

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

**ADRIANE DAL BOSCO**

**A MELATONINA PROTEGE O PULMÃO NA SÍNDROME  
HEPATOPULMONAR EXPERIMENTAL**

Porto Alegre

2017



### CIP - Catalogação na Publicação

Dal Bosco, Adriane

A MELATONINA PROTEGE O PULMÃO NA SÍNDROME  
HEPATOPULMONAR EXPERIMENTAL / Adriane Dal Bosco. --  
2017.

158 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Síndrome Hepatopulmonar. 2. Melatonina. 3.  
experimental. I. Possa Marroni, Norma , orient. II.  
Titulo.

**ADRIANE DAL BOSCO**

**A MELATONINA PROTEGE O PULMÃO NA SÍNDROME  
HEPATOPULMONAR EXPERIMENTAL**

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

2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Profa. Dra. Norma Possa Marroni e ao Prof. Dr. Alexandre Simões Dias

Há pessoas que marcam nossa vida, que despertam algo especial em nós, que abrem nossos olhos de modo irreversível e transformam nossa maneira de ver o mundo e de enfrentar novos desafios. Vocês, sem dúvida, foram a minha fonte inspiradora e inesgotável para seguir em frente. Minha admiração pelo exemplo, dedicação e caráter em tudo o que fazem.

Aos mestres, toda a minha gratidão e carinho!

## **Agradecimentos**

Ter a capacidade de trabalhar bem em equipe demonstra humildade, tolerância, inteligência emocional e companheirismo, características encontradas no grupo de pesquisa do laboratório liderado pela profa. Norma. Cada uma de vocês foi muito importante nesta etapa da minha vida, e levarei comigo o carinho de cada sorriso desta convivência. Meus sinceros agradecimentos a Elizângela Schemitt, Francielli Licks, Graziella Rodrigues, Jayne Torres de Souza, Josieli Raskopf Colares, Julie Noda, Mariana Couto Soares, Renata Minuzzo Hartmann, Sabrina Fernandes e Silvia Bonna.

Aos professores Dr. Cláudio Augusto Marroni, Dr. Henrique Fillmann, Dr. Fábio Cangeri Di Naso, Dr. Luiz Alberto Forgiarini Junior, Dra. Marilene Porawski, meu reconhecimento e gratidão por suas ideias sempre pertinentes, as quais muito contribuíram para a realização deste estudo.

À profa. Dra Andrea Janz Moreira, cujo apoio foi fundamental para que eu continuasse acreditando que tudo daria certo, minha admiração pelo exemplo, pela força e amizade incondicional nesta fase tão importante da minha vida.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, obrigada pela oportunidade em continuar a minha formação nesta instituição, onde convivi com profissionais de excelência em suas diversas áreas de atuação. É motivo de orgulho ter o título com esta chancela!

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial, à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato meu carinho e reconhecimento.

Ao Centro Universitário Metodista IPA, o reconhecimento pela oportunidade profissional de exercer a docência e a coordenação do curso de Fisioterapia nesta instituição que foi minha formadora. Nela, encontrei muito mais do que chefes e colegas, encontrei amigos, pessoas que me apoiaram e incentivaram durante toda a minha trajetória acadêmica e profissional.

À minha família, cujos componentes são meu porto seguro, meus pilares, fonte de amor e compreensão, o carinho e o agradecimento especial a meus pais Adones Antônio Dal Bosco e Ana Sueli Dal Bosco, bem como a meus irmãos, sogros, cunhado e sobrinhos.

Um filho faz tudo ficar ainda melhor. Um filho transforma o amor, deixa os dias mais curtos e as noites mais longas. Filhos deixam a conta bancária menor, mas, em

compensação, a vida muito mais feliz. Os filhos fazem o passado ser esquecido e o futuro digno de ser vivido! Desta forma, não poderia deixar de falar das pessoas mais especiais da minha vida, meu marido, Alexandre Simões Dias, pelo qual me sinto eternamente agradecida e apaixonada! Amor incondicional a meus três filhos que vieram encher a vida de luz, amor e alegria. Ao Fernando, cuja chegada iluminou a vida, e juntamente com quem a família teve a imensa alegria de receber as duas estrelinhas: Gabriela e Giovana. O amor de um filho é libertador!

## RESUMO

**Base teórica:** A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) caracteriza-se por uma tríade clínica que inclui doença hepática, anormalidades em trocas gasosas e presença de dilatações vasculares pulmonares, sendo a obstrução prolongada do ducto biliar utilizada em modelos experimentais de cirrose biliar secundária que leva a reações inflamatórias agudas, podendo, ainda, ocasionar alterações sistêmicas. Animais com cirrose induzida experimentalmente por ligadura de ducto biliar (LDB) apresentam aumento do estresse oxidativo no tecido hepático, mas a inter-relação com o tecido pulmonar ainda não está bem esclarecida. O estresse oxidativo desempenha papel central na patogênese e na progressão de doenças crônicas, e o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico para compensar danos sistêmicos e hepáticos. Em estudos em que a utilização da melatonina foi comparada com a utilização de outros antioxidantes conhecidos como as vitaminas C e E, tal componente mostrou-se mais eficiente na redução do estresse oxidativo/nitrosativo, demonstrando que a melatonina atua como potente antioxidante. **Objetivo:** A presente tese teve como objetivo investigar o efeito do antioxidante Melatonina sobre o tecido pulmonar no modelo experimental de Síndrome Hepatopulmonar por ligadura de ducto biliar. **Métodos:** O trabalho está dividido em três partes: Parte I- Artigo de revisão intitulado “Hepatopulmonary Syndrome: Oxidative Stress and Physical Exercise,” enviado para publicação no periódico *European Medical Journal*; Parte II- Artigo original intitulado “Efeitos da melatonina sobre o tecido pulmonar no modelo experimental de síndrome hepatopulmonar”, enviado para o periódico *Jornal de Pneumologia*; Parte III- Artigo original intitulado “Efeitos da melatonina sobre o tecido hepático e pulmonar em animais com síndrome hepatopulmonar por ligadura do ducto biliar”, a ser enviado para o periódico *Digestive Diseases and Sciences*. Foi utilizado o modelo de cirrose biliar secundária, induzida pelo modelo de ligadura de ducto biliar (LDB), com ratos machos Wistar, pesando  $\pm$  300 gramas, divididos em quatro grupos: CO (controle), CO+MLT, SHP e SHP+MLT. Os animais foram tratados com MLT a partir do 15º dia e com LDB até o 28º dia. No 29º dia, mediante administração de fármacos anestésicos, foram coletados sangue, fígado, pulmão e fêmur. **Resultados:** Nos artigos II e III, ao se avaliar as transaminases, observou-se aumento significativo nas enzimas ALT, AST e FA no grupo SHP quando comparadas aos grupos controles, o que determina a presença de doença hepática. Posteriormente à administração da



melatonina, houve diminuição significativa do grupo SHP+MLT quando comparado ao grupo SHP na avaliação da lipoperoxidação, atividade das enzimas Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione Peroxidase (GPx), bem como na de Nitritos/Nitratos ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) e no sistema inflamatório, quando da avaliação da expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) e da região p65 do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB). Também houve diferença na gasometria arterial e na histologia do tecido pulmonar pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picrosírius, especialmente no diâmetro dos vasos pulmonares. Ao avaliar o dano ao DNA pelo Ensaio Cometa, foi observado aumento do índice e da frequência de dano no grupo SHP, com redução após o uso da MLT. **Conclusão:** Os resultados sugerem efeito protetor da melatonina no tecido hepático e pulmonar, no modelo de Síndrome Hepatopulmonar por ligadura de ducto biliar.

