amiga, Andrea Janz Moreira, pessoa admirável, batalhadora e perseguidora de conhecimento. Obrigada pelo teu apoio, confiança e minha defensora em diversas situações que surgiram durante o período do doutorado.

Às amigas e colegas do Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo da ULBRA, em especial, Francielli Licks, Renata Minuzzo, Elizângela Schemitt, Jozielli Raskopf (Manu), Adriane Dal Bosco, Larisse Longo, Leila Fratta e Giovana Weber. Agradeço a ajuda e a dedicação disponibilizada sempre que

precisei, e principalmente agradeço por tornarem o local de trabalho um lugar de amizade, carinho e de harmonia.

Aos professores do Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo da ULBRA, à Dra. Marilene Porawski, Dr. Henrique Fillmann, Dr. Alexandre Simões Dias, Dra. Themis Reverbel da Silveira, Dr. Jorge Santos e Dra. Maria Isabel Morgan-Martins.

Aos alunos de iniciação científica que estiveram vinculados e participaram deste projeto, Mariel Barbachan e Silva, Mariana Oliveira, Matheus Amaral Vieceli e Maíra Moraes.

Ao prestativo Rafael Melo, meu anjo da guarda, que em um momento desesperador salvou-me.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sempre prestativos ao serem solicitados, meu carinho e reconhecimento.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, em especial a Vera Susana Vargas Ribeiro, sempre prestativa e comprometida com o bom funcionamento e a qualidade do pós-graduação, meu reconhecimento, afeto e amizade.

Finalmente, o agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) pelo financiamento do projeto.

RESUMO

Base teórica: As doenças hepáticas representam um grande problema de saúde pública, sendo responsáveis por um considerável número de atendimentos e internações hospitalares, com crescente índice de mortalidade. A melatonina (MLT), uma potente molécula antioxidante, tem-se mostrado benéfica em diversas situações patológicas, incluindo as hepáticas. **Objetivo:** O objetivo foi avaliar os efeitos da MLT na cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos machos *Wistar*. **Métodos:** Utilizaram-se 20 ratos machos *Wistar*, (230-250g), divididos em 4 grupos: I: Controle (CO), II: CO+MLT, III: CCl₄ e IV: CCl₄+MLT. O CCl₄ foi administrado i.p.: 10 aplicações de 5 em 5 dias, 10 aplicações de 4 em 4 dias, e 7 aplicações de 3 em 3 dias. A MLT (20mg/Kg i.p.) iniciada na 10^a semana, perdurando até o final do experimento na 16^a semana. **Resultados:** Como resultados apresentados nos dois artigos, observamos que a MLT no grupo CCl₄+MLT, em relação ao grupo CCl₄, diminuiu os níveis séricos das enzimas AST, ALT e FA. Na avaliação do estresse oxidativo, diminuiu a LPO avaliada por TBARS e F2-isoprostanos; aumentou a atividade da enzima antioxidante (SOD) e diminuiu a expressão da NQO1; aumentou a expressão do fator de transcrição Nrf2 e diminuiu a expressão de seu inibidor o Keap1. Na avaliação do estresse do RE, diminuiu a expressão de proteínas preditoras de estresse do RE, GRP78 e ATF6. Na avaliação das proteínas e fatores de choque térmico, diminuiu a expressão da HSP70 e do HSF1. No processo inflamatório, diminuiu a presença de infiltrado inflamatório e a expressão das proteínas NF-KB/p65 e da iNOS. No processo fibrogênico, diminuiu os septos e a presença de nódulos de fibrose, além de diminuir a expressão das proteínas TGF-β1 e da α-SMA. No processo de angiogênese, diminuiu a expressão do VEGF. **Conclusão:** Com este estudo, demonstramos que a MLT, uma indolamina sintetizada a partir do aminoácido triptofano, protegeu o parênquima hepático da progressão da fibrose induzida em ratos pelo CCl₄.

Palavras-chave: dano oxidativo, antioxidantes e cirrose hepática.

ABSTRACT

Background: Liver diseases represent a major problem in public health, accounting for a significant number of hospitalizations and care, with increasing mortality rates. Melatonin (MLT) is a powerful antioxidant molecule, that has demonstrated to be beneficial in various pathological situations, including liver diseases. **Objective:** The aim was to evaluate the effects of MLT in liver cirrhosis induced by CCl₄ in male Wistar rats. **Methods:** We used 20 male Wistar rats (230-250g) divided into 4 groups: I : control (CO), II: CO + MLT, III: CCl₄ and IV: CCl₄ + MLT. The CCl₄ was administered ip: 10 applications in 5 to 5 days , 10 applications in 4 to 4 days and 7 applications in 3 to 3 days. The MLT (20 mg / kg ip) started at the 10th week and lasted until the end of the experiment, at 16 weeks. **Results:** As results presented in the two articles, we found that the MLT in the CCl₄+MLT group when compared to CCl₄ group, decreased serum levels of AST, ALT and FA enzymes. In the evaluation of oxidative stress, decreased LPO measured by TBARS and F₂- isoprostanes; increased the activity of the antioxidant enzyme (SOD) and decreased the expression of NQO1; increased expression of the transcription factor Nrf2 and decreased the expression of its inhibitor Keap1. In the assessment of ER stress, decreased the expression of proteins predictors of ER stress, GRP78 and ATF6. In the evaluation of proteins and heat shock factors, decreased expression of HSP70 and HSF1. In the inflammatory process, decreased inflammatory infiltration and the expression of proteins NF-KB/p65 and iNOS. In the fibrogenic process, decreased the sept and the presence of nodules of fibrosis, in addition to decreasing the expression of TGF-β1 protein and α-SMA. In the process of angiogenesis, decreased expression of VEGF. **Conclusion:** In this study, we demonstrated that MLT, an indoleamine synthesized from tryptophan, protected the liver parenchyma from fibrosis progression induced by CCl₄ in rats.

Keywords: oxidative damage, antioxidants and liver cirrhosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca das referências bibliográficas	16
Figura 2. Fígado: Localização, estrutura lobular e circulação.....	18
Figura 3. Lóbulo hepático dividido em três zonas, com base na função metabólica.	18
Figura 4. Arquitetura sinusoidal no fígado normal.	19
Figura 5. Ativação, interação e função das células estreladas hepáticas.	22
Figura 6. Espaço subendotelial na fibrogênese hepática.	23
Figura 7. Ativação das células estreladas no processo de dano hepático.	24
Figura 8. Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do CCl ₄	27
Figura 9. Via do Nrf2/Keap1.....	31
Figura 10. Interação entre as HSPs e HSFs.	33
Figura 11. Via de sinalização em resposta às proteínas desdobradas no Retículo Endoplasmático.	35
Figura 12. Estrutura da molécula de melatonina.	39
Figura 13. Biossíntese da melatonina.	40
Figura 14. Marco conceitual, construído a partir da base teórica que sustenta o estudo.....	43
Figura 15. Mecanismo de ação da melatonina proposto para este estudo.	90
Figura 16. Medicina translacional – da bancada à clínica.	92

ARTIGO I

Figure 1 - Western blot analysis: Keap1 and Nrf2.	63
Figure 2 - Western blot analysis: ATF6 and GRP78.....	64
Figure 3 - Western blot analysis: HSF1 and HSP70.....	65

ARTIGO II

Figure (artigo II) 1.- Level of F2-isoprostanes in rat liver..	78
---	----

Figure 2.- Western blot analysis of NQO1 and VEGF.....	78
Figure 3.- Histological analysis of liver sections by hematoxylin and eosin and picrosirius staining	79
Figure 4.- Western blot analysis of p65 and iNOS.....	80
Figure 5.- Western blot analysis of TGF- β and α -SMA.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e as equações químicas para a sua formação.	28
--	----

ARTIGO I

Table 1 - Effect of MLT on liver function, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity.....	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HTP	5-hidroxitriptofano
AA-NAT	arilalquilamina n-acetiltransferase
ARE	elemento de resposta antioxidante
ATF6	do inglês - <i>activating transcription factor 6</i>
BAX	do inglês, <i>BCL2-associated X protein</i>
Bcl-2	do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>
BiP	proteínas de ligação de imunoglobulinas
[•]CCl₃	triclorometil
CCl₄	tetracloroeto de carbono
CEHs	células estreladas hepáticas
CHOP	do inglês, <i>CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein</i>
CKs	células de Kupffer
CO	controle
COX-2	ciclo-oxigenase-2
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GRP78	proteína regulada por glicose 78kDa
GSH	glutaciona
GST	glutaciona S-transferase
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1	Fator induzível por hipóxia
HO-1	heme oxigenase-1
HSE	elementos de choque térmico (do inglês Heat shock element)
HSF	denominados fatores de choque térmico (do inglês <i>Heat-shock factors</i>)
HSP	proteínas de choque térmico (do inglês <i>Heat Shock Proteins</i>)
HSP40	proteínas de choque térmico 40
HSP70	proteínas de choque térmico 70
HSP90	proteínas de choque térmico 90
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IRE-1	do inglês - <i>inositol-requiring enzyme-1</i>
Keap1	do inglês <i>Kelch like-ECH-associated protein 1</i>
LPO	lipoperoxidação
maf	do inglês <i>masculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
MEC	matriz extracelular
MLT	melatonina
MMPs	metaloproteinases
NF-κB	fator nuclear-kappaB
NQO1	NAD(P)H quinina oxidoreductase 1
Nrf2	fator de transcrição nuclear 2
O₂⁻	radical superóxido
OH	radical hidroxil
OOCCI[•]	triclorometil peroxil
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PERK	do inglês - <i>PKR-like ER-regulated kinase</i>

RE	retículo endoplasmático
RLs	radicais livres
SOD	superóxido dismutase
STi1	sítio 1
STi2	sítio 2
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	fator transformador de crescimento β
TIMP-1	inibidor tecidual das metaloproteinases
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
TPH1	triptofano hidroxilase 1
UPR	resposta à proteína mal dobrada (do inglês <i>Unfolded Protein Response</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
XO	xantina-oxidase
α-SMA	alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações.....	16
2.2 Fígado.....	17
2.3 Fibrose hepática.....	20
2.4 Cirrose hepática	24
2.5 Modelo experimental indução da cirrose hepática: Tetracloreto de carbono ...	25
2.6 Estresse oxidativo	28
2.7 Proteínas de choque térmico.....	32
2.8 Estresse do Retículo Endoplasmático	34
2.9 Inflamação	36
2.10 Angiogênese	37
2.11 Melatonina	38
3 MARCO CONCEITUAL.....	43
4 OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo geral	44
4.2 Objetivos específicos	44
4.2.1 <i>Objetivos específicos do artigo I</i>	44
4.2.2 <i>Objetivos específicos do artigo II</i>	44
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
6 ARTIGOS DA TESE.....	55
6.1 Artigo I: Protective effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity.	55
6.2 Artigo II: Antioxidant effect of melatonin on the fibrogenesis of rats exposed to carbon tetrachloride	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
<i>Conclusões artigo I - Protective effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity.</i>	89
<i>Conclusões artigo II - Antioxidant effect of melatonin on the fibrogenesis of rats exposed to carbon tetrachloride</i>	89
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas constituem um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo, comprometendo não só o bem-estar social do indivíduo como também a economia do país. Neste contexto, a cirrose hepática representa a manifestação patológica mais comum e figura entre as maiores causas de morte (1-3).

Em virtude do grande problema mundial que a cirrose representa, muitas pesquisas acerca desta doença são realizadas em todo mundo, objetivando testar substâncias e técnicas que possam converter-se em tratamento ou, ao menos, aumentar a sobrevivência de pacientes cirróticos até o momento do transplante, evitando a progressão da doença.

A implicação das espécies reativas e de alterações na homeostase redox celular no comprometimento da função hepática e na morte de hepatócitos expostos a agentes tóxicos tem sido extensivamente documentada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (4).

A combinação e a persistência de estímulos como o estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático podem ativar inúmeras vias e iniciar um processo inflamatório, fibrogênico e angiogênico (4, 5). Considerações éticas limitam procedimentos em seres humanos, reforçando a necessidade de modelos animais que reproduza o quadro patológico da cirrose (6, 7).

O fígado, por ser o principal órgão responsável pelo metabolismo de medicamentos e produtos químicos é, portanto, também o principal órgão-alvo para a maioria destes compostos tóxicos (8, 9).

O modelo experimental de cirrose hepática pela administração de tetracloreto de carbono (CCl_4), é amplamente utilizado para o estudo do desenvolvimento deste processo patológico e para pesquisas alternativas do seu tratamento. Nesse modelo, a fibrose hepática e os nódulos regenerativos são proeminentes e o padrão histológico é semelhante ao da cirrose em humanos (10-16). No fígado, o mecanismo de ação do CCl_4 dá-se através da produção de radicais livres que exercem efeitos tóxicos sobre as células hepáticas, promovendo o processo

inflamatório, a esteatose, a fibrose, a cirrose e finalmente, a morte celular (necrose centrolobular), além de causar alterações no mecanismo de defesa antioxidante e consequente alteração na homeostase redox celular (9, 17).

A estrutura desta tese segue as normas do Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e esta dividida em 8 seções: 1) introdução; 2) referencial teórico; 3) marco conceitual; 4) objetivos; 5) referências bibliográficas (Introdução e referencial teórico); 6) artigos da tese, 7) considerações finais; 8) perspectivas futuras e 9) anexos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações

Esta revisão bibliográfica resalta os principais aspectos relacionados com a cirrose hepática, e o uso da melatonina (MLT) como estratégia terapêutica. Considerou-se a ação terapêutica da MLT como fator e a redução nos parâmetros de dano e processo fibrogênico hepático como desfecho.

A busca envolveu as bases de dados MEDLINE (*site* PubMed e Science direct), reconhecidas e autorizadas pelo portal CAPES. Também foram consultadas monografias, dissertações e teses de diversas universidades brasileiras e estrangeiras, além de livros-texto. Foram realizadas buscas através dos termos e combinações apresentadas na Figura 1.

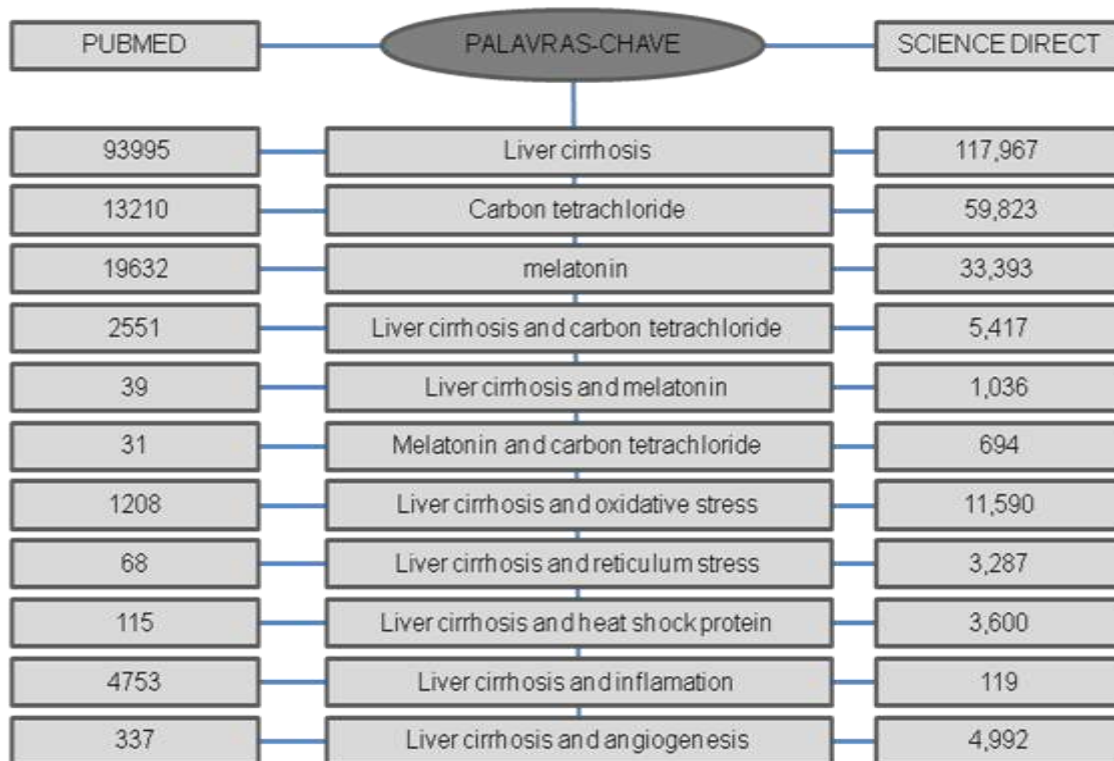


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Desta busca, foram utilizados 180 artigos utilizados para a revisão bibliográfica, o referencial teórico da tese e os dois artigos redigidos.

2.2 Fígado

A posição ocupada pelo fígado na cavidade abdominal favorece a captura, transformação, acúmulo e neutralização de substâncias, desempenhando inúmeras e importantes funções para o organismo (18). No processo de biotransformação, muitos compostos são metabolizados pelo fígado que altera a sua toxicidade, reduz sua atividade e os elimina. A exposição crônica à substâncias tóxicas geralmente resulta em alterações nas suas funções e do seu tamanho, com presença de reação inflamatória e aumento de tecido conjuntivo, causando fibrose intra-hepática (19, 20).

O fígado é o maior órgão sólido do organismo pesando em média 1200 a 1500 gramas e ocupa grande parte do quadrante superior direito da cavidade abdominal adjacente ao diafragma (21, 22). O ligamento falciforme e o omento menor, dividem o fígado em lobos direito e esquerdo (Figura 2). Os segmentos menores do lobo direito são o lobo caudado e o quadrado (22).

O fígado tem suprimento sanguíneo duplo, proveniente da veia porta e da artéria hepática, e é formado por subunidades microscópicas, os lóbulos hepáticos (22).

Na região central do lóbulo hepático situa-se um ramo da veia porta (veia centrolobular) e na periferia o trato portal (espaço-porta), contendo o ducto biliar e ramos da veia porta e da artéria hepática (Figura 2) (22).

A veia porta, formada pela confluência da veia esplênica e mesentérica superior, forma um leito vascular no interior do fígado, onde o sangue venoso se mistura ao arterial. Esse leito constitui os sinusóides hepáticos, que são delimitados por placas de hepatócitos (22).

O sangue venoso que chega ao fígado é proveniente do intestino, do pâncreas, do baço e do estômago. Esse fluxo é fundamental para o desempenho do fígado nas funções orgânicas, pois transporta diretamente para o fígado tanto nutrientes quanto fármacos que chegam à circulação mesentérica. A veia porta é responsável por cerca de 70% do fluxo sanguíneo, enquanto a artéria hepática pelos demais 30% (22).

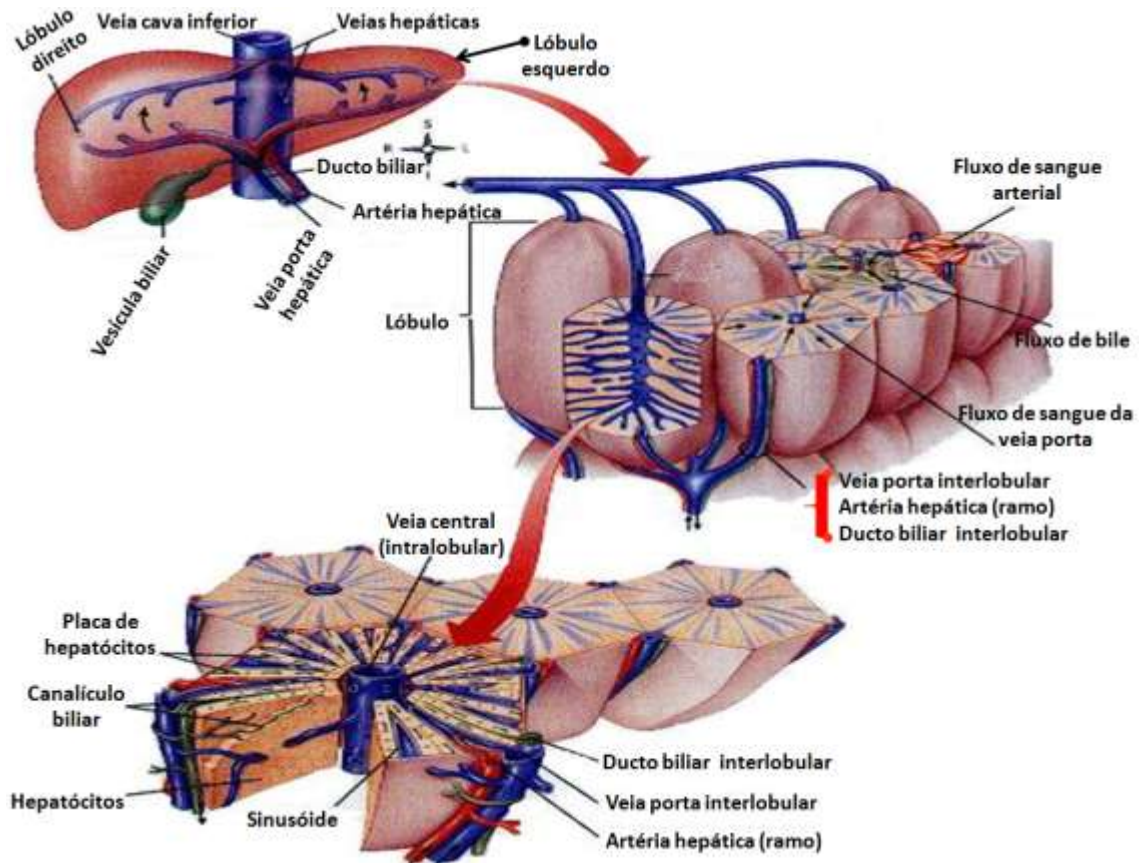


Figura 2. Fígado: Localização, estrutura lobular e circulação.
Fonte: (23).

A partir do trato portal o lóbulo é dividido em zonas: Zona 1 (periportal) localiza-se mais próxima do trato portal e recebe a maior parte do sangue oxigenado; zona 2 (intermediária); e a zona 3 (centrolobular) está mais distante, recebendo a menor quantidade de sangue oxigenado (Figura 3) (22).

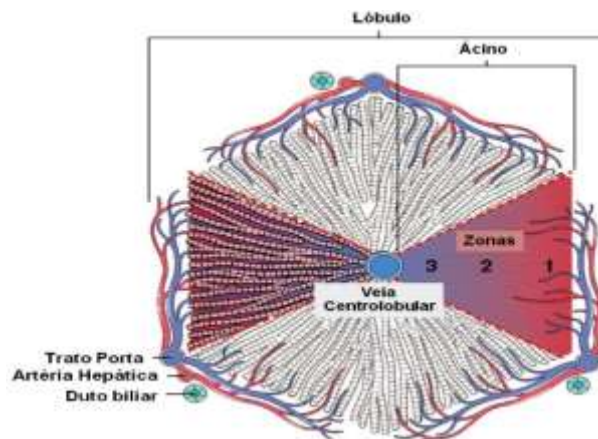


Figura 3. Lóbulo hepático dividido em três zonas, com base na função metabólica.
Fonte: (23).

O parênquima hepático, organizado em lóbulos, possui uma estrutura acinar e é constituído principalmente por 4 tipos de células: células epiteliais (hepatócitos), células endoteliais, células estreladas hepáticas (CEHs) e as células de Kupffer (CKs) (Figura 4) (20).

As células epiteliais ou os hepatócitos compreendem 60% do tecido hepático e dispõem-se em placas orientadas radialmente a partir de uma veia central e entrelaçadas de forma ordenada por sinusóides (Figura 4) (20, 22, 24, 25).

As células endoteliais estão localizadas no espaço sinusoidal que representa a unidade microvascular hepática. Estão separadas dos hepatócitos pelo espaço de Disse onde residem as CEHs. Os sinusóides possuem um revestimento endotelial fenestrado com presença de poros, o que assegura as trocas metabólicas entre a corrente sanguínea e os hepatócitos (26).

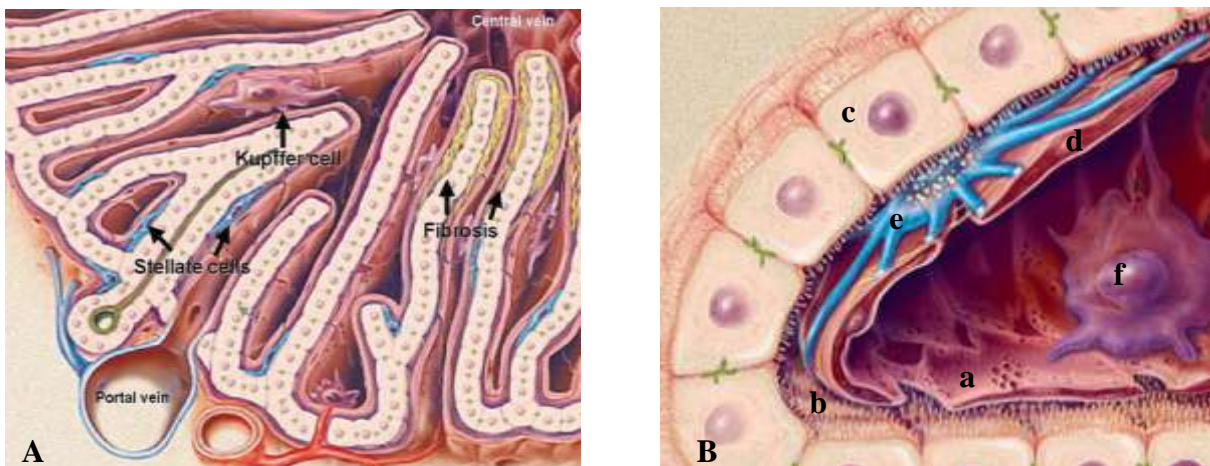


Figura 4. Arquitetura sinusoidal no fígado normal. Em (A) o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos cercados por endotélio fenestrado, em (B) desenho de alta resolução do (a) espaço subendotelial e do (b) espaço de Disse, com a presença e identificação dos tipos celulares que compõem o fígado: c) hepatócito; d) célula endotelial; e) células estreladas quiescentes e f) células de Kupffer.

Fonte: Adaptado (27).

As CKs são macrófagos altamente móveis inseridos no revestimento do espaço subendotelial do sinusóide, sobretudo na área periportal. Como todos os macrófagos, apresentam grandes quantidades de lisossomos, que em seu interior

contém enzimas necessárias para a digestão intracelular das substâncias fagocitadas, remoção por endocitose de bactérias vírus, parasitas e células tumorais (28, 29).

As CEHs são de origem embrionária mesodérmica e fazem parte das células não-parenquimatosas. Como o próprio nome indica, apresentam formato de estrela e estão localizadas no espaço perissinusoidal ou Espaço de Disse (30). Em condições normais, as CEHs são responsáveis pelo armazenamento de vitamina A e de retinóides. Também são responsáveis pelo controle da síntese de matriz extracelular (MEC) e pela regulação do fluxo sanguíneo (22, 31). Possuem capacidade de apresentar dois fenótipos: o quiescente e o ativado, e propriedades contráteis e fibrogênicas. Quando ocorre lesão nos hepatócitos, as CEHs sofrem mutação (ativação) e passam a ser a principal fonte de componentes da MEC, exercendo um papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da fibrose hepática (22, 25, 32).

A MEC é uma rede molecular organizada que fornece integridade funcional e estrutural ao parênquima hepático. Além de ser um componente presente nos espaços porta, nas paredes dos sinusóides e nas veias centrais, oferecendo consistência e resistência mecânica ao órgão, a MEC também é responsável pela regulação, manutenção e diferenciação de diversos tipos celulares (3, 33).

No fígado normal, a MEC é um substrato altamente dinâmico, com um sistema regulado e preciso entre a sua síntese e degradação. Os mais importantes componentes estruturais da MEC no fígado são colágenos (I, III, IV, V, VI, XIV e XVIII), proteoglicanos, laminina, fibronectina e glicoproteínas. No processo fibrogênico, ocorrem alterações da matriz caracterizada pelo aumento de seus múltiplos componentes, incluindo os colágenos intersticiais, colágenos da membrana basal, proteoglicanos e glicoproteínas, tais como laminina, fibronectina (26).

2.3 Fibrose hepática

A fibrose hepática é definida como um processo dinâmico e altamente integrado entre a célula e o tecido, potencialmente reversível, que impulsiona a

progressão para a doença hepática crônica como a cirrose e a insuficiência hepática (26, 31, 34).

Em uma perspectiva mundial a doença hepática crônica esta sujeita à etiologias como infecção crônica pelos vírus das hepatites, pela exposição crônica à toxinas ou fármacos, por condições metabólicas alteradas, persistência de lesões autoimunes e por lesões das vias biliares (34, 35).

Independentemente da etiologia, seja em modelos experimentais ou em humanos, o processo fibrogenico é um processo dinâmico e integrado, centrado nos aspectos de síntese, deposição e degradação da MEC com a formação de um novo ambiente molecular e bioquímico (30, 31). Quando a lesão é aguda ou autolimitada, estas alterações são transitórias e a arquitetura hepática pode ser recuperada para sua composição e função normal (26). No entanto, se a lesão for crônica, com persistência do estresse oxidativo, processo inflamatório e do acúmulo de MEC, o parênquima hepático vai sendo remodelado progressivamente por tecido cicatricial e as alterações passam a ser permanentes (34, 36, 37).

A ativação das CEHs, caracterizada pela conversão de uma célula quiescente, rica em vitamina A, para um fenótipo de miofibroblasto que é proliferativo, fibrogênico e contrátil, é considerada a chave central para fibrogênese, e uma resposta comum a vários insultos prejudiciais para o fígado (30).

Outras células mesenquimais também contribuem para o acúmulo de MEC, porém a ativação das CEHs continua sendo a via mais dominante e acontece em duas grandes etapas, a iniciação e a perpetuação (Figura 5) (30).

A fase de iniciação, também chamada de fase pré-inflamatória, refere-se à alterações iniciais na expressão gênica e no fenótipo, tornando a célula apta a produzir ou estimular a liberação de citocinas. Este processo ocorre com o envolvimento do estresse oxidativo, corpos apoptóticos, lipopolissacarídeos (LPS) ou por estímulo parácrino (25, 30).

A segunda etapa, compreende a perpetuação da ativação das CEHs. Esta fase ocorre juntamente com importantes alterações fenotípicas características da

perpetuação da ativação das células estreladas, como: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da MEC e sinalização da inflamação (38).

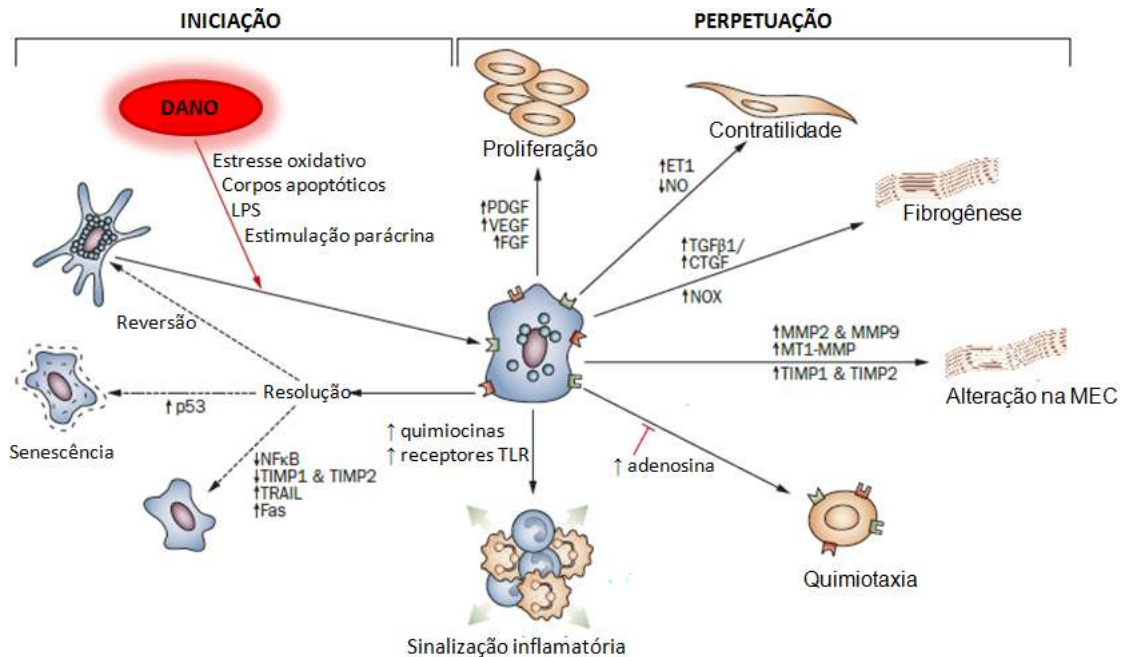


Figura 5. Ativação, interação e função das células estreladas hepáticas.
Fonte: Adaptada de (38).

Nesse contexto, sabe-se que a fibrogênese hepática é orquestrada pela ativação e multiplicação das CEHs, que produzem quantidades abundantes de MEC (37, 39, 40).

A deposição da MEC no espaço de Disse e a contração exercida pelas CEHs levam à perda das fenestrações do endotélio e à diminuição das microvilosidades dos hepatócitos, o que resulta na deficiência das trocas metabólicas bidirecionais do fluxo normal da veia porta com o hepatócito (31). Estas alterações qualitativas e quantitativas na composição da MEC levam à capilarização do sinusóide, dificultando a função de trocas metabólicas e, como consequência, ocorre o desenvolvimento de shunts intra-hepáticos. O espessamento progressivo dos septos fibróticos, associado a estas alterações, determina a hipertensão portal (Figura 6) (26, 31, 33).

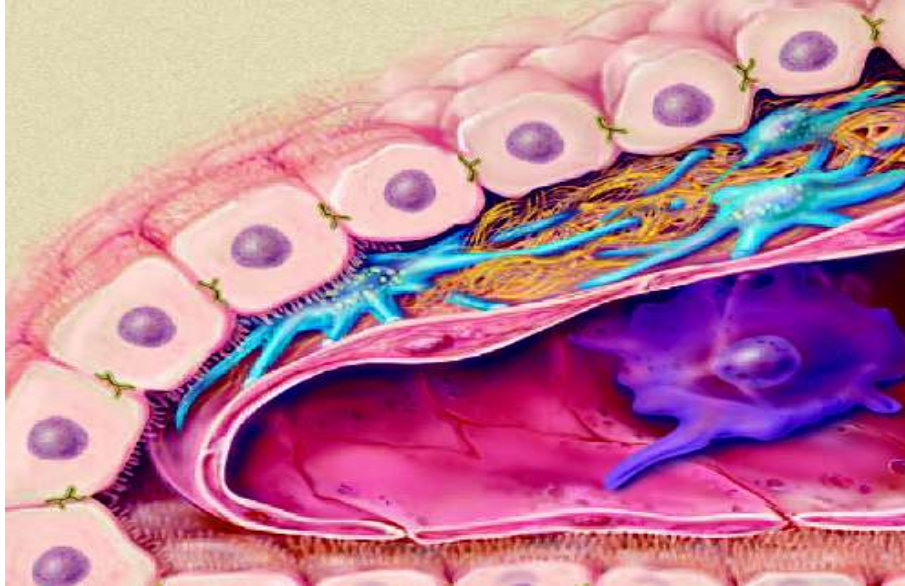


Figura 6. Espaço subendotelial na fibrogênese hepática.
Fonte: (20).

Este processo de ativação das CEHs é impulsionado principalmente por duas citocinas, o fator transformador de crescimento β (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que levam ao aumento da expressão de filamentos contráteis, como da alfa actina do músculo liso (α -SMA) (31).

A α -SMA é o marcador mais comumente utilizado em estudos experimentais e clínicos relacionados às doenças hepáticas crônicas, sendo aceito como um indicador da ativação das CEHs (31, 41-43).

O TGF- β em mamíferos apresenta-se em pelo menos três isoformas, designadas de β 1, β 2 e β 3, onde todas medeiam processos de sinalização através dos mesmos receptores da superfície, conhecidos como T β RI e T β RII. O TGF- β 1 é a isoforma mais comumente secretada e presente em doenças fibróticas (35), é produzido pelas células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais, células epiteliais do duto biliar, hepatócitos, e pelas próprias CEHs (31, 44).

O processo de fibrose é mantido tanto pela apoptose de células epiteliais, o que leva à produção de citocinas pró-fibróticas, principalmente TGF- β 1, e também pela inibição da apoptose dos miofibroblastos, que produzem excesso de MEC. A citocina chave presente neste "paradoxo", apoptose de células epiteliais e inibição

da apoptose das CEHs, é o TGF- β 1 e, portanto, é uma molécula fortemente pró-fibrótica (31).

A ativação da CEHs também está associada a outros fenótipos celulares importantes, incluindo o aumento da proliferação e liberação de citocinas pró-inflamatórias, liberação de grandes quantidades do inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMP-1), uma proteína que impede as metaloproteinases (MMPs) de realizarem sua função na degradação de colágeno e recrutamento e ativação de outros tipos celulares (Figura 7) (31, 37, 45).

No nível molecular, a presença de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, alterações na organização e na composição da MEC e o aumento de espécies reativas têm sido sugeridos para desempenhar um importante papel na patogênese da fibrose (30).

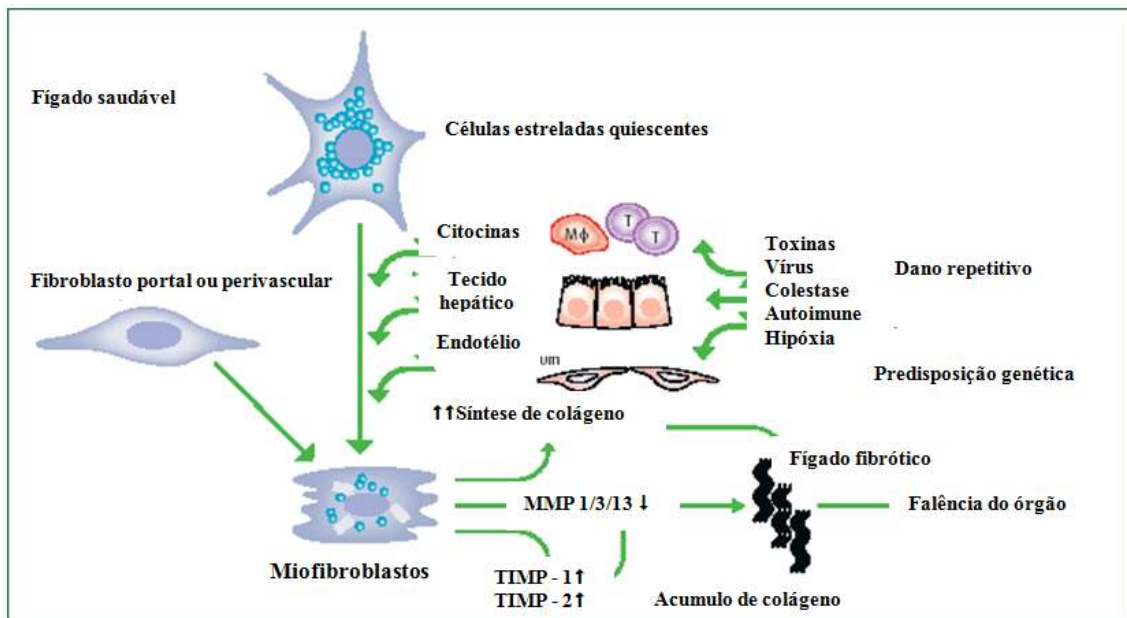


Figura 7. Ativação das células estreladas no processo de dano hepático.
Fonte: (46).

2.4 Cirrose hepática

A cirrose, consequência final da progressiva fibrogênese, é atualmente definida como um estágio avançado da doença hepática crônica, caracterizada pela perda da estrutura acinar para se tornar uma estrutura nodular, circundada por septos de extensa fibrose no parênquima hepático (26, 34).

A cirrose frequentemente se desenvolve insidiosamente ao longo de muitos anos (20 a 40 anos), sendo o ritmo influenciado por fatores genéticos e ambientais (26). Com isso, no momento do diagnóstico, os pacientes podem apresentar-se em um estágio avançado da doença, sem nenhuma garantia de que o tratamento atualmente disponível para remover a causa subjacente irá ter sucesso (47).

Na sua evolução a cirrose compromete outros órgãos e sistemas determinando complicações graves, que ocasionam a sua grande morbimortalidade. O tratamento destas situações é paliativo, sendo o transplante hepático a única terapêutica efetiva e de resolução. O número limitado de doações de órgãos dificulta e impede a resolução plena deste problema. Estas limitações evidenciam a urgência e a necessidade de desenvolver terapias anti-fibróticas eficazes (47).

2.5 Modelo experimental de indução da cirrose hepática: Tetracloreto de carbono

A pesquisa sobre fibrose hepática tem se beneficiado do uso de inúmeros modelos experimentais e da aplicação de modernas técnicas moleculares. Para facilitar as limitações impostas aos procedimentos em seres humanos, a disponibilidade de um modelo animal é de suma importância para o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo da doença, e para avaliar a eficácia de novas terapias.

Os modelos experimentais para estudar a doença hepática crônica incluem a utilização de procedimentos cirúrgicos, o uso de fármacos hepatotóxicos ou a combinação de ambos.

O fígado, como órgão primário no metabolismo e excreção de fármacos, é extremamente suscetível aos efeitos colaterais de substâncias ingeridas. A lesão hepática induzida por fármacos pode ser definida como uma disfunção bioquímica ou hepática, onde um determinado fármaco ou seus metabólitos atingem diretamente elementos celulares, levando à hepatotoxicidade intrínseca. Hepatotoxinas intrínsecas causam dano geralmente de modo dose-dependente. Nesta classe de hepatotoxinas inclui-se o tetracloreto de carbono (CCl₄) (22).

Os primeiros estudos utilizando o CCl_4 , para o estabelecimento da cirrose, surgiram em 1936, onde Cameron e Karunaratne observaram que doses repetidas de CCl_4 em ratos resultava em cirrose (48). Desde então, o CCl_4 tem sido amplamente descrito e utilizado para induzir dano hepático crônico, principalmente como modelo experimental de cirrose hepática, objetivando o estudo do desenvolvimento do processo patológico e para pesquisas alternativas de tratamento (11, 12, 16, 49-51).

A maioria desses estudos demonstram que a cirrose hepática induzida por CCl_4 é um modelo adequado, pois a fibrose e os nódulos regenerativos são proeminentes e as alterações histológicas, bioquímicas, hemodinâmicas, renais e neuro-humorais resultantes, são semelhantes às da cirrose humana (10). Este modelo é eficaz no desencadeamento da fibrose e, a longo prazo, da cirrose, servindo como um modelo de lesão hepática crônica com consequências no nível celular e molecular (10, 13, 44).

O CCl_4 é um produto químico utilizado principalmente para a produção de clorofluorocarbonetos, embora tenha sido também utilizado como um agente de limpeza ou pesticida. Hoje em dia, devido aos seus efeitos tóxicos sua produção, é restrita. O CCl_4 evapora facilmente, é ambientalmente estável, o que contribui para a sua acumulação na atmosfera e nas águas subterâneas. As principais vias de exposição para a população, em geral, dão-se através da inalação do ar e pela ingestão da água contaminada. A exposição a concentrações elevadas pode afetar o fígado, o sistema nervoso central, os rins e os pulmões (52).

Sua ação hepatotóxica é mediada pelo aumento do estresse oxidativo que induz necrose e apoptose aos hepatócitos da zona III (47, 53, 54). Quando administrado intermitentemente, e em doses baixas 2x/semana, durante 4 semanas induz pontes de fibrose, em 8 semanas induz cirrose precoce e em 12 semanas ocasiona cirrose micronodular avançada (47).