**Palavras-chave:** Ligadura do ducto biliar, Síndrome Hepatopulmonar, Gasometria, Melatonina.

## ABSTRACT

**Background:** Hepatopulmonary syndrome (HPS) is clinically characterized by a combination of liver disease, gas exchange abnormalities, and pulmonary vascular dilation. Prolonged biliary duct obstruction was used in experimental models of secondary biliary cirrhosis leading to acute inflammatory reactions and possibly to systemic changes. Animals with cirrhosis experimentally induced by biliary duct ligation (BDL) showed increased oxidative stress in liver tissue, but the lung tissue has not been investigated yet. Oxidative stress has a key role in the pathogenesis and progression of chronic diseases, and antioxidants have been proposed as therapeutic agents to compensate for systemic and liver damages. In studies comparing melatonin with other known antioxidants such as vitamins C and E, melatonin was found to be more efficient in reducing oxidative/nitrosative stress, showing that it is a potent antioxidant. **Objective:** The present doctoral dissertation aimed to investigate the effect of the antioxidant melatonin on lung and liver tissues in an experimental model of BDL-induced HPS. **Methods:** This dissertation is divided into three parts: Part I consists of the review article entitled "Hepatopulmonary Syndrome: Oxidative Stress and Physical Exercise," which was submitted to the *European Medical Journal*; Part II consists of the original article entitled "Efeitos da melatonina sobre o tecido pulmonar no modelo experimental de síndrome hepatopulmonar", which was submitted to *Jornal de Pneumologia*; and Part III consists of the original article entitled "Effects of melatonin on liver and lung tissues of animals with bile duct ligation-induced hepatopulmonary syndrome", which will be submitted to *Digestive Diseases and Sciences*. A model of secondary BDL-induced biliary cirrhosis was used in male Wistar rats weighing  $\pm$  300 g and divided into four groups: control group (CG), CG+MLT, HPS, and HPS+MLT. Animals were treated with MLT or vehicle from day 15 to day 28 after BDL. On day 29, blood, liver, lung, and femur samples were collected after the administration of anesthetic drugs. **Results:** As for transaminases, papers II e III found that there was a significant increase in enzymes ALT, AST e FA in the HPS group compared with the control groups, which indicates the presence of liver disease. The administration of melatonin led to a significant decrease in the HPS group compared with the control groups with regard to the following variables: lipid peroxidation; catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity; nitrite/nitrate ratio; and inducible nitric oxide synthase and p65 region of nuclear factor kappa B. There were also

differences in blood gas analysis and histology of lung tissues as assessed by hematoxylin and eosin (HE) and picrosirius red staining, especially in the diameter of pulmonary vessels. The comet assay revealed an increase the index and frequency of DNA damage in the HPS group compared with the control groups, but these parameters were reduced with the use of melatonin in the HPS+MLT group.

**Conclusion:** Results suggest that melatonin has a protective effect in liver and lung tissues using a BLD-induce HPS model.

**Keywords:** Biliary duct ligation, Hepatopulmonary syndrome, Blood gas analysis, Melatonin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas .....	18
Figura 2: Fisiopatologia da Síndrome Hepatopulmonar .....	20
Figura 3: Modelo de cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum ....	21
Figura 4: Detalhes da estrutura hepática .....	27
Figura 5: Endoteliopatia presente na circulação intra-hepática .....	28
Figura 6: Hepatócito normal e processo de progressão da cirrose .....	28
Figura 7: Arquitetura hepática com injúria crônica .....	29
Figura 8: Esquema da geração das espécies ativas de oxigênio (EAO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN).....	31
Figura 9: Sistema de defesa antioxidante e a interação entre as enzimas .....	34
Figura 10: Síntese do NO .....	35
Figura 11: Ativação do NF $\kappa$ B e suas ações sobre a inflamação .....	38
Figura 12: A estrutura química da Melatonina .....	41
Figura 13: Marco conceitual, construído a partir da base teórica que sustenta o estudo .....	44
Figura 14: Medicina translacional – da bancada à clínica .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
A	<i>alfa</i>
B	beta
<	menor
50 kDA	cinquenta quilodaltons
65 kDA	65 quilodaltons
AaO <sub>2</sub>	diferença da pressão artério-alveolar
ALT	alanina-aminotransferase
AP-1	Ativador de proteína 1 (AP-1), fator de transcrição que regula a expressão gênica em resposta a uma variedade de estímulos
AOXs	Antioxidantes
AST	aspartato-aminotransferase
CAT	catalase
CBLD	Ligadura do ducto biliar comum
CCl <sub>4</sub>	tetracloroeto de carbono
CEH	células estreladas hepáticas
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
c-Rel	Proteínas celulares ligadoras de DNA encodificadas pelo gene REL.
CTE	cadeia de transporte de elétrons
cm	centrímetro
CO	Controle
DEX	dexmedetomidina
DP	desvio padrão
DNA	ácido desoxirribonucleico
EM	Estresse nitrosativo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERN	espécies reativas de nitrogênio
EAOs	espécies ativas de oxigênio
ET1	Endotelina-1
FA	fosfatase alcalina
FiO <sub>2</sub>	fração inspirada de oxigênio

GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona dissulfeto redutase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
GST	glutathiona transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
H	horas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCO <sub>3</sub>	ácido carbônico
HE	hematoxilina e Eosina
HIF	fator induzível por hipóxia
HO-1	Heme-oxigenase 1
IκBκ	I-kappa-B kinase
IκBs	Proteína inibitória do complexo de inibidor quinase
IKKs	Complexo de inibidor quinase
IKK-α	Subunidade do complexo inibidor quinase alfa
IKK-γ	Subunidade do complexo quinase gama
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
I/R	isquemia/reperfusão
Kg	kilograma
LDB	ligadura de ducto biliar
LDBC	ligadura do ducto biliar comum
LPO	lipoperoxidação
MG 132	Conhecido como carbobenzoxi-Leu-Leu-leucinal, aldeído peptídico, que desempenha um papel vital na inibição da atividade proteolítica do complexo proteossoma 26S.
Mg	miligramas
mg/Kg	miligramas/kilogramas
ml	mililitros
MLT	Melatonina
mmHg	milímetro de mercúrio
NaCl	cloreto de sódio

NAD	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NADPH	fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina
NF-kB	fator de transcrição nuclear kappa beta
Nm	nanomol
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
<i>n</i> NOS	Óxido nítrico sintase neural
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>	Nitritos/Nitratos
Nrf2	fator nuclear eritróide-2
O <sub>2</sub>	oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	ânion radical superóxido
°C	graus Celcius
OCl	ânion hipoclorito
•OH	radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	peróxido nitrito
p50	Subunidade p50 do Fator de Transcrição Nuclear Kappa-Beta (NF-kB)
p52	Subunidade p52 do Fator de Transcrição Nuclear Kappa-Beta (NF-kB)
p65 (RelA)	Subunidade p65 do Fator de Transcrição Nuclear Kappa-Beta (NF-kB)= p65
<i>Pa</i> CO <sub>2</sub>	<i>pressão parcial de gás carbônico arterial</i>
<i>Pa</i> O <sub>2</sub>	<i>pressão parcial de oxigênio arterial</i>
<i>PA</i> O <sub>2</sub>	<i>Pressão alveolar de oxigênio</i>
Ph	potencial de hidrogênio
PMVECs	células endoteliais microvasculares pulmonares
Proteossoma 26S	complexo de proteína 26
QL	Quimiluminescência
Rel-B	proteína oncogenica ligada ao gene REL
RLs	radicais livres
RO	radical alcoxil
ROO	radical peroxil
Rpm	rotações por minuto
SaO <sub>2</sub>	saturação arterial de oxigênio

SatO <sub>2</sub> /Hb	saturação de oxigênio da hemoglobina
SDMO	Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
Ser 32	Aminoácido serina 32
Ser 36	Aminoácido serina 36
SciELO	Scientific electronic library online
SHP	Síndrome Hepatopulmonar
SNAC	N acetilcisteína-S
SOD	superóxido dismutase
SPSS	statistical package for the social sciences
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>TGF-β</i>	fator de transformação de crescimento beta
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
V/Q	Ventilação/perfusão



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Síndrome Hepatopulmonar .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Funções do Fígado.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Estresse Oxidativo .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Defesas antioxidantes:sistema enzimático e não enzimático .....</b>	<b>32</b>
<b>2.6 Estresse Nitrosativo.....</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Fator de transcrição nuclear kappa B .....</b>	<b>37</b>
<b>2.8 Melatonina.....</b>	<b>39</b>
<b>3. MARCO CONCEITUAL .....</b>	<b>43</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Objetivo geral .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1 Objetivos específicos do artigo I .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.2 Objetivos específicos do artigo II .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.3 Objetivos específicos do artigo III .....</b>	<b>47</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>7. ARTIGOS DA TESE .....</b>	<b>58</b>
<b>7.1 Artigo I.....</b>	<b>58</b>
<b>7.2 Artigo II.....</b>	<b>75</b>
<b>7.3 Artigo III.....</b>	<b>94</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>116</b>
<b>8.1 Conclusões Artigo I.....</b>	<b>116</b>
<b>8.2 Conclusões Artigo II.....</b>	<b>117</b>
<b>8.3 Conclusões Artigo III.....</b>	<b>117</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>118</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>119</b>
<b>10.1 Artigos publicados durante a vigência do doutorado.....</b>	<b>119</b>
<b>10.2 Certificados de Resumos enviados para eventos .....</b>	<b>155</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) pode ser definida como um defeito na oxigenação arterial que se apresenta associado a doenças hepáticas. Trata-se de uma tríade clínica que inclui alteração da função hepática, anormalidades nas trocas gasosas e presença de dilatações vasculares pulmonares (Garcia *et al.*, 1996). A fisiopatologia da hipoxemia na SHP é multifatorial e, dentre os mecanismos predominantes, podem ser citados o shunt intrapulmonar, o comprometimento da relação ventilação-perfusão, a baixa difusão e o desequilíbrio da difusão-perfusão ou do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar (Faustini-Pereira *et al.*, 2015).

Para estudar as alterações causadas pela SHP, alguns modelos experimentais têm sido utilizados, sendo um deles a Ligadura do ducto biliar comum em ratos. Estudos experimentais que utilizaram esse modelo encontraram em seus resultados o aumento do estresse oxidativo no tecido hepático, além de alterações pulmonares (Kontouras *et al.*, 1984).

O estresse oxidativo desempenha papel central na patogênese e na progressão de doenças hepáticas. Neste contexto, o uso de antioxidantes tem sido proposto como agente terapêutico, bem como o de drogas coadjuvantes, com o objetivo de compensar os danos sistêmicos e hepáticos (Tieppo *et al.*, 2009; Da Rosa *et al.*, 2010).

Dentre os antioxidantes utilizados, a melatonina (MLT) vem despertando grande interesse da pesquisa científica devido aos seus efeitos clínicos (Simko e Paulis, 2009). Os resultados obtidos em modelos com diferentes níveis analíticos (diferença entre espécies de animais, dosagem, concentração, etc.) ainda são, entretanto, controversos.

Tendo em vista a relevância do tema como um problema clínico e médico-legal, a revisão da literatura realizou-se em busca da abordagem das alterações causadas pela SHP e o efeito antioxidante da melatonina nessa condição.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Estratégia para localizar e selecionar informações**

A presente revisão bibliográfica ressalta os principais aspectos relacionados à Síndrome Hepatopulmonar e ao uso da melatonina (MLT) como estratégia terapêutica. Nela, considerou-se a ação terapêutica da MLT como fator, e a redução nos parâmetros de dano oxidativo e pulmonar como desfecho.

A busca envolveu as bases de dados Pubmed e SciELO, reconhecidas e autorizadas pelo portal CAPES, sendo realizadas buscas por meio dos termos e das combinações apresentadas na Figura 1.

## ORGANOGRAMA DA BUSCA

Pubmed	Palavras Chave	SciELO
991	1. Síndrome Hepatopulmonar	30
173.183	2. Estresse Oxidativo	593
3907	3. Ligadura do ducto Biliar	36
22.288	4. Melatonina	103
565.456	5. Inflamação	1239
151.838	6. Óxido Nítrico	588

<p>1 + 2 = 11            1 + 3 = 68            1 + 4 = 0            1 + 5 = 21            1 + 6 = 126            3 + 2 = 238            3 + 4 = 29            3 + 5 = 393            3 + 6 = 267            4 + 2 = 2022            4 + 5 = 710            4 + 6 = 748            1 + 3 + 2 = 7            1 + 3 + 4 = 0            1 + 3 + 5 = 3            1 + 3 + 6 = 28</p>	<p>1 + 2 = 2            1 + 3 = 3            1 + 4 = 0            1 + 5 = 0            1 + 6 = 0            3 + 2 = 2            3 + 4 = 0            3 + 5 = 2            3 + 6 = 0            4 + 2 = 2            4 + 5 = 0            4 + 6 = 1            1 + 3 + 2 = 2            1 + 3 + 4 = 0            1 + 3 + 5 = 0            1 + 3 + 6 = 0</p>
---	---