No fígado, o mecanismo de ação ocorre no retículo endoplasmático através da formação de intermediários reativos, via atividade de isoenzimas do citocromo P-450 (13, 29, 55, 56). Este mecanismo também envolve alterações significativas na homeostase do cálcio mitocondrial e é dependente da dose administrada (56).

O metabolismo do CCl_4 no fígado, pelo complexo enzimático citocromo P-450, resulta na produção de radicais livres (RLs) como triclorometil ($\bullet\text{CCl}_3$) e triclorometil peróxil ($\bullet\text{OCCl}_3$). Estes metabólitos reativos tóxicos podem combinar-se diretamente com distintas moléculas biológicas, como os lipídios da membrana, causando a autooxidação dos ácidos graxos poliênicos presentes dentro dos fosfolipídios, gerando a lipoperoxidação (LPO), que induz o processo inflamatório, ativação das CEHs e promove uma maior progressão da fibrose (Figura 8) (11, 13, 17).

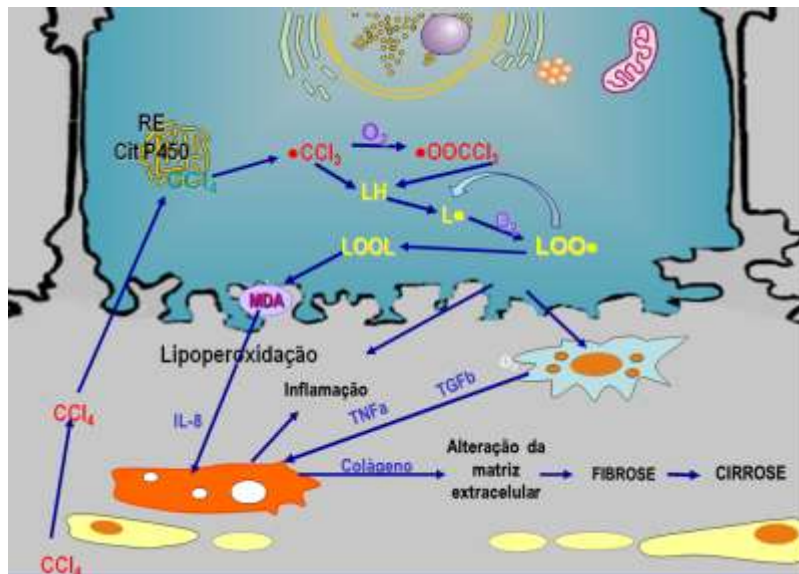


Figura 8. Geração de radicais livres e a injúria hepática pela ação do CCl_4 .
Fonte: Citado por (57).

A seguir, inicia-se uma série de processos bioquímicos e fisiológicos secundários, que serão as últimas causas para o desdobramento das consequências patológicas do metabolismo do CCl_4 (11, 58). Essas alterações lesam a célula, provocando sua morte e consequente fibrose tecidual, que organizada em nódulos, caracterizará a cirrose hepática (58).

A lesão hepática induzida por um metabólito tóxico é dependente da monooxigenase do citocromo P450, onde o efeito é exacerbado por indutores enzimáticos como o fenobarbital e pela redução proteica, que deprime as enzimas metabolizadoras de drogas (11, 15, 59, 60).

2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo, ou desequilíbrio redox, é um termo comumente usado para conceituar um estado onde o equilíbrio redox celular entre pró-oxidantes e antioxidantes está alterado em favor do estado pró-oxidante, levando a potenciais danos celulares (30, 61-63).

Os pró-oxidantes, como os radicais livres de oxigênio ou, mais genericamente, as espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (exemplificados na Tabela 1), são produzidos durante o metabolismo normal e intracelular de substâncias exógenas. Fontes endógenas incluem mitocôndrias, xantina-oxidase (XO), o metabolismo do citocromo P450, peroxissomas e ativação de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos) (30). Radicais derivados a partir do oxigênio representam a classe mais importante das espécies reativas geradas em sistemas vivos (30).

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e as equações químicas para a sua formação.

	Radicais livres	Não radicais	Equações Químicas (Geração)
EROs	Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) Radical hidroxila (HO^{\cdot}) Radical peroxil (RO_2^{\cdot}) Radical Alcoxil (RO^{\cdot}) Radical Hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) Oxigênio singlete (${}_1O_2$)	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) Ácido hipocloroso ($HOCl$) Ácido hipobromoso ($HOBr$) Ozônio (O_3) Peróxidos orgânicos ($ROOH$) Ácido peroxinitroso ($ONOOH$) Peroxinitrato (O_2NOO) Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ (anion superóxido) $O_2^{\cdot-} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot}$ (radical hidroperoxila) $HO_2^{\cdot} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio) $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$ (radical Hidroxila)
ERNs	Óxido nítrico (NO) Dióxido de nitrogênio (NO_2) Nitrato (NO_3)	Cloreto de nitril (NO_2Cl) Ácido nitroso (HNO_2) Cátion nitroso (NO^+) Anion nitroso (NO^-) Tetróxido de nitrogênio (N_2O_4) Trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) Peroxinitrito ($ONOO$) Ácido peroxinitroso ($ONOOH$) Alquil Peroxinitrito ($ROONO$) Cation nitrônio (NO_2^+)	L-arginina + $O_2 \rightarrow NO$ (óxido nítrico) + L-citulina $O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^{\cdot}$ (peroxinitrito) Reação de Fenton (catalisada por metais de transição) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+}$ Reação Haber-Weiss (catalisada por metais de transição) $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$

Fonte: Adaptada (30).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares, contendo um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no mais externo (30). O elétron não emparelhado(s) geralmente aumenta o grau de reatividade do radical livre (30).

Os efeitos benéficos dos radicais livres e das espécies reativas estão relacionados a funções específicas no sistema celular, desempenhando papéis importantes contra micro-organismos e, como segundos mensageiros, atuando em várias vias moleculares e na modulação da expressão de genes para manter a homeostase celular (30, 64).

Os radicais livres e as EROs são considerados hepatotóxicos em altas concentrações, devido ao seu potencial de reação com a maioria das macromoléculas celulares e enzimas inativas, causando danos ao DNA, modificando proteínas e induzindo reações de LPO (65, 66).

A LPO consiste numa reação em cadeia, onde se necessita que espécies reativas ataquem uma molécula orgânica, abstraindo-lhe um átomo de hidrogênio de um grupamento químico (67).

Os organismos vivos estão expostos aos radicais livres a partir de uma variedade de fontes como, do metabolismo celular, processos imunes e metabolismo de xenobióticos. As células possuem mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos que são capazes de neutralizar os efeitos deletérios dos radicais livres, agindo na manutenção da homeostase celular (30, 63, 68).

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EROs é formado por várias enzimas, incluindo: superóxido dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRed), glutathione transferase (GST), catalase (CAT), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo (30, 63, 67).

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou ERO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias não enzimáticas que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não enzimáticas, sendo representadas pelo

ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathiona (GSH), melatonina (MLT), carotenóides, flavonóides, albumina, bilirrubina, ácido úrico. Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de radicais livres ou EROs, inibem a cadeia da LPO na fase de propagação e reparam ou reconstróem a membrana (30, 67, 69).

A suplementação com antioxidantes, seja na dieta ou em capsulas, é baseada na crença de que os radicais de oxigênio e as EROs desempenham um papel importante em muitas doenças humanas, causando o “dano oxidativo”, e que a diminuição do dano oxidativo irá atrasar ou impedir o desenvolvimento e a progressão da doença (70).

Na verdade, falhas no sistema de reparo permitem o acúmulo do dano oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da doença (70). A sinalização gerada pelas EROs pode ser influenciada pela expressão e atividade de várias enzimas antioxidantes, que são reguladas por uma série de fatores de transcrição, incluindo fator de transcrição nuclear 2 (Nrf2) (30, 63).

O Nrf2 representa um dos mais importantes sistemas implicados na adaptação e proteção de uma variedade de tecidos e células contra o estresse oxidativo e o processo inflamatório (8, 63). O Nrf2 encontra-se no citoplasma, associado à outra proteína o Keap1 (do inglês *Kelch like-ECH-associated protein 1*), formando um complexo inativo (71, 72).

Após estimulação celular proveniente de um estresse oxidativo mais proeminente, esta associação rompe-se e o Nrf2 é deslocado para o núcleo. No núcleo se liga à outra proteína, a Maf (do inglês *músculoaponeurotic fibrosarcoma*), e se juntam a uma sequência promotora chamada de elemento de resposta antioxidante (ARE), resultando em uma resposta citoprotetora (Figura 9) (63, 73, 74). Esta resposta citoprotetora se dá através da indução de enzimas antioxidantes e de enzimas detoxificantes de fase II, incluindo heme oxigenase-1 (HO-1), a NAD(P)H quinina oxidorreductase 1 (NQO1) e a glutathiona S-transferase (GST) (8, 63, 70).

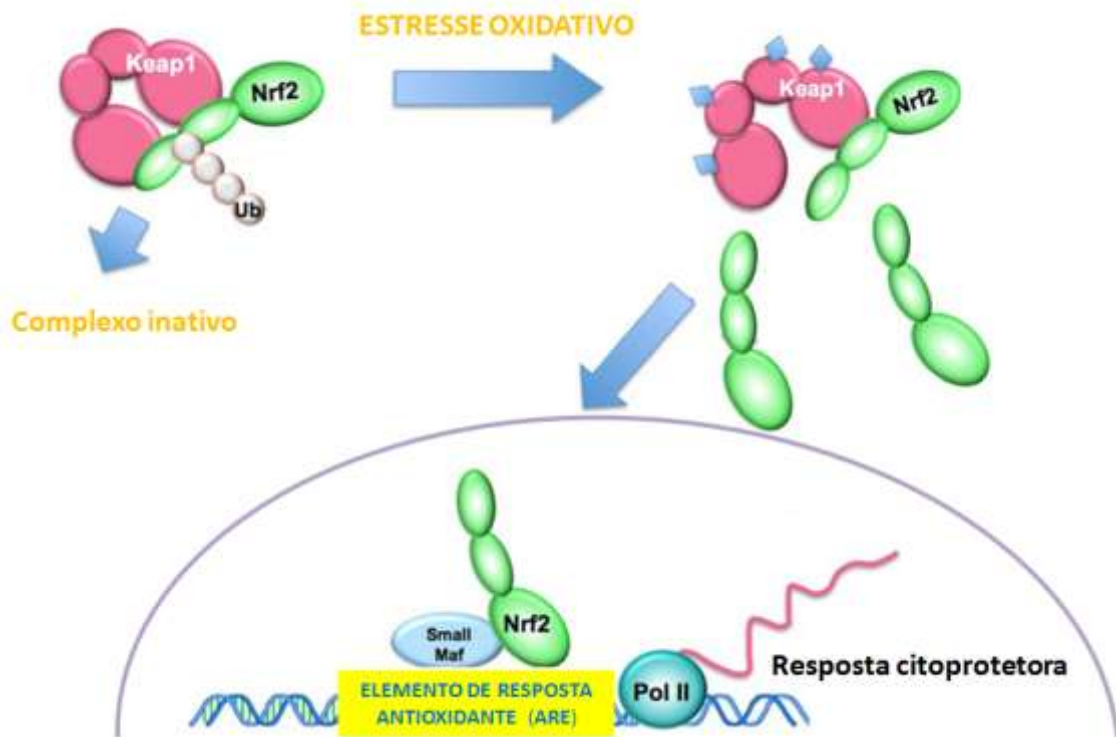


Figura 9: Via do Nrf2/Keap1.

Nos últimos anos, tem havido grandes avanços na metodologia para medir com precisão os produtos finais do dano oxidativo à proteínas, lipídios e ao DNA, especialmente o uso da medida de isoprostanos e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (70). Os F2-isoprostanos são formados a partir da degradação oxidativa do ácido araquidônico e liberados na circulação, podendo ser facilmente medidos em amostras biológicas como um marcador de LPO (75, 76). O envolvimento do estresse oxidativo é detectado em quase todas as situações clínicas e experimentais de doença hepática crônica, o que agrava a lesão e a perda da função do fígado (30, 70).

O estresse oxidativo e a consequente LPO, característica constantemente presente em modelos experimentais de lesão hepática, desempenham um papel importante na patogênese da lesão hepática, muitas vezes em associação com as defesas antioxidantes diminuídas (15, 30).

2.7 Proteínas de choque térmico

A "resposta ao choque térmico" foi destacada pela primeira vez por Ferruccio Ritossa em 1962, que expôs células de glândulas salivares de *Drosophila* a um choque térmico e estas demonstraram novo padrão de espessamento cromossomal, cujos genes foram determinados, posteriormente, como sendo das proteínas de choque térmico (HSP - do Inglês *Heat Shock Proteins*) ou simplesmente proteínas de estresse (77-79).

As HSPs são chaperonas moleculares, altamente conservadas, presentes em muitas espécies, tais como leveduras, bactérias, plantas, animais e seres humanos (77). Nas células, apresentam localização e função específicas, porém atuam de modo coordenado com outras co-chaperonas, mantendo a qualidade e o equilíbrio da homeostase das proteínas, inclusive sob condições de estresse (80).

Existem quatro grandes famílias de HSPs, classificadas como ATP-dependentes (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60) e as ATP-independentes, incluindo, HSPs pequenas, com peso molecular entre 10 e 30 kDa (80, 81).

Dentro das HSPs, a proteína de choque térmico 70 (HSP70) é uma das famílias de proteínas mais conservadas na evolução. Esta presente na célula, tanto na forma constitutiva quanto na induzível (82), sendo as proteínas mais estudadas no que diz respeito à imunidade, fibrose e câncer (35).

As proteínas são de grande importância para as células, realizando funções de sinalização, transporte, proteção e regulação celular. Após sua síntese, as proteínas precisam obter uma estrutura tridimensional para serem funcionais. Porém, durante a vida, a célula é exposta a condições de estresse incluindo calor, estresse oxidativo, processo inflamatório, irradiação e exposição a compostos tóxicos, que podem causar desdobramento de proteínas, agregação não específica e desequilíbrio na sua homeostase (80).

O mecanismo de regulação das chaperonas moleculares frente ao estresse oxidativo é rigorosamente controlado por fatores de transcrição denominados fatores de choque térmico (HSF - do inglês *Heat-shock factors*) (Figura 9) (83).

Entre eles, destaca-se o HSF-1, que tem a capacidade de ligar-se a sítios específicos do DNA, chamados elementos de choque térmico (HSE – do inglês *Heat shock element*), presentes nos genes promotores das HSPs (77). Em condições normais, o HSF1 está inativo no citoplasma e ligado a chaperonas como a HSP90, HSP70, ou HSP40 (80). Em condições de estresse, chaperonas ligam-se às proteínas desdobradas, o que resulta na liberação do HSF1. A forma ativa é fosforilada e trimeros de HSF1 migram para o núcleo, onde interagem com o HSE e, finalmente, induzem a transcrição de genes de HSP (Figura 10) (77).

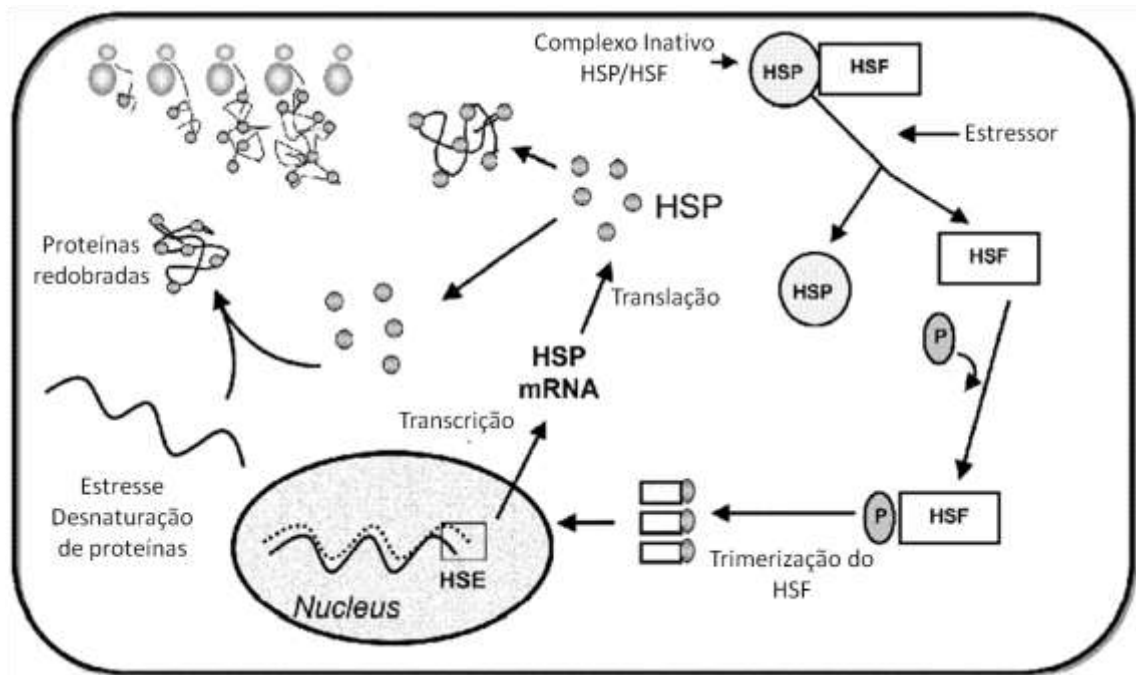


Figura 10. Interação entre as HSPs e HSFs.

Assim como são descritas ações benéficas das HSPs (82), várias evidências destacam a sua ação deletéria sobre várias doenças em humanas, incluindo câncer, em que promovem a sobrevivência das células tumorais, a proliferação e a resistência à fármacos (77). Em especial, as HSP70 têm sido relacionadas com a patogênese e fisiologia de diversas doenças hepáticas, como na hepatite B e C, esteatohepatite não alcoólica, hepatite autoimune, cirrose biliar primária (81). A HSP70 também apresentou propriedade antiapoptótica, onde, ao nível mitocondrial, bloqueou a translocação da proteína BAX (do inglês, *BCL2-associated X protein*) para a mitocôndria e aumentou a liberação da proteína Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*) (77).

Na presença de fatores ambientais (irradiação, quimioterapia, ou xenobióticos), fisiológicos (crescimento celular, diferenciação), fisiopatológicos (inflamação, crescimento tumoral) e do estresse oxidativo, a síntese de HSPs, mais especialmente da HSP70, é aumentada (84). Em contraste com as células normais, as células tumorais frequentemente aumentam a expressão da HSP70 no citosol.

2.8 Estresse do Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela celular essencial para a função e sobrevivência celular, incluindo o transporte e dobramento de novas proteínas sintetizadas, manutenção da homeostase do cálcio e na síntese lipídica (85, 86).

A persistência de perturbações no metabolismo celular pode prejudicar a síntese proteica pelo RE, causando o acúmulo intraluminal de proteínas mal dobradas o que afeta significativamente as funções do RE, incluindo a regulação da homeostase do Ca^{2+} levando a uma situação de estresse do RE (4, 86, 87). Sob condições de "estresse do RE", a sobrevivência celular depende de benefícios homeostáticos, realizados por uma via de sinalização intracelular denominada de resposta à proteína mal dobrada (UPR - do inglês *Unfolded Protein Response*) (86-88).

A ativação da UPR induz programas de transcrição e tradução que restauram a homeostase do RE. No entanto, sob altos níveis ou estresse do RE crônico, essas mudanças adaptativas, em última análise, tornam-se ofuscadas por sinais alternativos, que levam as células ao processo de degeneração, culminando com a morte celular programada, implicada na etiologia e patogenia de inúmeras doenças (88).

A UPR é composta por três ramos principais controlados por proteínas transmembranas do RE, conhecidas como IRE-1 (do inglês - *inositol-requiring enzyme-1*), PERK (do inglês - *PKR-like ER-regulated kinase*) e a ATF6 (do inglês - *activating transcription factor 6*) (86).

Com o acúmulo de proteínas mal formadas e mal enoveladas no RE, a proteína regulada por glicose 78kDa (GRP78), também conhecida como proteína de ligação de imunoglobulinas (BiP), dissocia-se e posteriormente ocorre a sua dimerização (87). A função da GRP78 não é enovelar estas proteínas e sim mantê-las no RE num estado favorável ao processo de enovelamento (89). A dissociação da GRP78 permite a translocação da ATF6 para o complexo de golgi, onde é clivada em sua forma ativa por proteases no sítio-1 e no sítio-2 (S1P e S2P). A ATF6 ativada, em seguida, transloca-se para o núcleo na região de seu promotor o elemento de resposta ao estresse do RE (ERSE) para induzir a expressão de genes como de chaperonas e de fatores de transcrição do RE (Figura 11) (85).

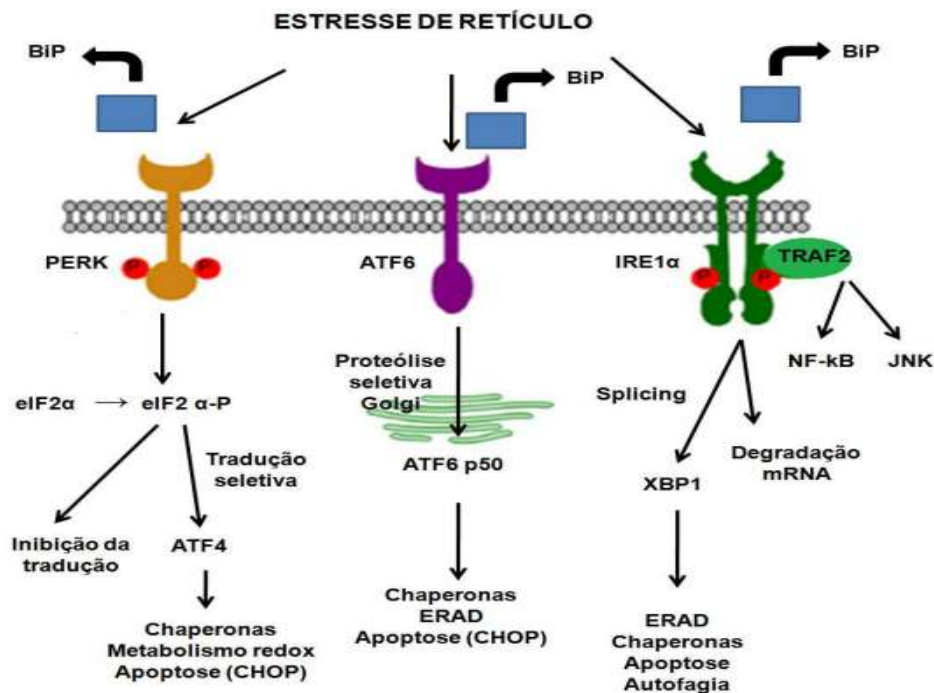


Figura 11. Via de sinalização em resposta às proteínas desdobradas no Retículo Endoplasmático.