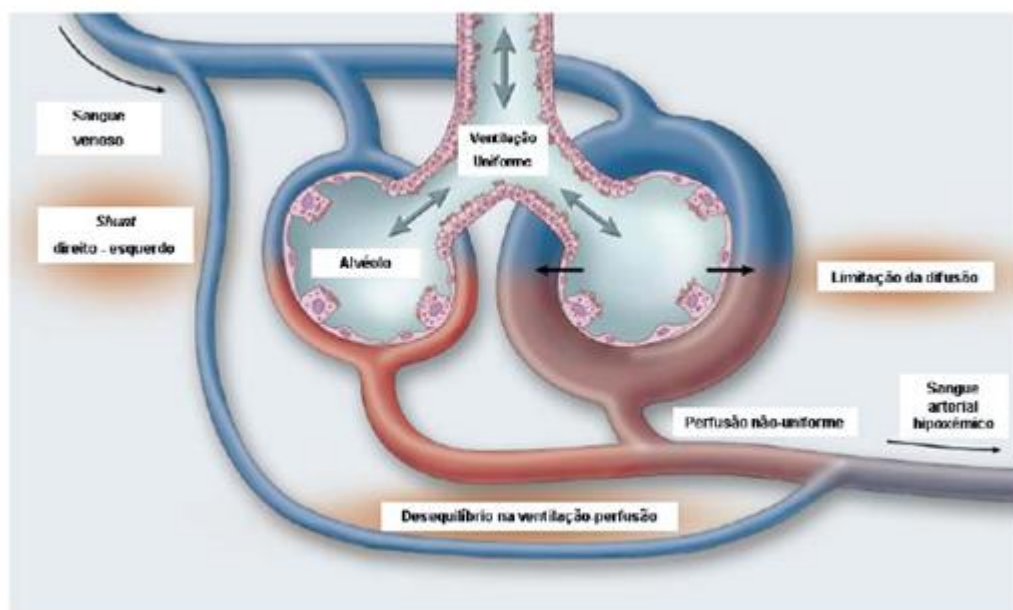
**Figura 1.** Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Nesta busca, foram utilizados 129 artigos para a revisão bibliográfica e o referencial teórico da tese, 39 artigos na redação do artigo I, 25 artigos para o artigo II e 42 artigos para o artigo III. A busca foi realizada no período de 01 a 30 de maio de 2017.

## 2.2 Síndrome Hepatopulmonar

A Síndrome Hepatopulmonar (SHP) caracteriza-se por uma tríade clínica que inclui doença hepática, anormalidades em trocas gasosas e a presença de dilatações vasculares pulmonares (Garcia E. *et al.*, 1996). A obstrução prolongada do ducto biliar é utilizada em modelos experimentais de cirrose biliar secundária que leva a reações inflamatórias agudas, podendo, ainda, ocasionar alterações pulmonares (Silva Júnior OC *et al.*, 1998). Chang e O'Hara (1996) demonstraram que animais submetidos à ligadura de ducto biliar apresentavam desenvolvimento progressivo de anormalidades nas trocas gasosas, similares às aquelas encontradas em humanos com SHP. Foi observado que esses animais cirróticos apresentavam um gradiente alvéolo-arterial de oxigênio superior a 100% associado a hipoxemia moderada (valores inferiores à 85 mmHg). Tais achados estavam associados à vasodilatação intrapulmonar, atribuída aos elevados valores de Oxído Nítrico Sintase Endotelial (eNOS) encontrados no homogeneizado pulmonar (Fallon MB *et al.*, 1997).

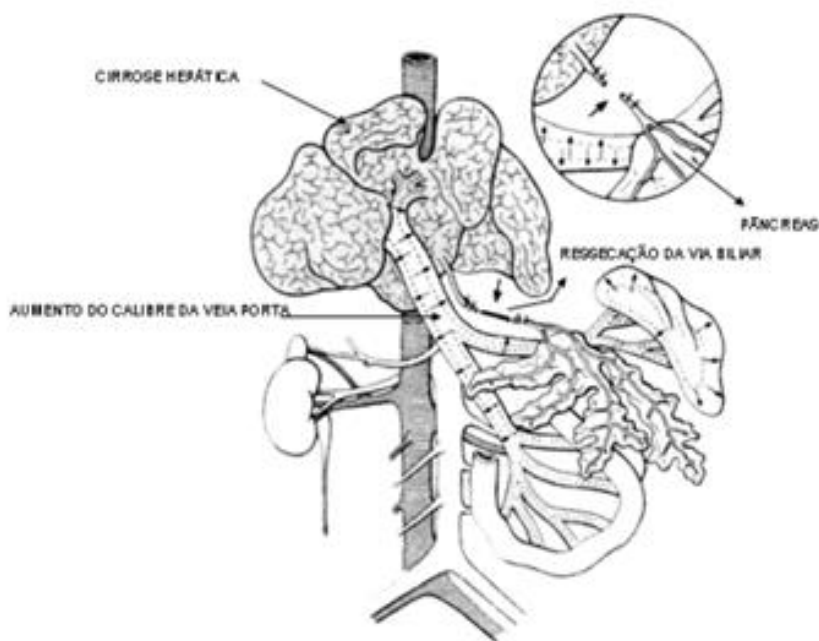
A SHP é definida como um defeito na oxigenação arterial, induzida por dilatações vasculares intrapulmonares, associada a doenças hepáticas. O componente vascular característico da SHP inclui capilares pulmonares dilatados, difusos ou localizados e, menos comumente, comunicações pleurais e comunicações arteriovenosas pulmonares (Koch, 2014). A fisiopatologia da hipoxemia na SHP é multifatorial, e os mecanismos predominantes incluem shunt intrapulmonar, comprometimento da relação ventilação-perfusão, baixa difusão, desequilíbrio da difusão-perfusão ou do gradiente de oxigenação alvéolo-capilar (figura 2).



**Figura 2:** Fisiopatologia da Síndrome Hepatopulmonar (Adaptado de Rodriguez-Roisin e Krowka, 2008).

Animais com cirrose induzida experimentalmente por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) ou ligadura de ducto biliar (LDB) apresentam aumento do estresse oxidativo no tecido hepático (Miltersteiner A *et al.*, 2003; Pavanato MA *et al.*, 2003 e Peres W, 1999).

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos é um modelo experimental para induzir cirrose biliar secundária e fibrose, sendo que estabelece as características próprias da patologia em torno de vinte e oito dias. Nesse período, devido à obstrução do ducto biliar, ocorrem edema, reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar e aparecimento de fibrose periportal devido a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como o colágeno, as glicoproteínas e os proteoglicanos, causando a desorganização da arquitetura natural do parênquima (figura 3).



**Figura 3:** Modelo de cirrose biliar secundária por ligadura de ducto biliar comum. (Adaptado de Kontouras *et al.*, 1984)

O estudo de Tieppo e colaboradores (2005) demonstrou em seus resultados que o modelo experimental de LDB é capaz de reproduzir as principais características clínicas da SHP, tendo sido observado aumento da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), resultados. No artigo publicado por Colares e colaboradores (2016), que utilizou este mesmo modelo experimental, ficou evidenciada a lesão no fígado do grupo com SHP, apresentando melhora significativa dos padrões da doença (cirrose biliar secundária), após o tratamento com melatonina.

Vercelino e colaboradores (2008) observaram aumento significativo das enzimas transaminases nos animais com SHP, com melhora significativa nos animais tratados com N-Acetilcisteína, sendo também verificada a redução do diâmetro dos vasos e da gasometria arterial, com melhora na pressão parcial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ) e na saturação de oxigênio da hemoglobina ( $\text{SatO}_2/\text{Hb}$ ).

No estudo de Berthelot *et al.* (1966), foi observado aumento no diâmetro das arteríolas do tecido pulmonar em animais que foram submetidos à LDB, sendo observado aumento do peso pulmonar no grupo cirrótico em relação ao grupo controle. Tais alterações podem ocorrer devido ao shunt e à dilatação vascular

intrapulmonar, possivelmente encontradas em decorrência da congestão capilar intrapulmonar. A vasodilatação intrapulmonar presente nestes casos pode estar associada à translocação bacteriana, que ocorre devido à ausência ou à diminuição de bile no intestino delgado, que leva à perda do efeito emulsificante e antiendotóxico dos sais biliares, provocando níveis elevados de endotoxinas no intestino grosso, que serão absorvidas através da circulação portal, favorecendo a translocação bacteriana (Cruz CAT *et al.*, 1998).

A lesão hepatocelular impede a adequada filtração do sangue portal, promove o desenvolvimento de shunts portossistêmicos e a dramática diminuição da capacidade fagocitária do fígado, permitindo a entrada de bactérias e endotoxinas na circulação pulmonar. Nessa situação, o pulmão filtra o sangue, compensando o decréscimo da função fagocitária do fígado (Rabiller A *et al.*, 2002). O aumento na atividade fagocitária pulmonar gera o acúmulo de macrófagos no endotélio pulmonar, a ativação de macrófagos secreta produtos para o meio extracelular, incluindo citocinas e óxido nítrico (NO). O NO age como um sinalizador molecular mediando a vasodilatação, quando produzido em baixas concentrações pelo óxido nítrico sintase (NOS) em células vasculares endoteliais, e como uma fonte altamente tóxica oxidante, quando produzido em altas concentrações pela NOS, em macrófagos no processo patológico. As células fagocitárias têm bem caracterizadas a geração de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que é capaz de oxidar a membrana plasmática, produzindo grande quantidade de espécies ativas do oxigênio (EAO) (Thannickal VJ e Fanburg BL, 2000).

No estudo de Tieppo *et al.* (2005), observou-se diminuição na  $PaO_2$  e  $SatO_2/Hb$ , e aumento significativo da  $PaCO_2$  nos animais cirróticos em relação ao grupo controle. Tais resultados puderam ser constatados devido às alterações que ocorrem nas trocas gasosas entre o tecido pulmonar e o sistema sanguíneo arterial. Em relação à diferença alvéolo-arterial, observou-se diferença do grupo LDB em relação ao grupo sham, resultado também observado por Luo *et al.* (1998), quando os animais desenvolveram, além de uma extensa diferença alvéolo-arterial, uma progressiva hiperventilação e hipoxemia, sendo esses achados similares aos encontrados em humanos.



No estudo de Tieppo *et al.* (2005), a avaliação da LPO no homogeneizado de pulmão de ratos controle e cirróticos pós LDB demonstrou, por meio das técnicas de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e Quimioluminescência (QL), aumento significativo da peroxidação lipídica, explicada pela possível ação de células fagocitárias no combate ao processo de translocação bacteriana. A migração de macrófagos para o pulmão leva à produção de radicais superóxido, o que requer o aumento da atividade enzimática antioxidante, observada através do aumento significativo da atividade da superóxido dismutase (SOD), no homogeneizado de tecido pulmonar no grupo cirrótico na tentativa de proteger o órgão da agressão dos radicais livres aí formados. Esse estudo concluiu que o modelo experimental da LDB apresenta as principais características da SHP e sugeriu que o modelo pode ser utilizado em estudos envolvendo estresse oxidativo nas alterações hepáticas e a sua relação com o sistema respiratório.

Quadros hipóxicos são comuns em pacientes com Síndrome Hepatopulmonar. Tal alteração é induzida por dilatações vasculares intrapulmonares, associadas a doenças hepáticas. O componente vascular característico da SHP inclui capilares pulmonares dilatados, difusos ou localizados e, menos comumente, comunicações pleurais e comunicações arteriovenosas pulmonares (Koche Fallon MB, 2014).

Tal desorganização vascular resulta em surgimento de unidades alveolares nas quais a ventilação é preservada, porém a presença de *shunt* arteriovenoso e de vasodilatação pulmonar compromete a manutenção de níveis adequados de oxigênio arterial. Na SHP, a limitação da difusão do oxigênio para o capilar sanguíneo não decorre do espessamento da membrana alvéolo-capilar, mas sim da presença de dilatação do leito vascular, associada a um débito cardíaco aumentado característico da circulação hiperdinâmica do cirrótico (Agusti *et al.*, 1990; Hervé *et al.*, 1998; Krowka, 1995). Além disso, a presença de mediadores produzidos ou metabolizados pelo fígado como o NO, um vasodilatador biológico potente derivado do endotélio - e que pode estar aumentado no fígado do cirrótico - pode ser um importante contribuinte para a vasodilatação pulmonar. A prevalência de SHP em pacientes com cirrose é de, aproximadamente, 10 a 20%, contribuindo com o aumento da morbidade e da mortalidade desses pacientes (Rodríguez *et al.*, 2004).

As principais manifestações da SHP são dispnéia e platipnéia (aumento da dispnéia induzida pela mudança do decúbito supino para a posição ortostática), associadas à fadiga, além dos achados clínicos de cianose e hipocratismo digital. A dispnéia é considerada o sintoma pulmonar mais frequente, sendo associada à presença de hipoxemia, que pode ser agravada pelo exercício físico (Agusti *et al.*, 1989)

O diagnóstico da SHP é definido pelo alargamento da diferença da pressão artério-alveolar (AaO<sub>2</sub>) acima de 15mmHg e/ou pela presença de hipoxemia, caracterizada por PaO<sub>2</sub> < 70mmHg; por doença hepática comprovada e por dilatações pulmonares intravasculares evidenciadas por meio de Ecocardiograma (Krowka *et al.*, 2004).

Segundo o estudo de Krowka e Cortese (1994), a SHP pode ser classificada em dois tipos, de acordo com a PaO<sub>2</sub> e com os achados angiográficos. A SHP tipo I é caracterizada pela presença de dilatações pré-capilares difusas com boa resposta à administração de oxigênio; no tipo II são encontradas pequenas vasodilatações e malformações arteriovenosas, sem resposta à administração de oxigênio (Krowka e Cortese, 1994). Em contrapartida, Rodríguez-Roisin e colaboradores (2004) propuseram a classificação para estadiamento da SHP em quatro tipos, com base nas alterações gasométricas, sendo a síndrome considerada leve quando a PaO<sub>2</sub> > 80mmHg, moderada quando PaO<sub>2</sub> < 80 mmHg e > 60mmHg, grave se < 60 mmHg e > 50mmHg e muito grave em pacientes com PaO<sub>2</sub> < 50mmHg (Rodríguez-Roisin *et al.*, 2004).

O uso de oxigenoterapia por período prolongado é indicado para pacientes cirróticos com hipoxemia acentuada (Rodríguez-Roisin *et al.*, 2004), sendo o transplante de fígado a única alternativa eficaz associada à reversão da hipoxemia a longo prazo. Diversos estudos, entretanto, apontam que a presença de SHP está relacionada a maior mortalidade após o transplante de fígado (Swanson KL *et al.*, 2005; Arguedas MR *et al.*, 2003, Taillé C *et al.*, 2003 e West JB e Wagner PD, 1977), sendo identificados como fatores de risco a presença de PaO<sub>2</sub> < 50mmHg e a fração de shunt superior a 20%.