Fonte: Adaptado (85, 89).

Além da função na transdução de sinais de sobrevivência e na defesa celular frente ao estresse do RE, a superexpressão da ATF6 pode estar relacionada para induzir a expressão da CHOP (do inglês, *CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein*) fator de transcrição sensível a condições de estresse que desempenha papel central na apoptose (85).

A resposta ao estresse do RE é um importante dispositivo homeostático para o fígado durante o início e na progressão da doença hepática crônica. O estresse do RE surge como uma característica comum e relevante para a patogênese de doenças associadas à fibrose, enquanto a fibrose é uma parte integrante de muitas das condições patológicas associadas com o estresse do RE (87).

Hepatócitos executam inúmeras funções metabólicas, incluindo a síntese e secreção de proteínas plasmáticas, montagem e secreção de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), metabolismo e biossíntese de colesterol, metabolismo de xenobióticos e, portanto, são enriquecidos de RE (liso e rugoso) (85).

Na fibrose hepática, presume-se que o estresse do RE atue de maneira paradoxal, incluindo a adaptação e a apoptose. Na presença de estímulos nocivos o estresse do RE atua como protetor criando condições de adaptação celular, porém a persistência e o aumento do estresse do RE contribuem para a apoptose celular, sendo que a apoptose de hepatócitos representa um fator profibrogênico e a apoptose das CEHs contribuiria para a resolução da fibrogênese (87, 90, 91).

O estresse do RE e as vias de sinalização das UPRs estão relacionadas com algumas das principais vias de resposta inflamatória na fibrose hepática, incluindo a ativação do NF-KB, JNK, EROs, TNF- α e TGF- β (87). Estudos recentes, sugerem o envolvimento do estresse do RE na progressão da fibrose hepática e na sua resolução (86, 87, 90, 91).

2.9 Inflamação

A maioria das doenças hepáticas agudas e crônicas são acompanhadas por inflamação hepática, um processo complexo que se origina em resposta a uma variedade de condições de estresse. A inflamação hepática é ativada para proteger os hepatócitos, favorecer a reparação dos danos nos tecidos, e promover o restabelecimento da homeostase, exercendo efeitos hepato consistentes. No entanto, as respostas inflamatórias mais intensas e por mais tempo, portanto crônicas, estão invariavelmente acompanhadas por perda maciça de hepatócitos o que causa grave dano ao parênquima hepático, frequentemente irreversível (4).

A hepatotoxicidade provocada pelo CCl_4 parece ser mediada pelo menos por dois processos sequenciais. A fase inicial envolve a sua desalogenação redutora, via citocromo P-450, para um radical livre altamente reativo, o $\bullet\text{CCl}_3$, que inicia a LPO, causando danos à membrana hepatocelular. A segunda fase esta implicada na liberação de mediadores inflamatórios, potencializando a lesão hepática induzida por CCl_4 (8, 92).

A indução de mediadores inflamatórios, no fígado de ratos expostos ao CCl_4 , incluindo fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) é orquestrada pelo fator nuclear-kappaB (NF-kB) (8, 92). A liberação contínua de mediadores inflamatórios regulados pelo NF-KB é descrita como um agravante para a lesão hepática induzida por CCl_4 (8).

A ativação do NF-KB tem sido demonstrada, pelo menos em parte, por ser responsável na condução da progressão da inflamação hepática para o desenvolvimento da cirrose e do carcinoma hepatocelular (93). O aumento do NF-KB promove a sobrevivência das CEHs por inibir a sua apoptose, através do reforço da transcrição de proteínas antiapoptóticas e pela regulação autócrina da angiotensina II (40).

Recente estudo têm revelado interconexões entre o estresse oxidativo e o estresse RE com vias inflamatórias em condições patológicas (94).

2.10 Angiogênese

As doenças hepáticas crônicas são caracterizadas por remodelação vascular intra-hepática com capilarização dos sinusóides, fibrogênese e desenvolvimento de shunts intra-hepáticos, o que leva a um aumento da resistência hepática, conseqüentemente, a um aumento da pressão portal e diminuição da perfusão eficaz dos hepatócitos e, portanto, a insuficiência hepática (95, 96).

A sinalização angiogênica é um componente chave na resposta de cicatrização na fibrose hepática, contribuindo para a produção de MEC e para a hipertensão portal, o que acarreta no desenvolvimento das principais complicações

da cirrose, como: varizes gastroesofágicas e hemorragia digestiva, ascite e peritonite bacteriana, e encefalopatia porto-sistêmica (38, 96).

A motilidade e a migração das CEHs promovem a cobertura em torno dos sinusóides, causando constrição sinusoidal e contribuindo para a resistência hepática na cirrose. O fenótipo característico do endotélio sinusoidal, que é a presença de fenestrações, é perdido, e uma membrana basal organizada é produzida. A deposição de colágeno no espaço de Disse acentua o estreitamento e a distorção do lume do sinusóide, restringindo ainda mais o fluxo sanguíneo microvascular. Esta situação é agravada por leucócitos, mecanicamente estreitados ou retidos nos sinusóides ou aderidos ao endotélio, como resultado da ativação de uma resposta inflamatória microvascular hepática (97).

Mediadores angiogênicos clássicos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), conduzem a respostas angiogênicas e fibrogênicas, e podem também promover um meio permissivo para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (38).

2.11 Melatonina

O aumento das EROs / ERNs e a teoria da ativa participação do estresse oxidativo na progressão da doença hepática crônica fortalecem as evidências da importância do equilíbrio redox celular, que pode ser alcançado através de uma eficiente barreira antioxidante celular (30). O uso de antioxidantes tem sido proposto como agentes terapêuticos, bem como de medicamentos coadjuvantes, para compensar os danos ao fígado (12, 16, 98-100).

A terapia antifibrótica ideal é aquela que é específica ao fígado e seletiva ao alvo da cascata fibrogênica, incluindo a: 1) redução da inflamação / dano oxidativo; 2) prevenção da ativação e ou da proliferação das CEHs; 3) redução da fibrogênese via TGF- β ; 4) estimulação da apoptose das CEHs/miofibroblastos e 5) promoção da degradação de MEC. Além disso, ao ser administrada, por um período de tempo prolongado, deve ser bem tolerada e não deve ser hepatotóxica. Além de evitar

progressão da fibrose, a terapia, deve também regredir a cicatriz, levando à estabilização ou melhora da função hepática (30, 40).

A n-acetil-5-metoxitriptamina (Figura 12), melatonina (MLT), é um neurohormônio de natureza indólica, derivada do triptofano. Foi considerada, por muito tempo, uma substância produzida apenas pela glândula pineal como hormônio, porém recentemente foi detectada em muitos outros tecidos (101, 102).

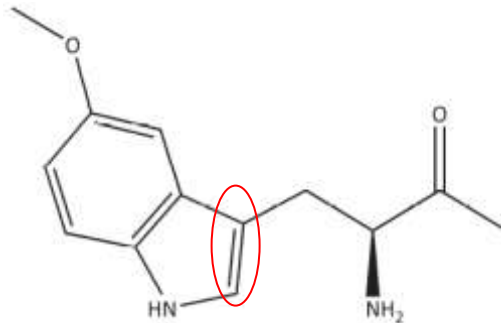


Figura 12. Estrutura da molécula de melatonina.

A MLT é o primeiro composto biologicamente ativo sintetizado pela glândula pineal. Sua produção ocorre ao longo de certos períodos do dia, inibida pela luz e estimulada na fase escura, é descrita como de secreção rítmica, exercendo efeitos cronobiológicos e atuando como relógio biológico mestre em mamíferos (103).

Assim, em humanos e outras espécies com atividade diurna, os níveis de MLT atingem o pico máximo entre as 3 e as 4 horas da noite, enquanto os níveis diurnos são indetectáveis ou muito baixos (104).

Sua síntese é controlada pelo núcleo supraquiasmático, situado no hipotálamo. É sintetizada a partir do aminoácido triptofano. O triptofano é captado na circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), com posterior formação da serotonina. Subsequentemente, forma-se a n-acetilserotonina, catalisada pela ação da enzima arilalquilamina n-acetiltransferase (AA-NAT). Finalmente, a n-acetilserotonina torna-se substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), resultando como produto final a MLT (Figura 13) (103, 105).

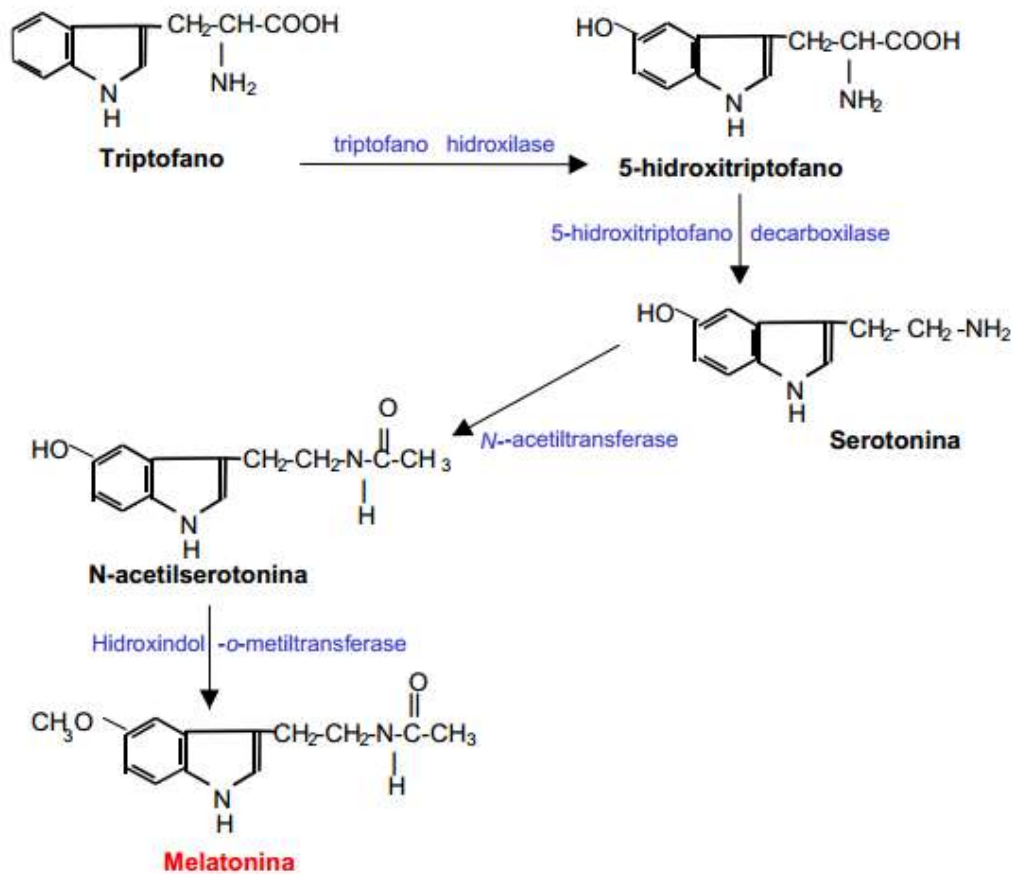


Figura 13. Biossíntese da melatonina.
Fonte: (103, 106).

Os primeiros estudos acerca da MLT foram realizados por Aaron Lerner e colaboradores, no final da década de 50, quando foi isolada e caracterizada como um hormônio produzido pela glândula pineal (107).

Atualmente, sabe-se que a MLT é uma molécula amplamente produzida e universalmente distribuída, com múltiplas funções em todos os órgãos e organismos (102, 108). A MLT está presente em todos os organismos vivos, desde bactérias primitivas até em humanos. Devido à sua ampla distribuição em plantas, produtos vegetais e na dieta natural, a MLT nos EUA e em vários outros países é classificada como um suplemento alimentar. Sua disponibilidade é ilimitada e o preço acessível na forma pura (109).

A MLT possui características hidrofílicas e lipofílicas e pode passar facilmente através de barreiras biológicas, incluindo a maior parte da barreira sanguínea, do

cérebro ou da placenta (103, 110). Com potencial de afetar várias vias de sinalização intracelulares e proteger células saudáveis contra diferentes tipos de danos (103). A capacidade antioxidante da MLT está localizada nos carbonos 2 e 3 do anel pirrólico, que possuem alta capacidade de doar elétrons, propriedade reconhecida pela primeira vez em 1993 (111).

A capacidade da MLT como *scavenger* de radicais livres e prevenir danos no tecido associado ao estresse oxidativo foi quase um achado acidental. A mais de duas décadas, surgiram os primeiros relatos indicando sutis ações da MLT em diversos órgãos e tecidos, porém com poucas explicações descritas. Isso impulsionou estudos para testar e comprovar a capacidade desta indolamina como “varredora” de radicais livres, entre eles o radical hidroxila ($^{\circ}\text{OH}$). Posteriormente diversos estudos comprovaram a capacidade da MLT em atuar sobre outras EROs e de ERNs (106, 112, 113).

Estudos recentes mostraram que a MLT exógena exerce seus efeitos citoprotetores em diferentes modelos experimentais, isto é, especialmente verdadeiro para lesões hepáticas agudas e crônicas onde reduz a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (102, 106, 114, 115). A MLT protege o fígado, tal como em outros tecidos, agindo contra radicais livres persistentemente produzidos (16, 116). Esses estudos mostram os efeitos hepatoprotetores da MLT, onde animais privados, em parte, da sua capacidade de produzir endogenamente quantidades fisiológicas de MLT, aumentam os níveis de dano oxidativo (112). Até o momento não há relatos de toxicidade grave com o uso da MLT, que é amplamente utilizada em situações clínicas.

Os efeitos da MLT, tanto fisiológicos quanto farmacológicos, parecem depender de processos dependentes e independentes de seus receptores celulares (108, 117). Funções dependentes do receptor incluem a regulação do ritmo circadiano, sono e inibição do câncer. As ações independentes de receptores relacionam-se com a capacidade da MLT para atuar sobre os radicais livres, protegendo, assim, as moléculas dos efeitos destrutivos do estresse oxidativo (118).

Esta proteção nos hepatócitos, ocorre pela sua atividade de eliminação direta de radicais livres, um processo que é independente de receptor, e por uma via de

estimulação das enzimas antioxidantes, ação indireta mediada por receptores, a cascata antioxidante (102, 108).

A regulação do sono é considerada a principal função da MLT, entretanto não é a única. Estudos experimentais e clínicos mostram que a MLT possui potente efeito antioxidante (119-121), significativa atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (119, 122, 123) e propriedades oncostáticas (124-126), além de modular vários fatores de transcrição, como do NF-KB, fator induzível de hipóxia (HIF) e o Nrf2 (103, 127). Testes preliminares em seres humanos revelaram que a MLT é eficaz na prevenção da colite ulcerativa, câncer do cólon, na doença hepática gordurosa não alcoólica e nas complicações associadas à ressecção parcial do fígado (102). Entretanto, o mecanismo exato da ação da MLT não é ainda claramente compreendido (128).

Na prática clínica a MLT já é usada há muitos anos, sendo segura e bem tolerada mesmo em doses elevadas atravessando facilmente a barreira hematoencefálica (109). É prescrita para aumentar a eficiência do sono, tratar o *jet lag*, melhorar o sistema cardiovascular, como droga antienvhecimento e como suplemento dietético (104).

Justifica-se o desenvolvimento deste trabalho, uma vez que a cirrose hepática está associada com um risco elevado de mortalidade e o transplante de fígado nem sempre está disponível em tempo hábil, portanto a inibição de mecanismos fibrogênicos representa importantes alvos moleculares da ação terapêutica, contribuindo para um apoio temporário a pacientes que aguardam um transplante de fígado. A disponibilidade de uma terapia alternativa, clinicamente será de grande valia, se ao menos conseguir bloquear a progressão da fibrose, preservando a função hepática e diminuindo as complicações decorrentes da cirrose descompensada ou se a necessidade de transplante hepático possa ser adiada ou evitada.

3 MARCO CONCEITUAL

No fígado os efeitos tóxicos do CCl_4 são mediados principalmente através da produção de radicais livres que exercem efeitos deletérios, causando dano às células hepáticas.

A combinação e a persistência do estresse oxidativo e do estresse do RE podem ativar outras vias intracelulares e iniciar o processo inflamatório, fibrogênico e angiogênico que culminam com a cirrose hepática (Figura 14).

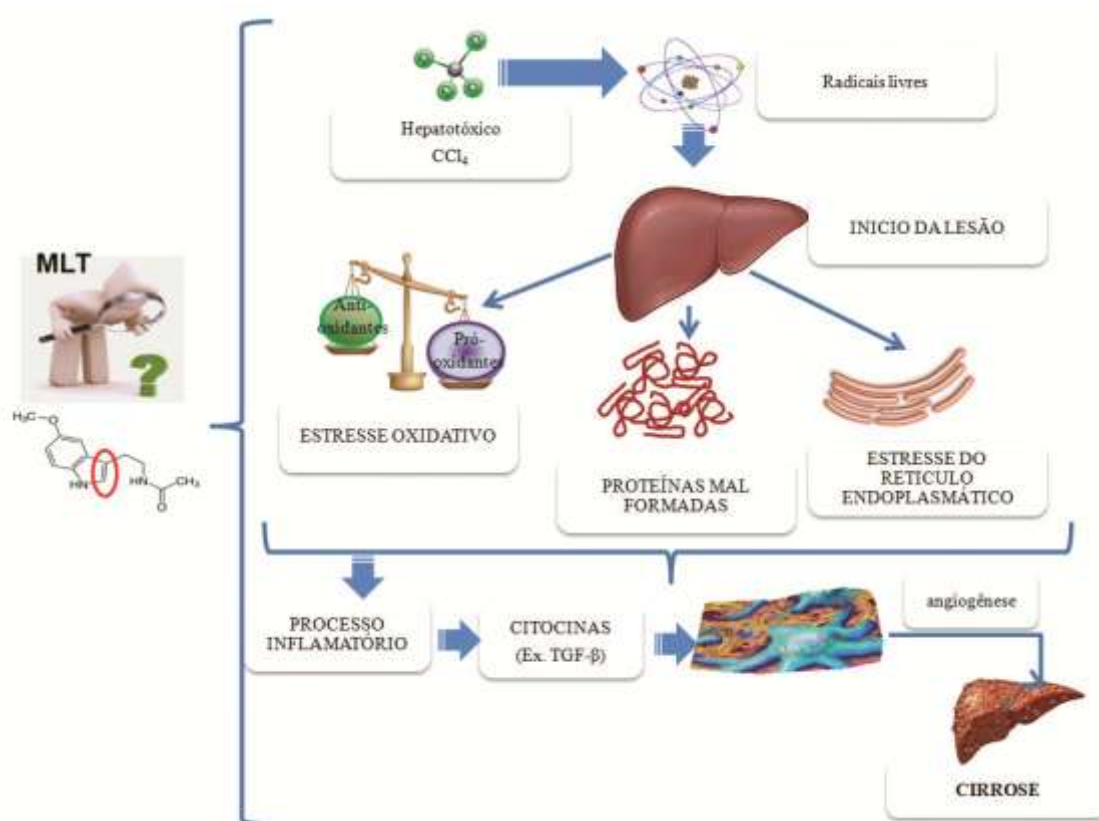


Figura 14. Marco conceitual, construído a partir da base teórica que sustenta o estudo.

Fonte: Autor.

A capacidade da MLT em atuar sobre os radicais livres, a sua propriedade de anfipilicidade, ou seja, é capaz de difundir-se tanto em meios hidrofílicos quanto lipofílicos. E por não apresentar efeitos colaterais e de toxicidade, caracteriza esta molécula como um antioxidante ideal, principalmente como agente terapêutico em doenças com o envolvimento do estresse oxidativo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da MLT na cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos machos *Wistar*.

4.2 Específicos

4.2.1 Objetivos específicos do artigo I

Respondidos no artigo intitulado, "*Protective effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity*", que tem como objetivo geral: Avaliar a ação da MLT na lesão hepática induzida por CCl₄ em ratos, sobre o estresse oxidativo, estresse do RE e no dano celular.

- 1) Avaliar a integridade hepática nos animais dos diferentes grupos através da análise das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA);
- 2) Avaliar a LPO no tecido hepático através do TBARS nos diferentes grupos em estudo;
- 3) Determinar no tecido hepático a atividade enzimática da SOD nos diferentes grupos em estudo;
- 4) Quantificar a expressão das proteínas Keap1, Nrf2, GRP78, ATF6, HSF1 e HSP70 nos animais dos diferentes grupos em estudo.

4.2.2 Objetivos específicos do artigo II

Respondidos no artigo intitulado, "*Antioxidant protection of melatonin in process fibrogenic in rats exposed to carbon tetrachloride*". Que tem como objetivo geral: Avaliar a ação da MLT na cirrose hepática induzida por CCl₄ em ratos, sobre

aspectos de dano oxidativo, processo inflamatório, citocinas fibrogênicas e angiogênicas.

- 1) Avaliar a LPO no tecido hepático através da medida da concentração de F2-isoprostanos nos diferentes grupos em estudo;
- 2) Avaliar no tecido hepático a expressão da proteína antioxidante NQO1 nos animais dos diferentes grupos em estudo;
- 3) Avaliar no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo, o processo inflamatório, através do estudo histológico pela coloração de hematoxilina e eosina e através da expressão das proteínas NF-KB/p65 e da iNOS;
- 4) Avaliar no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo, o processo fibrogênico, através do estudo histológico pela coloração por picrossírius e através da expressão das proteínas TGF- β 1 e da α -SMA;
- 5) Avaliar no tecido hepático dos diferentes grupos em estudo, o processo angiogênico, através da expressão da proteína VEGF.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bartoletti M, Giannella M, Caraceni P, Domenicali M, Ambretti S, Tedeschi S, et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 2014;61(1):51-8.
2. Leon DA, McCambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet.* 2006;367(9504):52-6.
3. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008;371(9615):838-51.
4. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013;59(3):583-94.
5. Lenna S, Han R, Trojanowska M. Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life.* 2014.
6. Laleman W, Vander Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, et al. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest.* 2006;36(4):242-9.
7. Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, et al. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res.* 2010;49(2):193-200.
8. Lee IC, Kim SH, Baek HS, Moon C, Kim YB, Yun WK, et al. Protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity through activation of Nrf2. *Environ Toxicol.* 2013.
9. Rashid K, Sinha K, Sil PC. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:584-600.
10. Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology (Baltimore, Md.)* 1983;3(1):112-20.
11. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhaes R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, et al. [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arquivos de gastroenterologia.* 2001;38(1):40-7.
12. 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. *Arquivos de gastroenterologia.* 2008;45(2):156-62.
13. Jimenez W, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 1992;7(1):90-7.
14. Cameron TW. Parasites of Animals and the Public Health in North America. *American journal of public health and the nation's health.* 1936;26(1):46-50.

15. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:762920.
16. da Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler Z, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats *Arquivos de Gastroenterologia.* 2010;47.
17. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003;189(1-2):113-27.
18. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro 2004.
19. Ramaiah SK, Apte U, Mehendale HM. Cytochrome P450E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(8):1088-95.
20. Friedman SL, Arthur MJP. Reversing Hepatic Fibrosis. *Science & Medicine.* 2002.
21. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
22. Rosen CB, Pimentel SK. Anatomia e fisiologia do fígado. In: Coelho J, editor. *Aparelho digestivo: Clínica e cirurgia.* 2. 4 ed. São Paulo: Athneú; 2012. p. 2142.
23. David Cd. A quercetina protege o fígado na lesão hepática induzida por tioacetamida (TAA) e suas complicações. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
24. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38 Suppl 1:S38-53.
25. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88(1):125-72.
26. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:425-56.
27. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38 Suppl 1:S38-53.
28. Toth CA, Thomas P. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology.* 1992;16(1):255-66.
29. Sherlock S, Dooley J. *Doenças do fígado e do sistema biliar.* Rio de Janeiro 2004.
30. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.* 2012;19(28):4850-60.

31. Rockey DC. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(3):224-31.e1-5.
32. Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, et al. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000;118(6):1149-56.
33. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):351-72.
34. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2014;548:20-37.
35. Rahimi RS, Rockey DC. Complications of cirrhosis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012;28(3):223-9.
36. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med.* 2006;10(1):76-99.
37. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(2):209-18.
38. Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(8):425-36.
39. Zhan S, Rockey DC. Tumor necrosis factor α stimulates endothelin-1 synthesis in rat hepatic stellate cells in hepatic wound healing through a novel IKK/JNK pathway. *Exp Cell Res.* 2011;317(7):1040-8.
40. Fallowfield JA. Therapeutic targets in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G709-15.
41. Gawrieh S, Papouchado BG, Burgart LJ, Kobayashi S, Charlton MR, Gores GJ. Early hepatic stellate cell activation predicts severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(10):1207-13.
42. Russo MW, Firpi RJ, Nelson DR, Schoonhoven R, Shrestha R, Fried MW. Early hepatic stellate cell activation is associated with advanced fibrosis after liver transplantation in recipients with hepatitis C. *Liver Transpl.* 2005;11(10):1235-41.
43. Rockey DC, Friedman SL. Chapter 6 - Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In: Thomas DB, Md, Teresa LW, Michael P. Manns MD, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology (Fifth Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2006. p. 87-109.
44. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol.* 2007;45(1):43-50.
45. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247-50.

46. Bona S. Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos. Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
47. Snowdon VK, Fallowfield JA. Models and mechanisms of fibrosis resolution. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(5):794-9.
48. Cameron J, Karunarete W. Tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration *J Pathol Bacteriol* [Internet]. 1936; 42:[1-21 pp.].
49. Bona S, Moreira AJ, Oliveira M, Marroni CA, Marroni NP. Cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono: Modelo inalatório e intraperitoneal. In: Marroni NP, Morgan-Martins MI, Porowski M, editors. *Radicais livres no processo saúde-doença: da bancada à clínica.* Curitiba: CRV; 2012. p. 182.
50. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:762920.
51. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003;48(4):824-9.
52. del Río E, Rojo L, Vilanova E. Carbon Tetrachloride. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition).* Oxford: Academic Press; 2014. p. 687-90.
53. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol.* 2003;23(2):103-8.
54. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology.* 2003;33(2):105-36.
55. Brattin WJ, Glende EA, Jr., Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of free radicals in biology & medicine.* 1985;1(1):27-38.
56. Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2009;15(25):3086-98.
57. Pavanato MA. Ação protetora da quercetina no fígado de ratos cirróticos. Porto Alegre: UFRGS; 2004.
58. Lee ES, Lee HE, Shin JY, Yoon S, Moon JO. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 2003;55(8):1169-74.
59. Calfee-Mason KG, Spear BT, Glauert HP. Vitamin E inhibits hepatic NF-kappaB activation in rats administered the hepatic tumor promoter, phenobarbital. *J Nutr.* 2002;132(10):3178-85.

60. Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, et al. The role of food restriction on CCl₄-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2007;58(5):331-7.
61. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B.* 1991;8(2):211-8.
62. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984;219(1):1-14.
63. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257-65.
64. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
65. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta.* 2006;1758(8):994-1003.
66. Urtasun R, Nieto N. [Hepatic stellate cells and oxidative stress]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99(4):223-30.
67. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS letters.* 1995;369(2-3):131-5.
68. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997;6(4):391-7.
69. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577-86.
70. Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):637-44.
71. Itoh K, Ishii T, Wakabayashi N, Yamamoto M. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free Radic Res.* 1999;31(4):319-24.
72. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76-86.
73. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(10):1199-207.
74. Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys.* 2006;454(1):7-15.

75. Zhang L, Wei W, Xu J, Min F, Wang L, Wang X, et al. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation in vivo as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. *J Pineal Res.* 2006;40(4):326-31.
76. Briskey DR, Wilson GR, Fassett RG, Coombes JS. Optimized method for quantification of total F(2)-isoprostanes using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;90:161-6.
77. Bellaye PS, Burgy O, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacol Ther.* 2014;143(2):119-32.
78. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18(12):571-3.
79. De Maio A, Santoro MG, Tanguay RM, Hightower LE. Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones.* 2012;17(2):139-43.
80. Bozaykut P, Ozer NK, Karademir B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radic Biol Med.* 2014.
81. Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;136(3):354-74.
82. Ashkenazi L, Haim A. Light interference as a possible stressor altering HSP70 and its gene expression levels in brain and hepatic tissues of golden spiny mice. *J Exp Biol.* 2012;215(Pt 22):4034-40.
83. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 2001;15(7):1118-31.
84. Gehrman M, Cervello M, Montalto G, Cappello F, Gulino A, Knape C, et al. Heat shock protein 70 serum levels differ significantly in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Front Immunol.* 2014;5:307.
85. Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2012;134(3):306-16.
86. Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015.
87. Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Huang Y, Li J. Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm Res.* 2014.
88. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol.* 2011;54(4):795-809.

89. Hetz C, Glimcher LH. Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Mol Cell*. 2009;35(5):551-61.
90. Hernández-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. *J Hepatol*. 2013;59(1):98-104.
91. De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, Taffetani S, Saccomanno S, Rychlicki C, et al. Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution. *Liver Int*. 2012;32(10):1574-84.
92. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*. 1989;43(1):139-54.
93. Robinson SM, Mann DA. Role of nuclear factor kappaB in liver health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118(12):691-705.
94. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ravanan P. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:213.
95. Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*. 2009;50(3):604-20.
96. Kim MY, Cho MY, Baik SK, Park HJ, Jeon HK, Im CK, et al. Histological subclassification of cirrhosis using the Laennec fibrosis scoring system correlates with clinical stage and grade of portal hypertension. *J Hepatol*. 2011;55(5):1004-9.
97. Barbosa-Silva MC, Barros AJ, Larsson E. Phase angle reference values for Brazilian population. *International Journal of Body Composition Research*. 2008;6:1.
98. Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2004;44(7-8):575-86.
99. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *The Journal of nutrition*. 2009;139(7):1339-46.
100. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(10):1939-46.
101. Fevre-Montange M. [Melatonin]. *Presse Med*. 1985;14(31):1659-63.
102. Brzozowski T, Jaworek J. Editorial: basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. New advancements and future perspectives. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):4785-7.
103. Palomo AG. Análisis in vitro del efecto oncostático de la melatonina en hepatocitos tumorales de la línea HepG2 Espanha: Universidad de León; 2013.

104. Carbajo-Pescador S. Efecto de la melatonina sobre la proliferación, apoptosis y angiogénesis en un modelo in vitro de hepatocarcinoma Espanha: Universidad León; 2013.
105. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131(3409):1312.
106. Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48):6087-97.
107. Lerner AB, Case JD, Mori W, Wright MR. Melatonin in peripheral nerve. *Nature*. 1959;183:1821.
108. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Liu X, Tan DX. Melatonin in the biliary tract and liver: health implications. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):4788-801.
109. Tan DX, Korkmaz A, Reiter RJ, Manchester LC. Ebola virus disease: potential use of melatonin as a treatment. *J Pineal Res*. 2014;57(4):381-4.
110. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*. 2011;51(1):1-16.
111. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*. 1993;70(1-2):65-71.
112. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Calvo JR. Antioxidant capacity of melatonin. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Handbook of Antioxidantes*. 1. 2 ed. Marcel Dekker: New York; 2002. p. 712.
113. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol*. 2014;5:377.
114. Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Munoz-Castaneda JR, Caballero FJ, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res*. 2005;39(2):143-50.
115. Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res*. 2004;37(2):78-84.
116. El-Missiry MA, Fayed TA, El-Sawy MR, El-Sayed AA. Ameliorative effect of melatonin against gamma-irradiation-induced oxidative stress and tissue injury. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2007;66(2):278-86.
117. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2014;20(2):293-307.
118. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(5):325-33.

119. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2013.
120. Arendt J. *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. London: Chapman & Hall; 1995.
121. Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(1):72-8.
122. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2012.
123. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine*. 2005;27(2):189-200.
124. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2011;5(2):109-23.
125. Girish KS, Paul M, Thushara RM, Hemshekhar M, Shanmuga Sundaram M, Rangappa KS, et al. Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(1):198-204.
126. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(16):2997-3025.
127. Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):10979-97.
128. Raza H, John A, Brown EM, Benedict S, Kambal A. Alterations in mitochondrial respiratory functions, redox metabolism and apoptosis by oxidant 4-hydroxynonenal and antioxidants curcumin and melatonin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;226(2):161-8.

6 ARTIGOS DA TESE

6.1 Artigo I: Protective effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity.

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN ON CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED CHRONIC HEPATOTOXICITY

SILVIA BONA ^{1,2}, ANDREA JANZ MOREIRA ^{1,3}, GRAZIELLA RODRIGUES ^{1,2},
THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA¹, CLAUDIO AUGUSTO MARRONI ^{1,4}, NORMA
POSSA MARRONI ^{1,2,3,5}

¹ *Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil.*

² *Postgraduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.*

³ *Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil.*

⁴ *Postgraduate Program in Liver Diseases, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil*

⁵ *Postgraduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas-RS, Brazil*

Running title: Melatonin antioxidant protection

Bona et al.

Address correspondence to: Norma Possa Marroni, Rua José Kanan Aranha, 102, 91760470, Porto Alegre-RS, Brazil; Phone: 55 51 99643011; Fax: 55 51 32483202; e-mail: nmarroni@terra.com.br.

ABSTRACT

Melatonin (MLT) is a potent antioxidant molecule that is shown to have a beneficial effect in various pathological situations, due to its action against free radicals. Objectives: To evaluate the effect of MLT on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver injury in rats in terms of oxidative stress, reticular stress, and cell damage. Methods: Twenty male Wistar rats (230 - 250 g) four groups: I: control (CO), II: CO+MLT, III: CCl₄, and IV: CCl₄+MLT. CCl₄ was administered as follows: ten doses every five days, ten every four days, and seven every three days. MLT was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg from the 10th week to the end of the experiment (16th week). Results: MLT was able to reduce the release of liver enzymes in the bloodstream and to decrease oxidative stress in the CCl₄+MLT group by decreasing the level of thiobarbituric acid reactive substances and increasing superoxide dismutase activity; additionally, it increased the expression of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and decreased the expression of Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). MLT also decreased the expression of the proteins that endoplasmic reticulum stress, i.e., glucose-regulated protein 78 (GRP78) and activating transcription factor 6 (ATF6), as well as of heat shock factor 1 and heat shock protein 70 (HSP 70). Conclusion: MLT had a hepatoprotective effect in an experimental model of CCl₄-induced liver injury, since it modulated oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and HSP70 expression.

Key words: liver injury, cell damage, antioxidant

1 Introduction

Carbon tetrachloride (CCl₄) is a widely studied hepatotoxic drug commonly used as an experimental model to evaluate different stages of liver disease and thus define therapeutic strategies. The liver plays a key role in the metabolism of xenobiotics, which results in the formation of an excessive number of free radicals and reactive oxygen species (ROS) [1]. This process have a toxic effect on liver cells, promoting steatosis, fibrosis, cirrhosis, and ultimately cell death (centrilobular necrosis), in addition to causing changes in the antioxidant defense mechanism and consequent alteration in cellular redox homeostasis [2].

Cellular homeostasis can be disrupted by a variety of stimuli, including metabolic imbalance, oxidative stress, and folding of malformed proteins. In response to these stressors,

cells induce specific molecular pathways that usually involve the activation of signaling cascades or changes in gene expression. These responses allow cells to adapt to stress and to regain homeostasis. However, if stress is intense or prolonged, the cells are unable to reestablish homeostasis and, in turn, activate pathways that result in cell death [3].

Persistent disturbances in cellular metabolism may impair protein synthesis by the endoplasmic reticulum (ER), causing the intraluminal accumulation of misfolded proteins, which significantly affects the functions of the ER, including the regulation of Ca²⁺ homeostasis. This leads to ER stress and induces the activation of the intracellular signaling pathway called unfolded protein response (UPR), which contributes to the pathogenesis of several chronic diseases [4, 5].

Among the several antioxidants used for liver protection against damage mediated by free radicals, there is melatonin (MLT), a widely produced and ubiquitously distributed molecule with multiple functions in all organs and organisms, one of which is protecting the liver against persistently produced free radicals. This hepatocyte protection occurs because MLT directly scavenges free radicals, a process that is not dependent on the receptor, and participates in the stimulation of antioxidant enzymes, an indirect, receptor-mediated action (antioxidant cascade) [6, 7]. MLT has protective functions in the gastrointestinal tract and in the hepatobiliary system [7]; additionally, preliminary human trials showed that it is effective in preventing ulcerative colitis, colon cancer, non-alcoholic fatty liver disease, and complications associated with partial liver resection in humans [7]. These studies may be of great medical interest because chronic liver injury is associated with a high risk of mortality and liver transplantation is not always available in a timely manner; therefore, molecular therapy with MLT should be targeted at inhibiting oxidative stress and/or intervening directly on pathways that increase antioxidant defenses, contributing as a temporary therapeutic support to patients waiting for a liver transplant [8]. Thus, advanced studies on the action of MLT on liver diseases can bring basic studies closer to clinical reality.

The aim of this study was to evaluate the effect of MLT on CCl₄-induced liver injury in rats in terms of oxidative stress, reticular stress, and cell damage.

2 Materials and Methods

2.1 Animal Experiments and Drug Treatment

Twenty male Wistar rats with an average weight of 230-250 g were used. The animals were housed at 22°C with 12-hour light-dark cycles, had free access to water, and received a restricted diet (16 g of chow per day for each animal).

All experiments were performed in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS) and the Committee of Ethics and Research in Health of the Graduate and Research Group of Hospital de Clinicas de Porto Alegre under protocol number 100316.

The animals were divided into four groups: CO: control group, CO+MLT: control group receiving MLT, CCl₄: group treated with CCl₄, and CCl₄+MLT: group treated with CCl₄ and MLT. The CCl₄ and CCl₄+MLT groups received 27 intraperitoneal doses of 0.5 ml of CCl₄ dissolved in mineral oil (1:6). The first ten doses were given at an interval of five days, the following ten at an interval of four days, and the last seven at an interval of three days [9]. In order to promote cytochrome P450 enzyme induction, phenobarbital was added to the drinking water of each animal at a concentration of 0.3 g/L seven days before the first application and throughout the experiment [10].

MLT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was administered intraperitoneally to the MLT and CCl₄+MLT groups at a dose of 20 mg/kg/day from the 10th week to the end of the experiment (16th week) [11].

After 24 hours from the last administration of CCl₄, the animals were anesthetized with 1% xylazine and 10% ketamine, and then we collected blood samples from the retro-orbital plexus. Liver samples were obtained for the remaining analyzes. At the end of the experiment, the animals were killed under deep anesthesia by exsanguination, as described in the guidelines of the American Veterinary Medical Association (AVMA) on Euthanasia [12].

2.2 Biochemical Analysis

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) (U/L) and aspartate aminotransferase (AST) (U/L) were determined by kinetic UV test. Alkaline phosphatase (AP) (U/L) were quantified by colorimetric kinetic test. The levels of these enzymes were measured using routine laboratory methods of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre by enzymatic method (automated – Siemens Advia 1800 Chemistry system).

2.3 Lipid Peroxidation (LPO) and Cytosolic Superoxide Dismutase (SOD)

Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Protein concentration in liver homogenates was determined using a bovine albumin solution [13]. LPO was determined by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmol/mg protein) [14]. Spectrophotometric absorbance in the supernatant was measured at 535 nm. Cytosolic SOD (EC 1.15.1.1) was assayed according to [15]. The auto-oxidation rate of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibited 50% of epinephrine auto-oxidation was defined as 1 U of SOD activity.

2.4 Western Blot

Western blot analysis was performed in cytosolic and nuclear extracts prepared from liver homogenates as previously described [16]. The supernatant fraction was collected and stored at -80°C in aliquots until use. Protein concentration was measured according to [13]. Lysate proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes [17]. The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature and probed overnight at 4 °C with polyclonal antibodies against nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) (SC30915/57kDa), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (SC33569/69kDa), activating transcription factor 6 (ATF6) (SC166659/90kDa), and 78kDa glucose-regulated

protein (GRP78) (SC376768/78kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a dilution of 1:200-1,000 with TTBS in 5% nonfat dry milk. Antibodies against heat shock factor 1 (HSF1) (H4163/75kDa) and heat shock protein 70 (HSP70) (H5147/73 and 72kDa) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) were used at a dilution of 1:5,000 with TTBS in 5% nonfat dry milk, as well as antibodies against β -actin (A5060/42kDa) and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G9545/37kDa) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at a dilution of 1:2,000 with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4,000). Protein detection was performed via chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) [16]. The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer Software (Scion Image, Maryland, MA).

2.5 Statistical Analysis

Means and standard deviations (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significances was assessed using Tukey's test. P-values < 0.05 were deemed significant. All analyses were carried out using Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3 Results

3.1 Effect of MLT on Liver Function

We evaluated the hepatoprotective activity of MLT against CCl₄-induced liver injury in rats (Table 1). Serum levels of the three enzymes under study (AST, ALT and AP) were significantly increased by chronic exposure to CCl₄ compared with the control groups, indicating the presence of hepatocellular injury. Conversely, treatment with MLT appears to have a hepatoprotective effect, greatly reducing the levels of the enzymes under study in the bloodstream as compared with the CCl₄ group.

Table 1 - Effect of MLT on liver function, lipid peroxidation and superoxide dismutase activity

Parameters	CO	CO+MLT	CCl₄	CCl₄+MLT
AST (mg/dL)	175.4±34.4	161.8±20.3	1016.8±340.8 ^a	519.6±127.5 ^b
ALT (mg/dL)	50.2±5.6	43.8±6.6	270±90.8 ^a	177±42.7 ^b
AP (mg/dL)	80.2±25.4	75±14.3	395±130.8 ^a	238±24.5 ^b
TBARS (nmoles/mgProt)	0.18±0.01	0.15±0.01	0.29±0.03 ^a	0.18±0.05
SOD (U SOD/mg protein)	12.84±1.09	11.43±0.7	9.32±0.3 ^a	13.18±1.6

Data expressed as mean ± SD. ^a $P < 0.05$ indicates a significant difference as compared with the CCl₄ group; ^b $P < 0.05$ indicates a significant difference as compared with the CCl₄+MLT group.

3.2 Effect of MLT on LPO and SOD Activity

The extent of LPO in the liver was assessed by the TBARS method. As shown in Table 1, there was a significant increase in the concentration of TBARS and a significant decrease in SOD activity in the CCl₄ group compared with the control groups. However, treatment with MLT reduced LPO and restored SOD activity in the CCl₄+MLT group in comparison with the CCl₄ group, due to the antioxidant action of MLT.

3.3 Effects of MLT on Keap1/Nrf2 Pathway Regulation

As shown in Figure 1, Nrf2 expression was significantly reduced in the CCl₄ group compared with the control groups, but was significantly increased in the CCl₄+MLT group compared with the CCl₄ group. Nrf2 nuclear translocation, along with the action of MLT, provides cellular protection against hepatotoxicity generated by CCl₄. Furthermore, cytoplasmic Keap1 expression was significantly increased in the CCl₄ group and significantly reduced in the CCl₄+MLT group compared with the CCl₄ group.