Estudos apontam que animais com cirrose induzida experimentalmente por LDB ou por CCl<sub>4</sub> apresentaram aumento do estresse oxidativo no tecido hepático (Milstersteiner A *et al.*, 2003; Pavanato MA *et al.*, 2003; Peres W., 1999), porém a inter-relação das alterações hepáticas e pulmonares ainda não está bem esclarecida.

Como a SHP é um distúrbio vascular pulmonar induzido pela doença hepática que causa dilatação microvascular pulmonar e proliferação excessiva de células endoteliais microvasculares pulmonares (PMVECs), estudos sugerem que um novo mecanismo, a autofagia, esteja envolvido nas complicações pulmonares. Sendo assim, é interessante e importante ter ideia de que a autofagia pode estar envolvida na SHP. No estudo de Xu e colaboradores (2016), foi relatado que a autofagia foi ativada em animais com ligadura do ducto biliar comum. Os resultados sugerem que a ativação da autofagia pode desempenhar um papel crítico na patogênese do SHP, e a inibição desta pode ter potencial terapêutico para esta doença. (Xu *et al.*, 2016).

Em recente revisão publicada por Grilo-Bensusan e Pascasio-Acevedo (2016) reforçou-se que a síndrome hepatopulmonar é caracterizada por anormalidades na oxigenação causadas pela presença de dilatações vasculares intrapulmonares. O conhecimento sobre o assunto ainda é investigado, no entanto, a maioria das informações sobre a etiopatogênese da SHP é obtida através de estudos experimentais. A prevalência da doença em pacientes candidatos a transplante de fígado varia entre 4% e 32%, com predominância de casos leves ou moderados. Embora seja geralmente assintomático, ela tem um impacto na qualidade de vida e na sobrevivência dos pacientes. O diagnóstico requer a realização da gasometria arterial, na qual a diferença alvéolo-arterial (AaO<sub>2</sub>) deve ser  $\geq 15$  mmHg. Atualmente, não há tratamento efetivo, em que o transplante hepático demonstrou reverter a síndrome e melhorar as taxas de sobrevivência, mesmo nos casos mais graves. (Grilo-Bensusan e Pascasio-Acevedo, 2016).

### **2.3 Funções do Fígado**

O fígado é o órgão que desempenha papel muito importante para o funcionamento e a manutenção de diferentes funções vitais à saúde do organismo, atuando diretamente na síntese e no metabolismo de inúmeras substâncias. A

síntese e a secreção de sais biliares que ocorre a partir deste está envolvida diretamente em funções digestivas; porém o órgão também participa ativamente na regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios; além do armazenamento de substâncias e degradação e excreção de hormônios (Zimmerman, 1999; Schinoni, 2008).

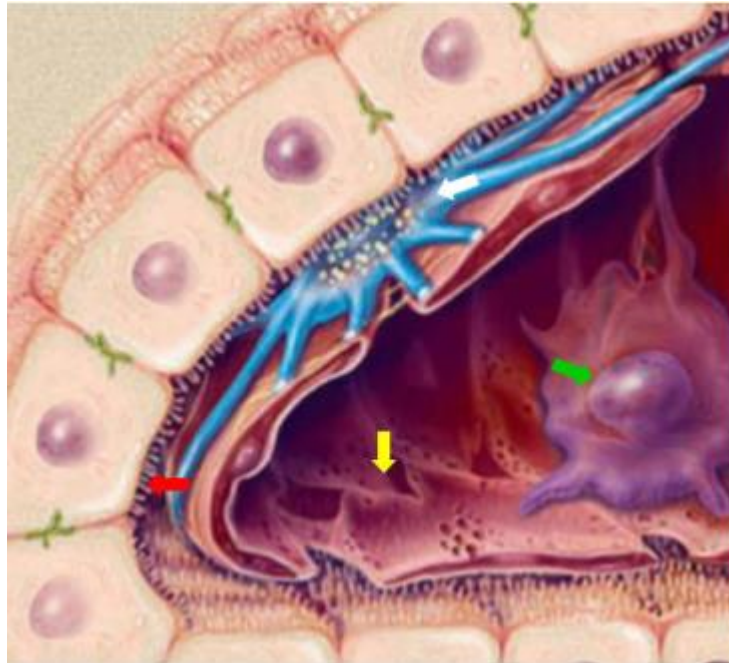
O fígado é o maior órgão interno do organismo, pesando em média 1,5 Kg, mede cerca de 15 cm em seu plano coronal e 20 cm no plano transversal. Está localizado no quadrante superior direito do abdômen onde se encontra protegido pelas costelas inferiores (Triviño e Abib, 2003; Coelho, 2012).

Sendo o fígado um órgão vital para a manutenção da vida, apresenta-se com uma estrutura complexa, constituído principalmente por células hepáticas, que se anastomosam, ou seja, ligam-se umas às outras constituindo, assim, unidades morfológicas maiores denominadas de lóbulos hepáticos (Sherlock, 1984).

Nos lobos hepáticos, os hepatócitos ou células hepáticas dispõem-se de maneira uniforme formando placas ordenadas radialmente a partir de uma veia central e entrelaçadas de maneira ordenada por sinusoides hepáticos. Os sinusoides são basicamente condutos de sangue sem parede estruturada e que se apresentam revestidos por células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, são conhecidos como células de Kupffer (Friedmane Arthur, 2002; Coelho, 2012).

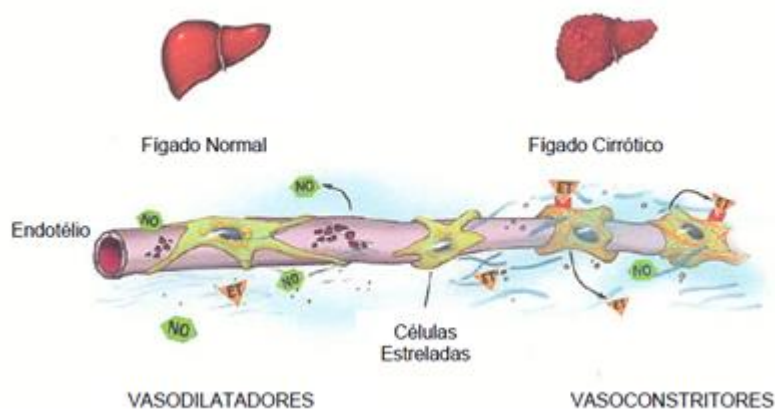
As células de Kupffer são conhecidas por sua função fagocitária e pertencem ao sistema retículo endotelial. Podem ser ativadas por diferentes fatores, dentre estes se podem citar as endotoxinas, sepsis, ácido araquidônico e fator de necrose tumoral (TNF), entre outros. Como resultado da ativação destas células ocorre a produção de citocinas, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO), interleucinas (IL), interferon alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ) e vários prostanoídes (Miltnersteiner, 2003; Coelho, 2012).

O estreito espaço que separa o sinusóide dos hepatócitos é denominado espaço de Disse, onde se localizam as células estreladas hepáticas (CEH), (Figura 4) (Friedmane Arthur, 2002; Friedman, 2008).