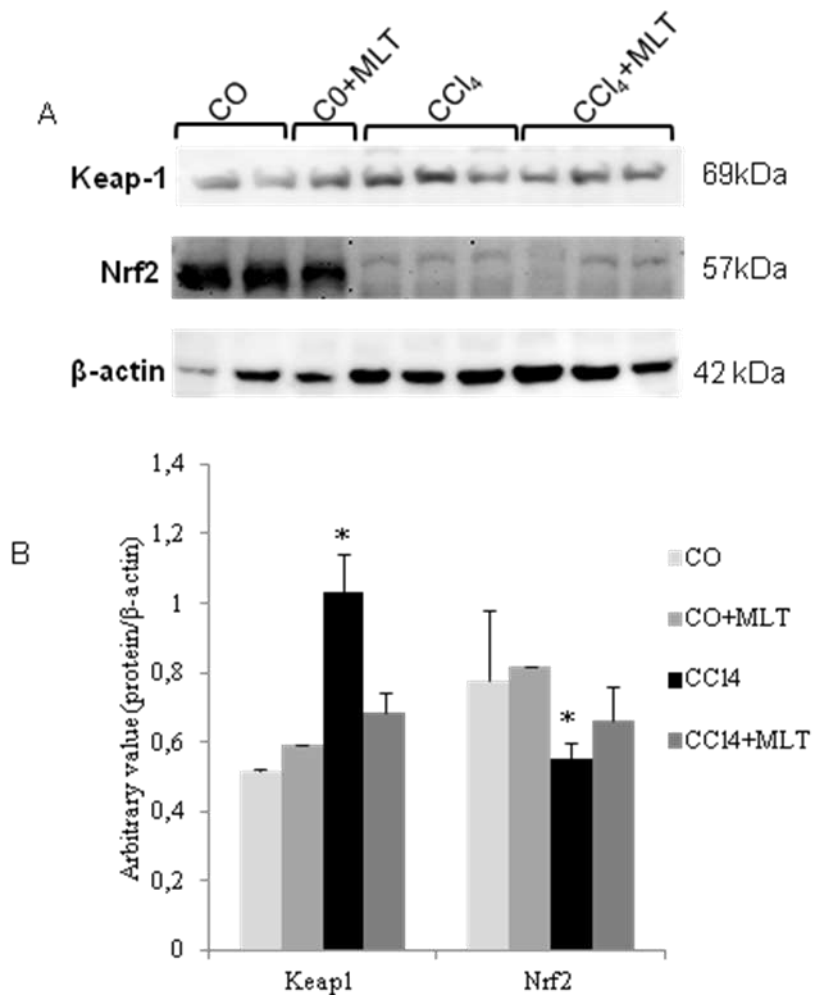


Figure 1 - Western blot (WB) analysis. (A) Cytoplasmic and nuclear fractions were analyzed by WB with antibodies against Kelchlike-ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2), and β -actin. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

* $P < 0.05$ CCl₄ versus other groups.

3.4 Effects of MLT on Prognostic Markers of ER Stress

Next, we investigated the expression of ATF6 and GRP78, both of which are involved in ER stress. The expression of these proteins was significantly elevated in the CCl₄ group relative to the control groups, but was significantly reduced in the CCl₄+MLT group (Figure 2).

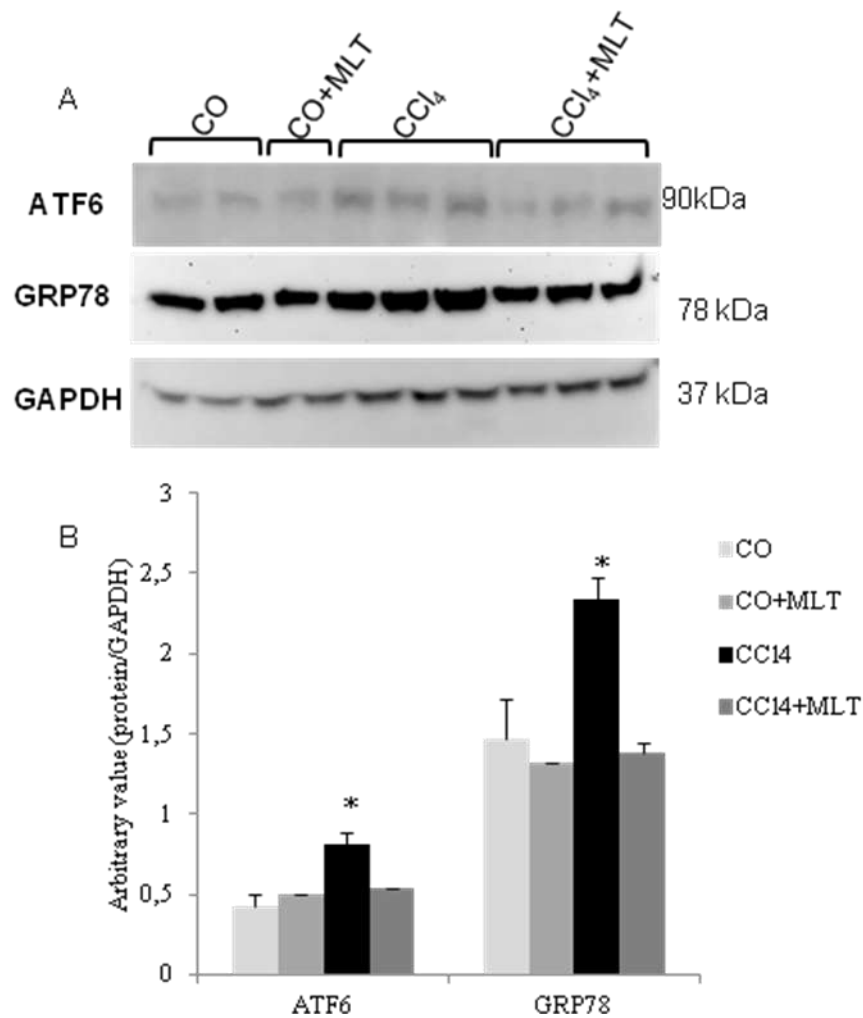


Figure 2 - Western blot (WB) analysis. (A) Nuclear and cytoplasmic fractions were analyzed by WB with antibodies against activating transcription factor 6 (ATF6), glucose-regulated protein 78 (GRP78), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

* $P < 0.05$ CCl₄ versus other groups.

3.5 Effect of MLT on HSP70 and HSF1

Stressful insults, such as exposure to toxic agents, stimulate HSF1 to act as a master activator of the response of heat shock proteins (HSPs), including HSP70 [18]. HSF1 and HSP70 expressions were significantly higher in animals from the CCl₄ group compared with the control groups and significantly reduced in animals from the CCl₄+MLT group compared with the CCl₄ group (Figure 3).

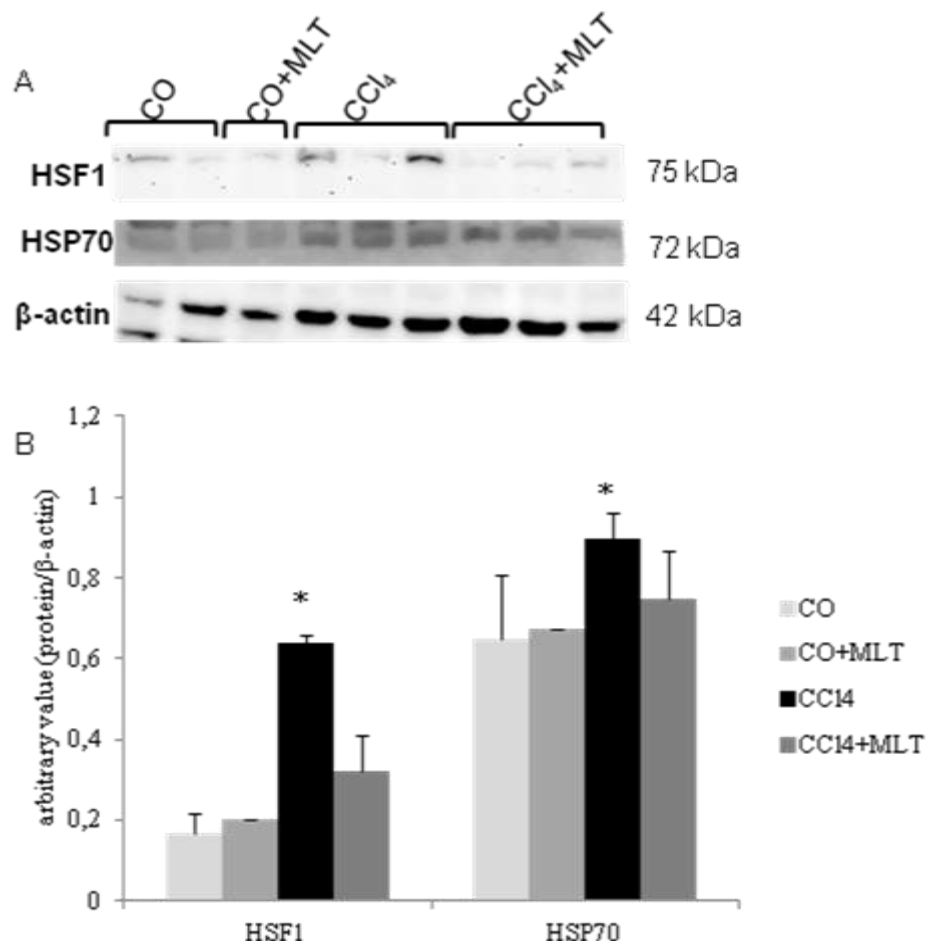


Figure 3 - Western blot analysis. (A) Nuclear and cytoplasmic fractions were analyzed by WB with antibodies against heat shock factor 1 (HSF1), heat-shock protein (HSP70), and β -actin. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

* $P < 0.05$ CCl₄ versus other groups.

4 Discussion

Since the liver is the main organ responsible for the metabolism of drugs and toxic chemicals, it is also the target organ for most of these toxic compounds. Liver damage was induced using an experimental model of injury chemically induced by CCl₄. MLT, an indoleamine compound synthesized from tryptophan, was used as a therapeutic strategy [6, 7, 19-22]. Among the many effects attributed to MLT, the most important are its potent antioxidant effect [20, 23], its significant anti-inflammatory and immunomodulatory activity [23-25], and its oncostatic properties [26, 27].

Liver enzymes (AST, ALT and AP) are markers of toxicity and severity of liver damage, its release into the bloodstream is related to the damage the hepatic parenchyma [28].

In the present study, chronic exposure to CCl₄ induced liver injury, as evidenced by the significant increase in the liver enzymes under study. Treatment with MLT decreases the release of these enzymes in the bloodstream, showing hepatoprotective effect and possibly improving liver architecture. Other studies reported that the use of hepatotoxic agents such as CCl₄ and thioacetamide to generate free radicals affects the permeability of hepatocyte membranes and increases serum levels of enzymatic biochemical parameters. The use of antioxidants such as quercetin was able to reduce the release of these enzymes, probably due to the restoration of liver parenchyma [28, 29].

The involvement of ROS in impaired liver function and in the death of hepatocytes exposed to toxic agents has been extensively documented both *in vitro* and *in vivo* [5], and changes in redox homeostasis may play a significant role in the pathogenesis of many diseases characterized by chronic inflammation, activation of wound healing and fibrogenesis [28, 30-32]. The mechanism of CCl₄ toxicity occurs through the generation of highly toxic free radicals. In the present study, this evidence is reinforced by the increase in TBARS levels in the CCl₄ group. Among the many effects attributed to MLT, we highlight its potent antioxidant effect [11, 20, 23, 33]. Our results showed that MLT significantly reduced liver LPO, which is consistent with previous reports indicating that MLT is capable of removing free radicals and has a protective effect in experimentally induced hepatotoxicity [11, 33, 34].

The antioxidant enzyme system, represented in this study by SOD, prevents the accumulation of oxygen and hydrogen peroxide, and thus is considered the main line of defense of the body [35]. CCl₄ significantly decreased SOD activity, and MLT reversed this process. Reduced SOD activity, along with increased LOP in animals from the CCl₄ group, establishes a situation of oxidative stress [35, 36]. MLT protects hepatocytes against damage from free radicals by directly scavenging free radicals and stimulating antioxidant enzymes [6, 7]. Similar to previous studies, our study found that MLT increases the activity of the antioxidant enzyme SOD, which occurs in parallel with Nrf2 activation [8, 37].

One of these essential mechanisms responsible for the induction of enzymes in response to stress is the pathway of Nrf2 and its inhibitor Keap1. When translocated into the nucleus, Nrf2 binds to the antioxidant responsive element (ARE), regulating the expression of endogenous antioxidants and proteins involved in the regulation of cell cycle and death [8, 38, 39]. In this study, Nrf2 expression was significantly reduced, whereas Keap1 expression was greater in animals from the CCl₄ group. Studies have shown that Nrf2 plays a protective role

in liver disease, with Nrf2-deficient rats being more sensitive and susceptible to liver injury and fibrosis induced by hepatotoxins [40]. Our study showed that MLT modulates oxidative stress and consequent liver injury by modulating the Nrf2/Keap1 pathway, which corroborates other studies that used MLT and curcumin, another substance with antioxidant potential [37, 40, 41].

A growing amount of evidence reinforces that increased ROS production is strongly related to induction of ER stress [3]. Physiological or pathological processes that disturb ER homeostasis lead to a pathologic response called ER stress, causing the activation of the intracellular signaling pathway called UPR, thereby contributing to the pathogenesis of several conditions, including liver diseases [4, 5, 42, 43]. Our findings suggest the presence of ER stress in the animals from the CCl₄ group, since there was an increase in the expression of GRP78 and ATF6 (predictors of ER stress). The transcription of these chaperones is increased in response to various stimuli that disturb or overload ER function, including exposure to xenobiotics [43]. A significant decrease in the expression of proteins that predict ER stress was observed in animals receiving MLT. Our data are consistent with recent findings showing that MLT reduces ER stress in different models of cell injury [16]. For example, treatment with MLT reduced ER stress and modulated UPR in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin, an effect that was associated with a reduction in apoptosis, cell death, and liver damage [16]. Similar effects were also observed in liver tissue with steatosis [42] and in human hepatocellular carcinoma cells [44]. MLT also showed a neuroprotective effect through the reduction of ER stress in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia [45]. Typically, ROS are controlled by intracellular antioxidants such as SOD; however, the excess demand in protein folding can overload antioxidant response. In support of this theory, the use of antioxidants has been shown to enhance protein folding and reduce apoptosis in response to ER stress [43].

Another highly regulatory mechanism essential for cellular redox homeostasis and proper protein folding, assembly and maintenance involves HSPs and HSF1 [43]. Among HSPs, HSP70 is one of the protein families that has been more conserved in evolution, being expressed in the cell both constitutively and inductively. Our data show that animals exposed to CCl₄ showed higher expression of HSP70 and HSF1. One of the cellular responses to stress is HSP activation [46]. Several lines of evidence highlight the deleterious effects of HSPs on various human diseases, including cancer, in which case it promotes survival and proliferation of tumor cells and drug resistance [47]. Members of the HSP70 family has been particularly

implicated in the pathophysiology and pathogenesis of several liver diseases such as hepatitis B and C, non-alcoholic steatohepatitis, autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and others [48]. Treatment with MLT reduced HSP70 and HSF1 expressions. In agreement with our findings, MLT also reduced the expression of genes involved in the response to heat shock, such as HSP40, HSP60 and HSP70, in rats undergoing LPO [49].

The exact mechanism leading to xenobiotic-induced cellular stress is still not well understood and may involve multiple pathways, such as xenobiotic concentration, time of exposure, mechanism of action, cell type affected, among others. The combination of different cell damages, including oxidative stress, ER stress, UPR, cytosolic responses, may lead to cell apoptosis [43].

We concluded that the data obtained from this study showed that MLT had antioxidant and hepatoprotective effects in the experimental model of CCl₄-induced liver injury, since it modulated oxidative stress, ER stress, and HSP70 expression.

Acknowledgements. This study was supported by grants from the Brazilian agencies Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES), Research Incentive Fund (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos, FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology at HCPA/Universidade Federal do Rio Grande do Sul [UFRGS]), Research Support Foundation of the state of Rio Grande do Sul (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS), and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants at Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Conflict of Interest. The authors of this article declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Romanowski M, Chojnacki J, Klupinska G: Protective role of melatonin in liver damage. *Curr Pharm Des* 2014, 20:4828-4833.

2. Rashid K, Sinha K, Sil PC: An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol* 2013, 62:584-600.
3. Brookheart RT, Michel CI, Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE: The non-coding RNA gadd7 is a regulator of lipid-induced oxidative and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2009, 284:7446-7454.
4. Lenna S, Han R, Trojanowska M: Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction. *IUBMB Life* 2014.
5. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G: Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 2013, 59:583-594.
6. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Liu X, Tan DX: Melatonin in the biliary tract and liver: health implications. *Curr Pharm Des* 2014, 20:4788-4801.
7. Brzozowski T, Jaworek J: Editorial: basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. New advancements and future perspectives. *Curr Pharm Des* 2014, 20:4785-4787.
8. Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, Tuñón MJ: Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res* 2010, 49:193-200.
9. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N: Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003, 48:824-829.
10. Cremonese RV, Pereira-Filho AA, Magalhães R, de Mattos AA, Marroni CA, Zettler CG, Marroni NP: [Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation]. *Arq Gastroenterol* 2001, 38:40-47.
11. Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP: Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol* 2010, 47:72-78.
12. AVMA: AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). pp. 1-39; 2007:1-39.
13. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
14. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978, 52:302-310.
15. Misra HP, Fridovich I: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972, 247:3170-3175.

16. Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Alvarez M, Prieto J, González-Gallego J: Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2013.
17. Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J: Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007, 42:222-230.
18. Salamanca HH, Antonyak MA, Cerione RA, Shi H, Lis JT: Inhibiting heat shock factor 1 in human cancer cells with a potent RNA aptamer. *PLoS One* 2014, 9:e96330.
19. Fevre-Montange M: [Melatonin]. *Presse Med* 1985, 14:1659-1663.
20. Arendt J: *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland*. London: Chapman & Hall; 1995.
21. Reiter RJ, Tan DX: Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 957:341-344.
22. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, Terron MP: Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet* 2007, 97:211-230.
23. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA: Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* 2013.
24. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J: A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2012.
25. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ: A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005, 27:189-200.
26. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP: Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2011, 5:109-123.
27. Girish KS, Paul M, Thushara RM, Hemshekhar M, Shanmuga Sundaram M, Rangappa KS, Kemparaju K: Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 438:198-204.
28. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, Xavier RM, Marroni NP: Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol* 2012, 2012:762920.
29. de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP: Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol* 2011, 39:949-957.
30. Novo E, Parola M: Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008, 1:5.

31. Basu S: Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003, 189:113-127.
32. El-Ansary AK, Kotb M, Rizk MZ, Siddiqi NJ: Prooxidant mechanisms in toxicology. *Biomed Res Int* 2014, 2014:308625.
33. Claustrat B, Brun J, Chazot G: The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005, 9:11-24.
34. Wang H, Wei W, Wang NP, Gui SY, Wu L, Sun WY, Xu SY: Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci* 2005, 77:1902-1915.
35. Halliwell B: Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012, 70:257-265.
36. Belmont-Díaz J, López-Gordillo AP, Molina Garduño E, Serrano-García L, Coballase-Urrutia E, Cárdenas-Rodríguez N, Arellano-Aguilar O, Montero-Montoya RD: Micronuclei in bone marrow and liver in relation to hepatic metabolism and antioxidant response due to coexposure to chloroform, dichloromethane, and toluene in the rat model. *Biomed Res Int* 2014, 2014:425070.
37. Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS: Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res* 2009, 47:173-183.
38. Kim HJ, Vaziri ND: Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010, 298:F662-671.
39. Lee IC, Kim SH, Baek HS, Moon C, Kang SS, Kim YB, Shin IS, Kim JC: The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats. *Food Chem Toxicol* 2014, 63:174-185.
40. Oh CJ, Kim JY, Min AK, Park KG, Harris RA, Kim HJ, Lee IK: Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /Smad signaling. *Free Radic Biol Med* 2012, 52:671-682.
41. Farombi EO, Shrotriya S, Na HK, Kim SH, Surh YJ: Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol* 2008, 46:1279-1287.
42. Zaouali MA, Boncompagni E, Reiter RJ, Bejaoui M, Freitas I, Pantazi E, Folch-Puy E, Abdennebi HB, Garcia-Gil FA, Roselló-Catafau J: AMPK involvement in endoplasmic reticulum stress and autophagy modulation after fatty liver graft preservation: a role for melatonin and trimetazidine cocktail. *J Pineal Res* 2013, 55:65-78.
43. Lafleur MA, Stevens JL, Lawrence JW: Xenobiotic perturbation of ER stress and the unfolded protein response. *Toxicol Pathol* 2013, 41:235-262.
44. Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Lei Y, Li X, Wei W: Melatonin reverses tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells and improves

cytotoxic response to doxorubicin by increasing CHOP and decreasing survivin. *J Pineal Res* 2013, 55:184-194.

45. Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, Buonocore G, Proietti F, Balduini W: Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. *J Pineal Res* 2014, 57:192-199.

46. Ashkenazi L, Haim A: Light interference as a possible stressor altering HSP70 and its gene expression levels in brain and hepatic tissues of golden spiny mice. *J Exp Biol* 2012, 215:4034-4040.

47. Bellaye PS, Burgy O, Causse S, Garrido C, Bonniaud P: Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacol Ther* 2014, 143:119-132.

48. Liu T, Daniels CK, Cao S: Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2012, 136:354-374.

49. Catalá A, Zvara A, Puskás LG, Kitajka K: Melatonin-induced gene expression changes and its preventive effects on adriamycin-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pineal Res* 2007, 42:43-49.

6.2 Artigo II: Antioxidant effect of melatonin on the fibrogenesis of rats exposed to carbon tetrachloride

**ANTIOXIDANT EFFECT OF MELATONIN ON THE FIBROGENESIS OF RATS
EXPOSED TO CARBON TETRACHLORIDE**

SILVIA BONA ^{1,2}, GRAZIELLA RODRIGUES ^{1,2}, ANDREA JANZ MOREIRA ^{1,3},
THÊMIS REVERBEL DA SILVEIRA ¹, CLAUDIO AUGUSTO MARRONI ^{1,4}, NORMA
POSSA MARRONI ^{1,2,3,5}

¹ *Center of Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS,
Brazil.*

² *Postgraduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

³ *Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

⁴ *Postgraduate Program in Liver Diseases, Universidade Federal de Ciências da Saúde de
Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brazil.*

⁵ *Postgraduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade
Luterana do Brasil, Canoas- RS, Brazil.*

Running title: Antioxidant effect of melatonin

Bona et al.