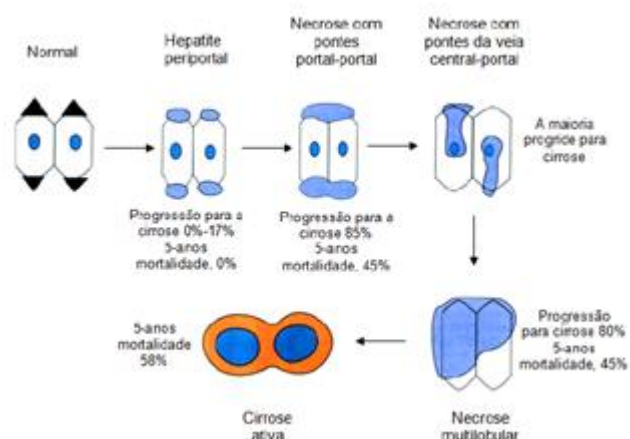
**Figura 4:** Detalhes da estrutura hepática. Espaço subendotelial de Disse com presença de células estreladas quiescentes (seta branca), células de Kupffer (seta verde), microvilosidades (seta vermelha) e fenestrações (seta amarela). Fonte: adaptada (Friedman Arthur, 2002).

No fígado normal, ocorre equilíbrio entre as substâncias vasoconstritoras - Endotelina 1 (ET-1) e vasodilatadoras (NO). Na presença da doença hepática ocorre o desequilíbrio, com aumento da ET-1 e diminuição do NO. Em decorrência disso, há aumento da contratilidade das células estreladas, constrição sinusoidal, com aumento da resistência intra-hepática ao fluxo sanguíneo. Além desses mediadores, existem outros, como a angiotensina II, prostanoídes e monóxido de carbono, que podem também desempenhar um papel na endoteliopatia encontrada na cirrose. A disfunção endotelial pode estar presente nos compartimentos vasculares intra-hepáticos não sinusoidais (figura 5).



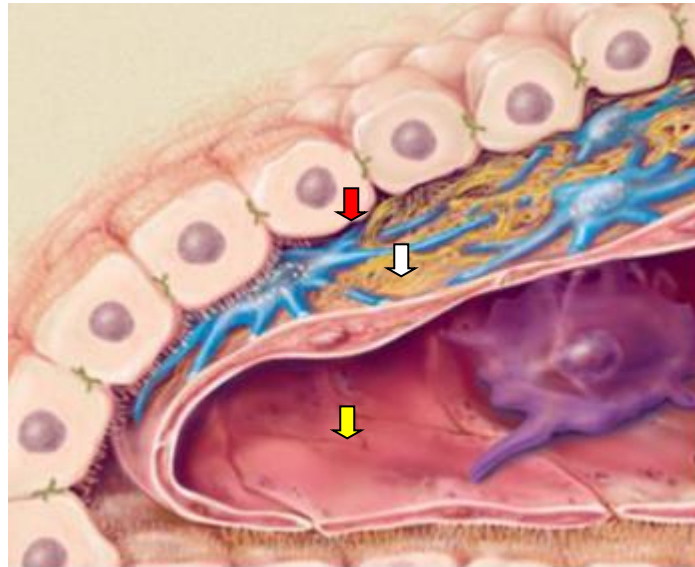
**Figura 5:** Endoteliopatia presente na circulação intra-hepática (Adaptado de Rockey, 2003)

A presença de nódulos formados a partir dos septos de fibrose no tecido hepático é condição essencial para o desenvolvimento da cirrose. Os septos de fibrose podem envolver um lóbulo único, formando pontes de uma veia porta a outra, podendo atravessar todo o lóbulo. Também podem unir-se com a veia central (veia porta), formando vários nódulos menores ou ainda, se estiver envolvido com muitos lóbulos pode criar um nódulo maior. Na cirrose, ocorrem alterações morfológicas baseadas nos tamanhos dos nódulos hepáticos: o micronodular, em que os nódulos apresentam um tamanho menor que 3 mm de diâmetro e normalmente mostram variação de tamanho, e o tipo chamado misto, que é formado por uma mistura entre o tipo micronodular e macronodular, acima de 3 mm (figura 6).



**Figura 6:** Hepatócito normal e processo de progressão da cirrose. (Adaptado de Schiff *et al.*, 2003).

Em casos em que a lesão hepática torna-se crônica, uma matriz fibrilar, produzida a partir da ativação das CEH, passa a ser acumulada no espaço subendotelial de Disse, resultando na perda das microvilosidades dos hepatócitos e reduzindo o tamanho e o número de fenestrações presentes neste espaço, fazendo com que menos substâncias ligadas a proteínas cheguem ao hepatócito. Essas alterações ainda podem vir acompanhadas da ativação das células de Kupffer dentro dos sinusoides (Figura 7) (Friedman e Arthur 2002; Friedman 2008; Bona, 2010).



**Figura 7:** Arquitetura hepática com injúria crônica. Espaço subendotelial com presença de fibrose (seta branca), perda de fenestrações (seta amarela) e microvilosidades (seta vermelha). Fonte: adaptada (Friedman e Arthur, 2002).

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 (Hernandez-Gea e Friedman, 2011; Novo *et al.*, 2014).

A cirrose frequentemente se desenvolve insidiosamente ao longo de muitos anos (20 a 40 anos), sendo o ritmo influenciado por fatores genéticos e ambientais (Hernandez-Gea e Friedman, 2011). 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 (Snowdon VK e Fallowfield, 2011).

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 (Snowdon VK e Fallowfield, 2011).

## 2.4 Estresse Oxidativo

O estado de desequilíbrio entre as espécies oxidantes e os antioxidantes, a favor das oxidantes é conceituado de estresse oxidativo. Esta situação ocorre devido a geração exagerada de espécies ativas de oxigênio (EAO) e/ou de radicais livres (RL) ou a redução das defesas antioxidantes (Halliwell, 1989). Os organismos aeróbios, por necessitarem de oxigênio para produzirem ATP, utilizam metabolismo oxidativos, essa forma de fonte energética gera espécies intermediárias derivadas do  $O_2$ , conhecidas por EAO (Boveris e Chances, 1973).

As EAO são produzidas fisiologicamente durante a conversão do oxigênio molecular em água, na cadeia eletrônica mitocondrial. A cadeia eletrônica fornece elétrons de forma monovalente, gerando assim ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 8). O  $H_2O_2$  é uma molécula estável, porém, facilmente, na presença de metais de transição forma o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) (Thannickal e Fanburg, 2000). Esse último, um radical livre, muito mais reativo e nocivo aos ácidos graxos da membrana lipídica (Halliwell, 1989). Além do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e do radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), também são conhecidas por EAO o radical peroxil ( $ROO\cdot$ ) e o alcoxil ( $RO\cdot$ ), ânion hipoclorito ( $OCl^-$ ) e oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) (Barp et al., 2002). Os radicais livres são capazes de oxidar moléculas biológicas, pois são extremamente reativos devido ao último orbital desemparelhando.

Outras espécies oxidantes que merecem atenção são as derivadas do óxido nítrico (NO). Sua relevância se deve a capacidade de se combinar com as EAO,



gerando o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que potencializa o estresse oxidativo. Essa última espécie é muito reativa e danosa à célula (Halliwell, 1989).