Correspondence to: Silvia Bona, Rua Jari, 619, 91350170, Porto Alegre-RS, Brazil; Phone: 55
51 96490806; Fax: 55 51 32483202; e-mail: silvia.rbona@gmail.com

ABSTRACT

Background: Liver diseases are a major public health problem, accounting for a significant number of hospital visits and admissions and an increasing mortality rate. Melatonin (MLT) is a powerful antioxidant molecule that has been shown to be beneficial in various conditions, including liver diseases. **Aim:** The objective of the present study was to evaluate the effect of MLT on experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **Methods:** We used 20 male Wistar rats (230-250 g) divided into 4 groups: I: Control (CO); II: CO+MLT; III: CCl₄; and IV: CCl₄+MLT. CCl₄ was administered as follows: 10 doses every 5 days, 10 doses every 4 days, and 7 doses every 3 days. MLT was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg from the 10th week to the end of the experiment (16th week). **Results:** In the CCl₄+MLT group, we found that MLT caused a decrease in the level of F2-isoprostanes and NQO1 expression. We also found that MLT reduced the inflammatory process as shown by decreased expressions of NF-KB/p65 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and a smaller amount of inflammatory infiltrate. MLT also lowered the protein expression of TGF-β1, α-SMA, and VEGF. Picrosirius staining showed that MLT decreases fibrosis, improving the changes of the liver parenchyma. **Conclusions:** Our findings suggest that MLT has a potent antifibrogenic effect, modulating parameters of oxidative stress, angiogenesis, and inflammation.

Keywords: oxidative damage, antioxidants, and liver cirrhosis

INTRODUCTION

Chronic liver diseases cause progressive destruction of the liver parenchyma and accumulation of extracellular matrix (ECM), increased collagen synthesis, and inability to promote ECM degradation, resulting in fibrosis and subsequent liver cirrhosis, which is the 10th leading cause of death in the Western world (1-4). Liver fibrogenesis is triggered by increased reactive oxygen species (ROS), leading to an inflammatory process by activating profibrogenic mediators, such as transforming growth factor beta (TGF-β). TGF-β induces the activation of hepatic stellate cells (HSCs) to differentiate into myofibroblasts, thus increasing the expression of cytokines and proteins involved in matrix remodeling (5-8) .

In this study, we used the carbon tetrachloride (CCl₄) model of cirrhosis in rats because it is similar to human cirrhosis (9, 10). CCl₄, a widely used solvent in chemical industries, is one of the main pathways for the exposure and absorption of volatile chemicals that may be environmental contaminants, and it is well known for its hepatic and renal toxic

actions. After administration, CCl₄ is metabolized by the liver via cytochrome P450, leading to the release of free radicals, such as trichloromethyl and its derivatives that have toxic effects on liver cells, causing steatosis, fibrosis, cirrhosis, and eventually cell death (11-13). These free radicals may act by covalent binding to lipids and initiate lipid peroxidation (LPO) (13, 14).

Melatonin (MLT) has proved beneficial in many pathological situations. MLT is an indoleamine widely produced and universally distributed, having multiple functions in all organs and organisms. MLT has a potent antioxidant effect (15). It protects various tissues from persistently produced free radicals (16, 17), significant anti-inflammatory and immunomodulatory activity (15, 18, 19), as well as oncostatic properties (6, 20). Preliminary tests in human subjects have shown the beneficial effect of exogenous MLT in preventing ulcerative colitis, colon cancer, nonalcoholic fatty liver disease, and complications associated with partial liver resection (17).

Liver cirrhosis is associated with high risk of mortality, and liver transplantation is not always available in a timely manner. The inhibition of fibrogenic mechanisms represents an important molecular targets of therapeutic action, contributing to a temporary support for patients awaiting liver transplantation (21). Therefore, further studies on the effect of MLT on liver diseases may bring basic studies closer to clinical reality.

The objective of the present study was to evaluate the effect of MLT on CCl₄-induced liver cirrhosis in rats in terms of oxidative stress, inflammatory process, and fibrogenic and angiogenic cytokines.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Procedures

We used 20 male Wistar rats weighing 250 g. The animals came from the Central Laboratory Animal Facility of the Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brazil). They were kept in the Animal Research Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Brazil) on a 12/12 h light/dark cycle in a temperature and humidity controlled environment. The rats had free access to water and received a restricted diet (16 g of chow per day for each animal) (14).

All experiments were performed in accordance with the recommended by Research Ethics Committee of the Research and Graduate Studies Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre under protocol number 100316.

The animals were divided into four groups: CO: control group; CO+MLT: control group receiving MLT; CCl₄: receiving carbon tetrachloride; and CCl₄+MLT: receiving CCl₄ and MLT. The CCl₄ and CCl₄+MLT groups received 27 intraperitoneal doses of CCl₄ dissolved in mineral oil (1:6) (volume administered = 0.5 ml). The first ten doses were administered every five days, the next ten doses were given every four days, and the last seven doses were received every three days (22). Phenobarbital was added to the water provided to the animals at a concentration of 0.3 g/L seven days before the first administration and throughout the experiment to promote cytochrome P450 enzyme induction (14).

MLT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) was administered intraperitoneally to the CO+MLT and CCl₄+MLT groups at a dose of 20 mg/kg/day from the 10th week to the end of the experiment (16th week) (23).

Twenty-four hours after the last CCl₄ administration, the animals were anesthetized with xylazine (5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg), and blood samples were collected from the retro-orbital plexus. Liver samples were obtained for the other analyses. At the end of the experiment, the animals were killed by exsanguination under deep anesthesia, as described in the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines on Euthanasia (24).

Histological analysis

Liver tissues were fixed in 4% aqueous formaldehyde solution, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin (HE). Liver fibrosis was assessed with picrosirius staining.

F2-isoprostane assay

Livers were excised, weighed, and immediately frozen at -80 °C. The frozen tissues from each rat were homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. Protein concentration in the liver homogenates was determined using bovine albumin solution (25). LPO was determined by estimating the level of F2-isoprostanes, a promising oxidative stress marker, which was detected in the liver using commercially available Direct 8-iso-PGF₂α ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA). A true reflection of both free and esterified isoprostane was measured following the manufacturer's instructions.

Western Blot

Western blot analysis was performed on cytosolic and nuclear extracts prepared from liver homogenates as previously described (26). The supernatant fraction was collected and stored at -80 °C in aliquots until use. Protein concentration was measured (25). Lysate proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (27). The membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) for 1 hour at room temperature and probed overnight at 4 °C with polyclonal anti-NQO1 (SC376023/31kDa), anti-TGF- β (SC31609/25kDa), anti-NFK-B/p65 (SC8008/65kDa), anti-iNOS (SC651/131kDa), anti-VEGF (SC7269/42kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200-1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. Anti- α -SMA (A2547/42kDa) antibody (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at 1:5,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. Anti- β -actin (A5060/42kDa) and GAPDH (G9545/37kDa) antibody (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) at 1:2,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk. After washing with TTBS, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature with secondary HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:4,000). Protein detection was performed by chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) (26). The density of the specific bands was quantified using Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA).

Statistical Analysis

Means and standard deviations (SD) were calculated for all data. Significant differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey's range test was used when there were significant differences. P values < 0.05 were deemed significant. All analyses were carried out using SPSS 18.0.

RESULTS

Effect of MLT on levels of F2-isoprostanes and expression of NQO1

We found a significant increase in both F2-isoprostane level (Figure 1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) expression (Figure 2) in the CCl₄ group compared with the control groups. The use of MLT decreased LPO (F2-isoprostanes) and NQO1 expression in the CCl₄+MLT group.

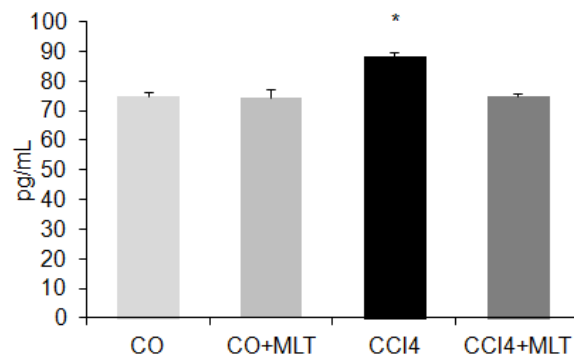


Figure 1.- Level of F2-isoprostanes in rat liver. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

*P < .05 CCl₄ versus other groups.

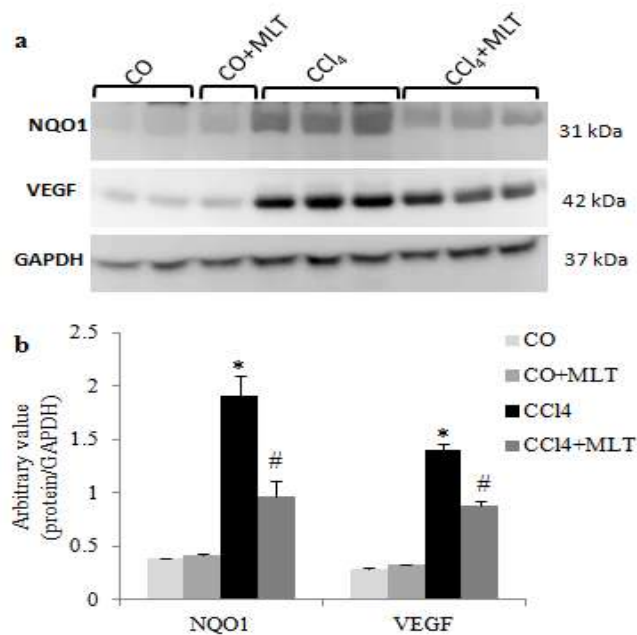


Figure 2.- Western blot analysis of NQO1 and VEGF. (A) Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and GAPDH antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

*P < .05 CCl₄ versus other groups.

#P < .05 CCl₄+MLT versus other groups.

Effects of MLT on inflammatory markers

Liver histological analysis with HE staining (Figure 3) showed that the animals of the CCl₄ group had histological changes, such as necrosis, hepatocyte degeneration, and presence of inflammatory infiltrate. These findings were also found in the CCl₄+MLT groups; however, the incidence and severity of histopathological lesions were lower than those of the CCl₄ group.

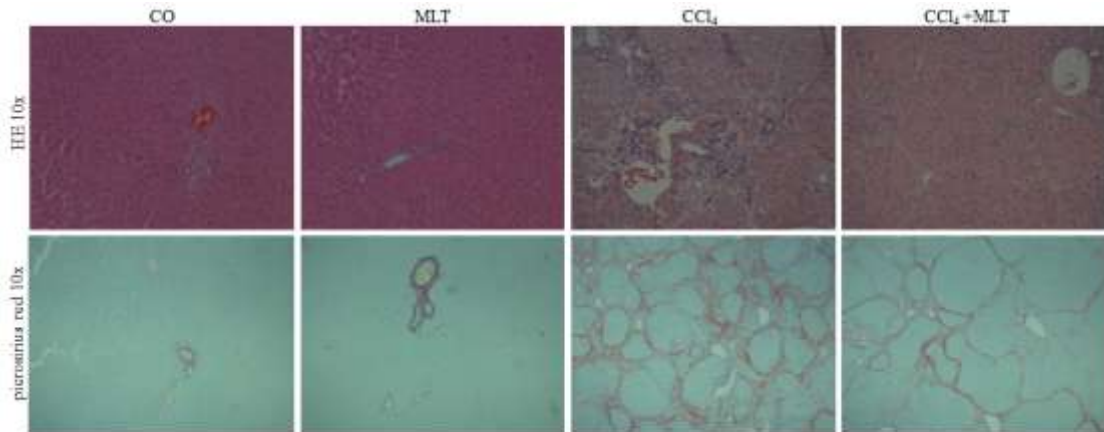


Figure 3.- Histological analysis of liver sections by hematoxylin and eosin (10x) and picrosirius staining (10x).

After confirming the inflammatory environment, possibly caused by the presence of ROS generated by CCl₄ metabolism, we assessed NF- κ B p65 expression in the nuclear extract and iNOS expression in the cytoplasmic extract (Figure 4). The animals of the CCl₄ group had significantly increased NF- κ B p65 and iNOS expressions when compared with the control groups. The use of MLT caused a significant decrease in the expression of these proteins in the CCl₄+MLT group when compared with the CCl₄ group.

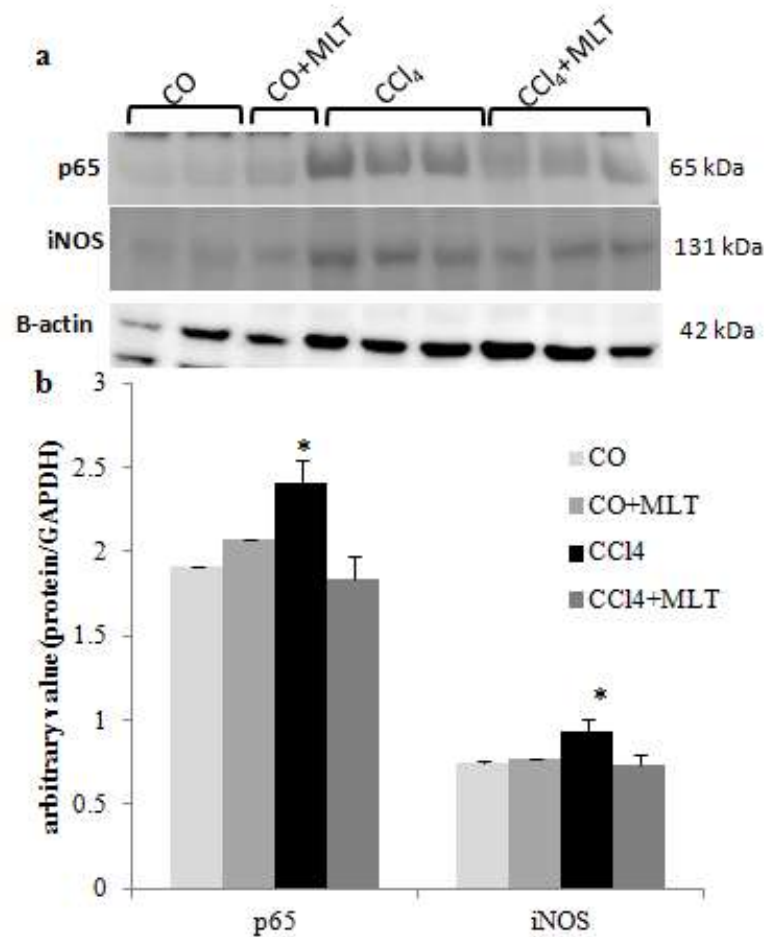


Figure 4.- Western blot analysis of p65 and iNOS. (A) Nuclear fractions were analyzed by WB with NF-KB/p65 and cytoplasmic inducible nitric oxide synthase (iNOS) and β -actin antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

*P < .05 CCl₄ versus other groups.

Effect of MLT on the expression of TGF- β 1 and α -SMA in CCl₄-induced liver cirrhosis

We evaluated the expression of TGF- β 1 and α -SMA (Figure 5) with the purpose of assessing the effect of MLT on CCl₄-induced liver cirrhosis. CCl₄ significantly increased the expression of TGF- β 1 and α -SMA. In contrast, the group receiving MLT significantly decreased the expression of these proteins when compared with the CCl₄ group, thus suggesting the inhibitory effect of MLT on the activation of hepatic stellate cells and ECM deposition.

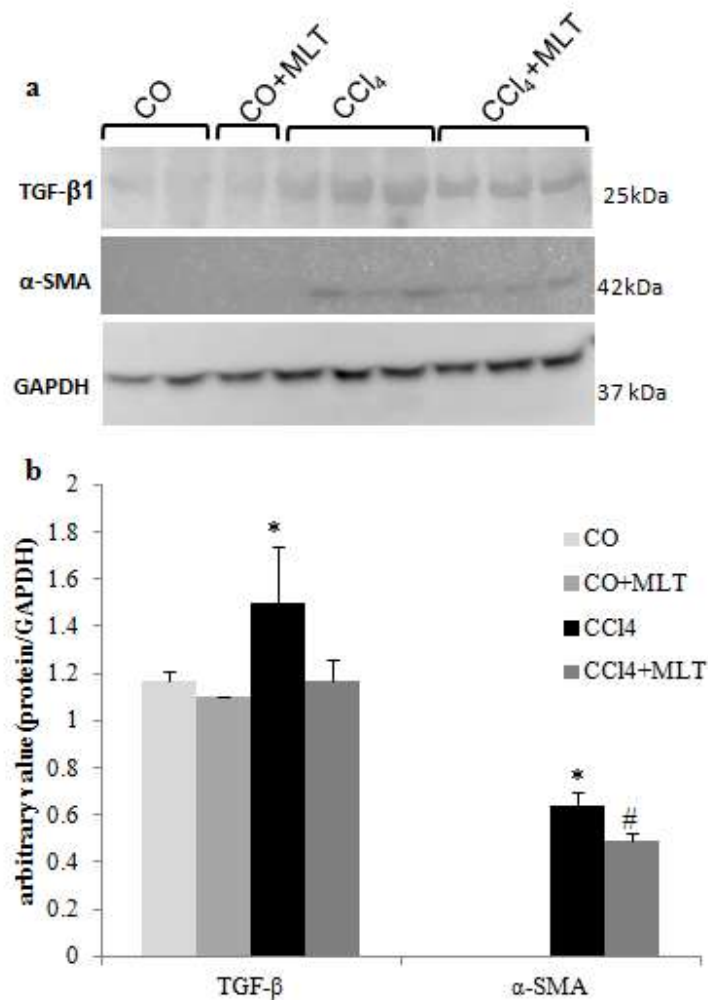


Figure 5.- Western blot analysis of TGF- β and α -SMA. (A) Cytoplasmic fractions were analyzed by WB with transforming growth factor beta (TGF- β) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and GAPDH antibodies. b) Arbitrary values expressed as mean and standard deviation.

*P < .05 CCl₄ versus other groups.

#P < .05 CCl₄+MLT versus other groups.

Effect of MLT on CCl₄-induced histological changes

Fibrosis was investigated using picosirius staining (Figure 3). The animals of the control groups showed normal liver architecture. However, the animals of the CCl₄ group showed histological changes, such as disruption of liver parenchyma, intense fibrosis with formation of thick collagen septa and closed nodules. In contrast, the animals of the CCl₄+MLT group showed a significant reduction of fibrosis with incomplete fibrotic septa and nodules.

Effect of MLT on liver angiogenesis

Liver fibrosis changes liver vascular architecture creating a hypoxic environment, which is an important stimulus for the production of angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) (Figure 2). VEGF expression in the liver of the animals of the CCl₄ group was significantly higher when compared with the control groups. In the CCl₄+MLT group, this expression was significantly reduced when compared with the CCl₄ group.

DISCUSSION

The development and progression of liver cirrhosis is a multistage process involving numerous molecular pathways and genetic changes. The present study investigated whether the molecular mechanisms of MLT in the oxidative, inflammatory, fibrogenic and angiogenic damage in experimental liver cirrhosis process. We found that the use of MLT at a dose of 20 mg/kg was effective to modulate these parameters and reduce liver fibrosis. It is probable that this effect is mainly caused by the attenuation of the oxidative damage and inflammatory response, thus decreasing the TGF- β 1 expression and the activation of hepatic stellate cells.

An increased deposition of collagen and other ECM proteins is common in many chronic diseases affecting the liver, lungs, arteries, and nervous system (13). In this process, the development and progression of many chronic diseases, including liver diseases, the involvement of oxidative stress has been well described (13). LPO is one of the major consequences of oxidative damage and is suggested as a possible mediator of liver fibrosis, having a strong influence on the synthesis and expression of collagen (13, 14, 28, 29). F₂-isoprostanes are produced from the oxidative degradation of arachidonic acid and released into the circulation. Therefore, they can be easily measured in biological samples as a marker of LPO (28, 30). In agreement with our findings, elevated levels of isoprostanes have been reported in various stages of diseases, such as alcoholic liver disease, hepatorenal syndrome, acute cholestasis, ischemia/reperfusion, diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, etc. (13, 28). In our study, the use of MLT significantly reduced the levels of F₂-isoprostanes. According to Zhang et al. (2006), MLT reduced the levels of F₂-isoprostanes in the liver of rats with diquat-induced LPO (28). In addition, MLT showed a neuroprotective effect in brain lesions, decreasing the availability of free iron and reducing the formation of F₂-isoprostanes (31).

As a mechanism for maintenance of cell redox homeostasis, the body uses significant protection systems, such as NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), which provides

cellular protection against free radicals, including superoxide anion (32, 33). Paradoxically, despite its "protective" role, an increased NQO1 expression has been correlated with various malignant tumors, including gastric, breast, colon, lung, thyroid, and adrenal gland tumors (32, 34). In our study, an increased NQO1 expression was concomitant with an increased LPO in the CCl₄ group, which decreased with the use of MLT. Venugopal and Jaiswal (1996) suggested that an increased NQO1 expression occurs in response to the generation of ROS caused by inflammation or because of the use of xenobiotic compounds (35).

The CCl₄ induction of oxidative damage stimulated IκB phosphorylation, which releases NF-κB p65 to act in the nucleus, with an influence on the transcription of target genes and resulting in the production and secretion of pro-inflammatory cytokines implicated in promoting fibrosis (36-38). Once activated, NF-κB stimulates the expression of iNOS with the consequent increase in the production of nitric oxide (NO), a molecule highly involved in toxin-induced liver injury (38). Similar findings were found in our study, where CCl₄ may have induced IκB phosphorylation based on the increased nuclear expression of NF-κB p65, as well as the concomitant increase in the expression of iNOS. Several studies have shown that MLT modulates the NF-κB pathway during inflammation, and the NF-κB modulation changes the expression of the genes involved in the inflammatory process, including iNOS (38). In the present study, the use of MLT reduced the NF-κB expression and thus reduced the inflammatory cascade, as evidenced by the decreased iNOS expression. Therefore, MLT acted as an anti-inflammatory in this experimental model of liver cirrhosis. These results are supported by histological findings, as HE staining revealed that MLT was able to reduce necrosis, hepatocyte degeneration, and extensive presence of inflammatory infiltrate, as a result of exposure to CCl₄, showing further evidence of the hepatoprotective effect of MLT. Our findings are in agreement with previous studies showing that the use of MLT, as well as other substances with antioxidant power, reduces the expression of inflammatory mediators during fibrogenesis and hepatocarcinogenesis induced by hepatotoxins (36, 37). Studies have shown that the treatment with MLT reduces the release of NO in the vasculature and attenuates iNOS expression in the liver, as demonstrated in models of sepsis, ischemia/reperfusion, cholestasis, ionizing radiation, and liver injury caused by toxins such as aflatoxin, carbon tetrachloride, methanol, and thioacetamide (38, 39).

When oxidative stress and inflammation are not interrupted, they may stimulate a fibrotic response characterized by irreversible damage to hepatocytes and decline in liver function (40). As a consequence of liver injury, HSCs are activated, thus generating increased

synthesis of collagen and increased expression of several cytokines, including TGF- β , which is a potent stimulus for the synthesis of ECM and expansion of fibrosis (7, 34, 36).

The transduction of intracellular signals stimulated by TGF- β results in the stimulation of alpha-smooth muscle actin (α -SMA), an indicator of HSC activation (41, 42). We evaluated the expression of TGF- β 1 and α -SMA, which were increased in all rats exposed to CCl₄ in accordance with the histological study, where picosirius staining revealed intense fibrosis with formation of thick collagen septa and closed nodes. The MLT treatment significantly decreased TGF- β 1 and α -SMA expressions and reduced fibrosis, thus causing the formation of incomplete fibrotic septa and nodules. Similar results were found in rats with liver fibrosis induced by bile duct ligation, using pre- and posttreatment with brivanib alaninate, sulforaphane, and quercetin (43-45). In fact, the inhibition of this fibrogenesis pathway is a key strategy for the regulation of the differentiation and proliferation of HSCs and the subsequent control of ECM deposition in diseases involving fibrogenesis.

Liver fibrosis is also associated with changes in liver vascular architecture, creating a hypoxic environment, which is an important stimulus for the angiogenesis. In this environment, HSCs, which are closely related to the endothelial cells, produce various angiogenic factors, including VEGF (45-47). Liver fibrogenesis, angiogenesis, and hypoxia are associated in the tissue repair process and constitute a pathological vicious circle in the development of cirrhosis (48). Excess availability of angiogenic factors combined with excess deposition of ECM leads to sinusoidal endothelial cell (SEC) capillarization, producing an intrahepatic shunt, increasing resistance to blood flow and reducing the supply of oxygen, thus resulting in hypoxia, an important contributor to liver cirrhosis (46, 49). Our results suggest that the exposure to CCl₄ activates HSCs, which induce VEGF expression. Nevertheless, those animals treated with MLT showed significantly reduced VEGF expression, suggesting a possible improvement in the angiogenic process and a decrease in the resistance to blood flow.

Our findings suggest that MLT has a potent antifibrogenic effect, modulating parameters of oxidative stress, angiogenesis, and inflammation. The action of MLT on the improvement of liver fibrosis seems to make it a promising candidate for clinical trials in chronic liver diseases associated with increased fibrogenesis.

Acknowledgements. This study was supported by grants from the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and

Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia (HCPA/UFRGS) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes (ULBRA).

Conflict of Interest. The authors of this article declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-51.
2. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem*. 2012;19(28):4850-60.
3. Leon DA, McCambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet*. 2006;367(9504):52-6.
4. Bartoletti M, Giannella M, Caraceni P, Domenicali M, Ambretti S, Tedeschi S, et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2014;61(1):51-8.
5. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1(1):5.
6. Girish KS, Paul M, Thushara RM, Hemshekhar M, Shanmuga Sundaram M, Rangappa KS, et al. Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(1):198-204.
7. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125-72.
8. Arauz J, Zarco N, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF- β . *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(2):164-73.
9. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3(1):112-20.
10. Jiménez W, Clária J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7(1):90-7.
11. Rashid K, Sinha K, Sil PC. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:584-600.
12. Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA, Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther*. 1989;43(1):139-54.

13. Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(3):247-56.
14. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:762920.
15. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update.* 2013.
16. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Liu X, Tan DX. Melatonin in the biliary tract and liver: health implications. *Curr Pharm Des.* 2014;20(30):4788-801.
17. Brzozowski T, Jaworek J. Editorial: basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. New advancements and future perspectives. *Curr Pharm Des.* 2014;20(30):4785-7.
18. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.* 2012.
19. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine.* 2005;27(2):189-200.
20. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Brzezinski A, Bhatnagar KP, Cardinali DP. Melatonin, immune function and cancer. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2011;5(2):109-23.
21. Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J, et al. Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res.* 2010;49(2):193-200.
22. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, et al. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2003;48(4):824-9.
23. Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol.* 2010;47(1):72-8.
24. AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia), (2007).
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
26. Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Alvarez M, et al. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res.* 2013.

27. Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res.* 2007;42(3):222-30.
28. Zhang L, Wei W, Xu J, Min F, Wang L, Wang X, et al. Inhibitory effect of melatonin on diquat-induced lipid peroxidation in vivo as assessed by the measurement of F2-isoprostanes. *J Pineal Res.* 2006;40(4):326-31.
29. Wasser S, Lim GY, Ong CN, Tan CE. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(11):1244-53.
30. Briskey DR, Wilson GR, Fassett RG, Coombes JS. Optimized method for quantification of total F(2)-isoprostanes using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;90:161-6.
31. Signorini C, Ciccoli L, Leoncini S, Carloni S, Perrone S, Comporti M, et al. Free iron, total F-isoprostanes and total F-neuroprostanes in a model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: neuroprotective effect of melatonin. *J Pineal Res.* 2009;46(2):148-54.
32. Lin L, Qin Y, Jin T, Liu S, Zhang S, Shen X, et al. Significance of NQO1 overexpression for prognostic evaluation of gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2014;96(2):200-5.
33. Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1238-47.
34. Bona S, Moreira AJ, Rodrigues GR, Cerski CT, Silveira TRd, Marroni CA, et al. Diethylnitrosamine induced cirrhosis in wistar rats: an experimental feasibility study. *Protoplasma.* 2014.
35. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14960-5.
36. Heeba GH, Mahmoud ME. Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37(2):662-71.
37. Hsieh WT, Liu YT, Lin WC. Anti-inflammatory properties of *Ajuga bracteosa* in vivo and in vitro study and their effects on mouse model of liver fibrosis. *J Ethnopharmacol.* 2011;135(1):116-25.
38. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res.* 2013;54(1):1-14.
39. Mathes AM. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol.* 2010;16(48):6087-97.

40. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013;59(3):583-94.
41. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta.* 2007;381(2):107-13.
42. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d793-807.
43. Oh CJ, Kim JY, Min AK, Park KG, Harris RA, Kim HJ, et al. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor- β /Smad signaling. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(3):671-82.
44. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr.* 2009;139(7):1339-46.
45. Lin HC, Huang YT, Yang YY, Lee PC, Hwang LH, Lee WP, et al. Beneficial effects of dual vascular endothelial growth factor receptor/fibroblast growth factor receptor inhibitor brivanib alaninate in cirrhotic portal hypertensive rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(5):1073-82.
46. Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(8):C789-99.
47. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011;25(2):195-206.
48. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Chignard N, Housset C, Poupon R, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol.* 2002;160(2):613-20.
49. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int.* 2011;31(2):146-62.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cirrose hepática está associada com elevada taxa de mortalidade, e a única terapia efetiva, o transplante de fígado nem sempre está disponível em tempo hábil para a maioria dos pacientes. Esta constatação torna a avaliação de fármacos, que possam evitar a progressão da fibrose à cirrose, uma ferramenta de extrema necessidade, contribuindo para um apoio temporário a pacientes que aguardam um transplante de fígado.

Neste estudo, demonstramos que a MLT, uma indolamina sintetizada a partir do triptofano, protegeu o tecido hepático da progressão da fibrose induzida em ratos com CCl₄.

Conclusões artigo I - Protective effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity.

- diminuiu os níveis séricos das enzimas séricas hepáticas AST, ALT e FA;
- diminuiu a lipoperoxidação avaliada por TBARS;
- aumentou a atividade da enzima antioxidante SOD;
- aumentou a expressão do fator de transcrição Nrf2 e diminuiu a expressão de seu inibidor o Keap1;
- diminui a expressão de proteínas preditoras de estresse do RE, GRP78 e ATF6;
- diminui a expressão da proteína de choque térmico HSP70 e do fator de choque térmico HSF1.

Conclusões artigo II - Antioxidant effect of melatonin on the fibrogenesis of rats exposed to carbon tetrachloride

- diminui a LPO avaliada por F2-isoprostanos;

- diminuiu a expressão da proteína NQO1;
- diminuiu o processo inflamatório hepático, reduzindo a presença de infiltrado inflamatório e a expressão das proteínas NF-KB/p65 e iNOS;
- diminuiu o processo fibrogênico, visto pela redução dos septos e dos nódulos de fibrose e pela diminuição da expressão das proteínas TGF- β 1 e da α -SMA;
- diminui o processo angiogênico, visto pela diminuição da expressão do VEGF.

Com base no referencial teórico e nos resultados obtidos, acreditamos que o principal mecanismo de ação da MLT seja, via bloqueio dos RLs e das espécies reativas formadas pelo metabolismo do CCl_4 , o que leva ao bloqueio das vias subsequentes que levam a liberação de potentes citocinas prófibrogênicas, como o TGF- β um potente ativador das CEHs. Como efeito secundário da MLT, acreditamos que ela atue sobre as CEHs ativadas, possivelmente via apoptose das mesmas, que também sinalizam a liberação de TGF- β , criando um ciclo vicioso (Figura 15).

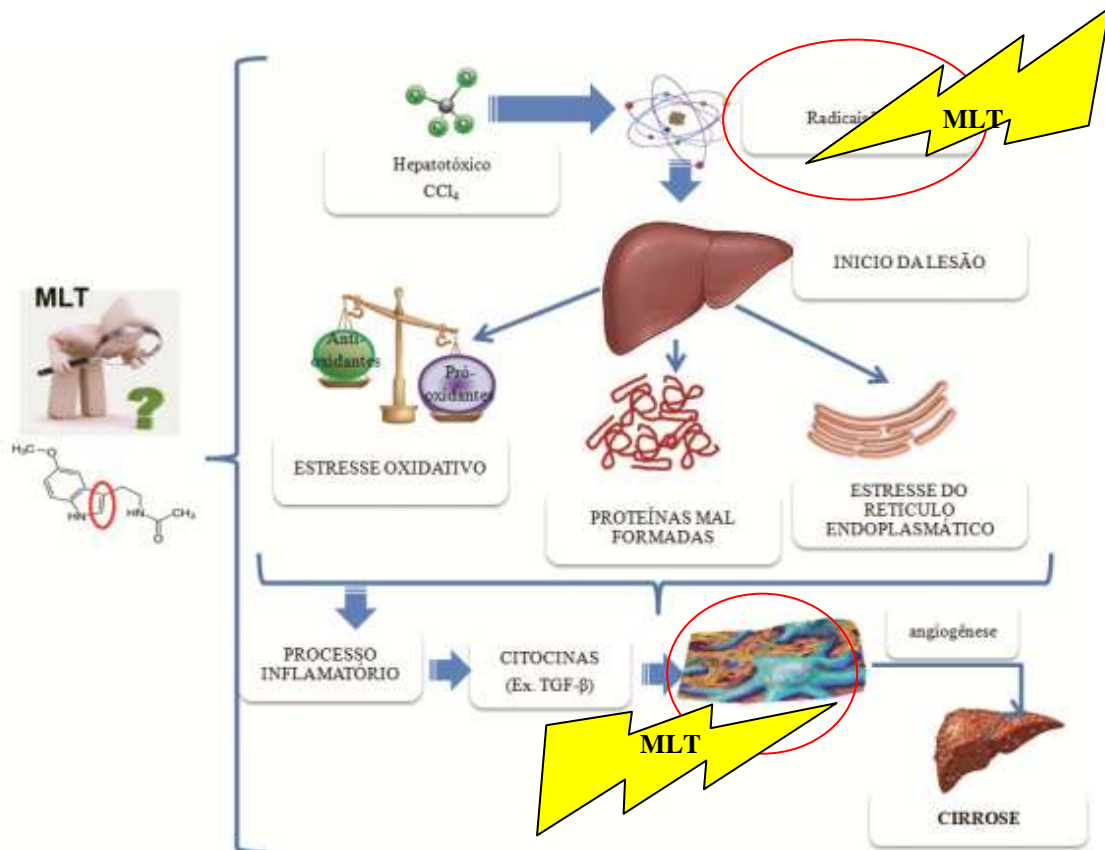


Figura 15. Mecanismo de ação da melatonina proposto para este estudo.
Fonte: Autor.

Portanto, nossos resultados sugerem que a MLT possui um potencial terapêutico prevenindo a progressão da fibrose durante a lesão hepática crônica, com isso pode oferecer melhores condições e possível aumento da sobrevida ao paciente em lista de espera para o transplante hepático.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Prosseguir o estudo com a melatonina avaliando sua ação em outros marcadores envolvidos com o estresse do RE, proteínas de choque térmico, inflamação, fibrogênese e angiogênese, a fim de confirmar o mecanismo de ação proposto. Além de avaliar marcadores de apoptose e autofagia das CEHs.

Dessa forma, estudos mais avançados sobre a ação da MLT em doenças hepáticas, podem promover uma maior aproximação dos estudos básicos com a realidade clínica, objetivando a medicina translacional (Figura 16).

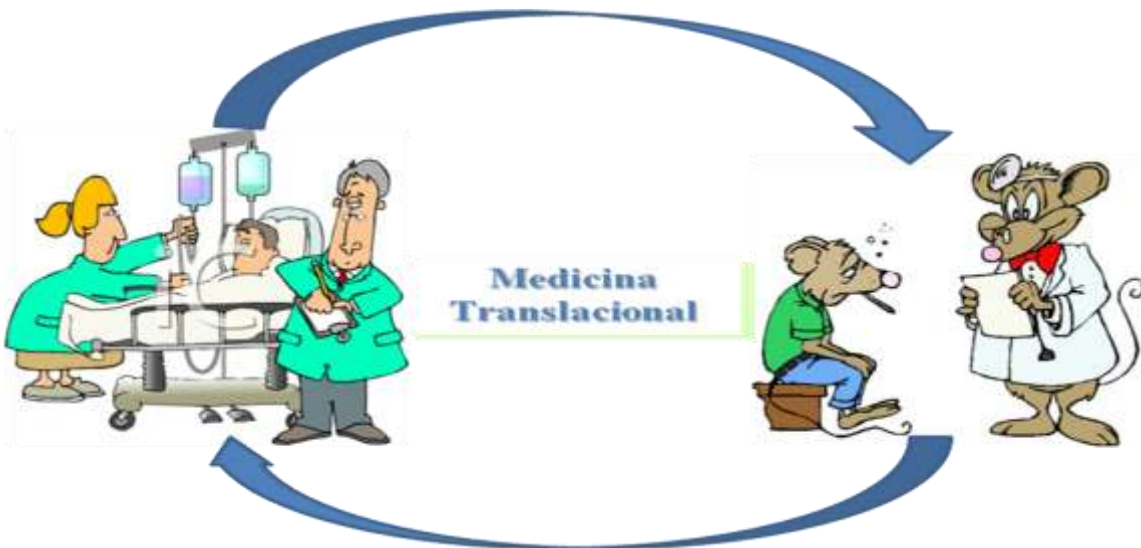


Figura 16: Medicina translacional – da bancada à clínica.

ANEXOS

- Capítulos de livros publicados durante a vigência do doutorado

BONA, S., MOREIRA, A. J., OLIVEIRA, M., MARRONI, C.A., **MARRONI, N.P.** Cirrose Hepática induzida por tetracloreto de carbono: modelo inalatório e intraperitoneal In: Radicais Livres no processo Saúde-Doença: da bancada à clínica. 1 ed. Curitiba / PR : CRV, 2012, p. 39-50.

- Artigos publicados durante a vigência do doutorado

1) BONA S, MOREIRA AJ, RODRIGUES G, DA SILVEIRA TR, CERSKI CT, MARRONI CA , MARRONI NP. Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study. *Protoplasma*. 2014 Nov 5. [Epub ahead of print].

2) BITELO LUDWIG, LUCIANE, VALIATI, VICTOR HUGO, PALAZZO, ROBERTA PASSOS, JARDIM, LAURA BANNACH, DA ROSA, DARLAN PASE, **BONA, Silvia**, RODRIGUES, GRAZIELA, MARRONI, Norma Possa, PRÁ, DANIEL, MALUF, SHARBEL WEIDNER Chromosome Instability and Oxidative Stress Markers in Patients with Ataxia Telangiectasia and Their Parents. *BioMed Research International*. , v.2013, p.1 - 7, 2013.

3) FERRAZ, A. B. F., FERRAZ, Silva, FR, ERDTMANN, B, Dalpiaz, T, NUNES, EA, Ferraz, A. B. F., Martins, TLC, DIAS, J. F., Rosa, Darlan P., BONA, Silvia, Porawski, Marilene, SILVA, Juliana da Genotoxicity of Nicotiana tabacum leaves on Helix aspersa. *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*. , v.36, p.269 - 275, 2013.

4) MORAES E LUZ, EMMANUEL WASSERMANN, VIEIRA, LUCIANA RODRIGUES, SEMEDO, JULIANE GARCIA, **BONA, SILVIA REGINA**, FORGIARINI, LUIZ FELIPE, PEREIRA, PATRÍCIA, CAVALCANTE, ANA AMÉLIA MELO, MARRONI, NORMA ANAIR POSSA, PICADA, JAQUELINE NASCIMENTO Neurobehavioral effects of L-carnitine and its ability to modulate genotoxicity and oxidative stress biomarkers in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. , v.110, p.40 - 45, 2013.

5) SANTOS, EMANUEL BURCK DOS, KOFF, WALTER JOSÉ, GREZZANA FILHO, TOMAZ DE JESUS MARIA, DE ROSSI, SAMANTA DAIANA, TREIS, LISIANE, **BONA, SILVIA REGINA**, PÊGAS, KARLA LAÍS, KATZ, BETINA, MEYER, FABÍOLA SCHONS, MARRONI, NORMA ANAIR POSSA, CORSO, CARLOS OTÁVIO Oxidative stress evaluation of ischemia and reperfusion in kidneys under various degrees of hypothermia in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira (Online)*. , v.28, p.568 - 573, 2013.

6) **BONA, Silvia**, FILIPPIN, L. I., NASO, F. C., DAVID, C., VALIATTI, B. B., SCHAUN, M., XAVIER, R. M., MARRONI, N.A.P. Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. *ISRN Gastroenterology*. , v.2012, p.1 - 7, 2012.

- 7) MARRONI, N.A.P., FERRARI, R. S., ROSA, D.P., BONA, Silvia, FORGIARINI, L. F., DIAS, A.S., MARRONI, N.P. Oxidative Stress and Pulmonary Changes in Experimental Liver Cirrhosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Online)*. , v.2012, p.1 - 8, 2012.
- 8) OLIVEIRA, N. C., SARMENTO, M. S., NUNES, E. A., PORTO, C. M., ROSA, D.P., BONA, Silvia, RODRIGUES, G., MARRONI, N.A.P., PEREIRA, P., PICADA, J. N., FERRAZ, A., THIESEN, F. V., SILVA, J. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and Chemical Toxicology*. , v.1, p.1 - 7, 2012.
- 9) MAZULLO FILHO, J. B. R., **BONA, Silvia**, ROSA, D.P., SILVA, F. G., FORGIARINI JUNIOR, L.A., DIAS, A.S., MARRONI, N.P. The effects of mechanical ventilation on oxidative stress. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva (Impresso)*. , v.24, p.1 - 7, 2012.
- 10) VIERA, E.K., **BONA, Silvia**, NASO, F. C., PORAWSKI, M., TIEPPO, J., MARRONI, N.P. Quercetin Treatment Ameliorates Systemic Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *ISRN Gastroenterology*. , v.2011, p.1 - 6, 2011.
- 11) DAVID, C., RODRIGUES, G., **BONA, Silvia**, MEURER, L., GONZALEZ-GALLEGO, J., TUNON, M. J., MARRONI, N.P. Role of Quercetin in Preventing Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats. *Toxicologic Pathology (Print)*. , v.39, p.949 - 957, 2011.
- 12) NASO, F. C., MELLO, R.N., BONA, Silvia, DIAS, A.S., PORAWSKI, M., FERRAZ, A. B. F., RICHTER, M.F., MARRONI, N.P. Effect of *Agaricus blazei* Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Experimental Diabetes Research (Print)*. , v.2010, p.1 - 9, 2010.
- 13) SILVA, F.R., ERDTMANN, B., DALPIAZ, T., NUNES, E., ROSA, D.P., PORAWSKI, M., **Bona, Sílvia**, SIMON, C.F., ALLGAYER, M.C., DA SILVA, J. Effects of Dermal Exposure to (Jean Nicot, 1560) Leaves in Mouse Evaluated by Multiple Methods and Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. , v.58, p.9868 - 9874, 2010.
14. RODRIGUES, G., MARCOLIN, É., **BONA, Silvia**, PORAWSKI, M., LEHMANN, M., MARRONI, N.P. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats. *Arquivos de Gastroenterologia (Impresso)*. , v.47, p.301 - 305, 2010.
- 15) ROSA, D.P., BONA, Silvia, SIMONETTO, D.A., ZETTLER, C.G., MARRONI, C. A., MARRONI, N.P. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arquivos de Gastroenterologia (Online)*. , v.47, p.72 - 78, 2010.