As EAO são formadas nas cristas mitocondriais, na reação NADPH/NADP, no metabolismo da xantina oxidase, no retículo endoplasmático, no processo isquemia/ reperfusão e nos insultos inflamatórios.

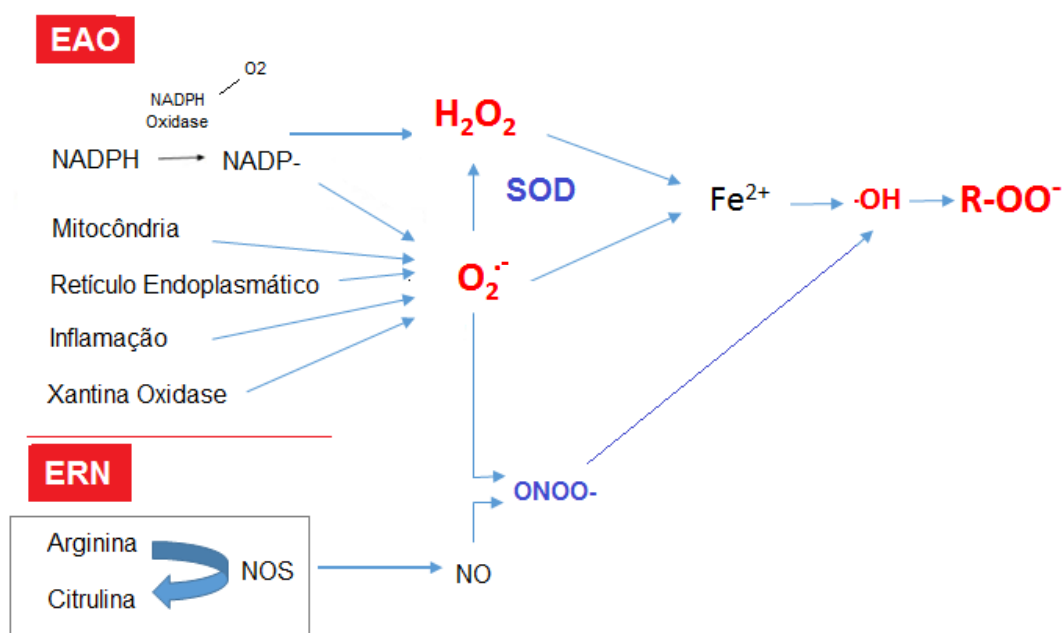


Figura 8: Esquema da geração das espécies ativas de oxigênio (EAO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN). NADPH: fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo; O<sub>2</sub>: oxigênio; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; SOD: superóxido de dismutase; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; Fe<sup>2+</sup>: íon ferro; OH<sup>-</sup>: radical hidroxil, R-OO<sup>-</sup>: radical peroxil (MOREIRA, 2015).

Os radicais livres podem oxidar os lipídios, causando a lipoperoxidação (LPO), assim como pode oxidar proteínas, gerando a inativação enzimática ou a alteração do estado redox intracelular; e por fim podem danificar a estrutura do DNA (Favier et al., 1995). São esses eventos nocivos que tornam importante entender o estresse oxidativo e suas repercussões sistêmicas. Neste contexto, a geração de EAO e RL contribui com um ambiente favorável aos múltiplos processos patológicos, mantendo ou agravando o estado de doença (Klaunig et al., 2010).

A superprodução de EAO e RL, associada a precária resposta das defesas antioxidante, pode ser responsável pelo dano oxidativo de macromoléculas. Exemplo desta condição, é a o que ocorre na inflamação crônica que ocasiona ativação de inúmeros fatores pró-inflamatórios e proliferativos. Nesse ambiente, mediadores químicos associado ao aumento do metabolismo local e as disfunções vasculares que potencializam a formação de mais EAO. Na sequência, estimulam as células envolvidas com o processo de reparo, resultando em maior depósito de fibrose. Muitos autores citam a forte relação entre aumento do EO e a presença da fibrose (Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012). Bona et al, 2012, refere que animais cirróticos exibiam maiores valores de LPO e maior depósito de fibrose na avaliação histológica.

Dröge (2002), relata que as EAO podem estimular as vias de transdução de sinal e levar à ativação de fatores chave de transcrição como fator nuclear eritroide-2 (Nrf2) e NF $\kappa$ B, contribuindo para o agravamento e para a manutenção da doença (Klaunig et al., 2010).

O estresse oxidativo se sustenta na presença que quadros inflamatórios, como na cirrose, na hipertensão portal e na síndrome hepatopulmonar (SHP), pois nesses ambientes existem aumento do metabolismo, alteração do pH e altas concentrações de metais de transição, que facilita a produção de radicais livres. (Wang et al., 2006).

## **2.5 Defesas antioxidantes: sistema enzimático e não enzimático**

O organismo dispõe de eficiente sistema de detoxicação dos RL e das EAO. Sabe-se que os RL só são estabilizados quando reagem com outro radical ou com a ação química do sistema antioxidante. Os antioxidantes atuam de duas formas estabilizando a EAO ou se ligando aos íons de transição. Eles podem, então: prevenir a formação de novos RL, como a superóxido dismutase (SOD), a glutationala peroxidase (GPx) e as proteínas de união com metais (ferritina e ceruloplasmina); reagir com radicais, evitando as reações em cadeia, como as vitaminas E e C, o ácido úrico e a albumina; e reparar as moléculas oxidadas por radicais, como por exemplo, enzima reparadora de DNA (Cheeseman e Slater, 1993).

Esse sistema de defesa pode ser de origem enzimática ou não-enzimática. As defesas antioxidantes enzimáticas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationala peroxidase (GPx), glutationala dissulfeto redutase (GR) e glutationala

S transferase (GST) (Travacio e Llesuy, 1996). As defesas antioxidantes não enzimáticas são compreendidas pelas vitaminas ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico), glutathiona e flavonoides (Koul, Bhatia e Bansal, 2001).

A principal função do sistema antioxidante enzimático é manter o equilíbrio entre a produção de substâncias pró-oxidante e antioxidante, que muitas vezes o organismo fica exposto, evitando aumento das oxidantes. Cada enzima deste sistema desempenha um papel específico no controle do balanço oxidativo.

Na reação I exibe a ação catalítica da SOD junto ao ânion superóxido. Essa enzima é responsável pela dismutação do ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Apresenta-se em três formas: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a Cu-ZnSOD situada no endotélio vascular e, por último, a SOD-manganês, presente na matriz mitocondrial (Chance et al., 1979).



Ao final da dismutação do ânion superóxido é formado o peróxido de hidrogênio e o  $O_2$ . O  $H_2O_2$ , não é considerado um radical, porém facilmente reage com metais de transição, formando o radical hidroxil. Para remover os peróxidos, são utilizadas duas enzimas a CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto que a GPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (Travacio e Llesuy, 1996). A ação da catalase sobre o peróxido é apresentada na reação II.



A GPx como dito anteriormente, atua sobre peróxidos orgânicos, localizada no citosol e na matriz mitocondrial e, reduz os peróxidos à água, por meio da oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Particularmente, nessa reação há necessidade de restabelecer a glutathiona oxidada (GSSG), por isso Glutathiona Redutase (GR) consome NADPH para restaurar a GSSG em GSH, como é descrito na Figura 9 (Halliwell, 1989).

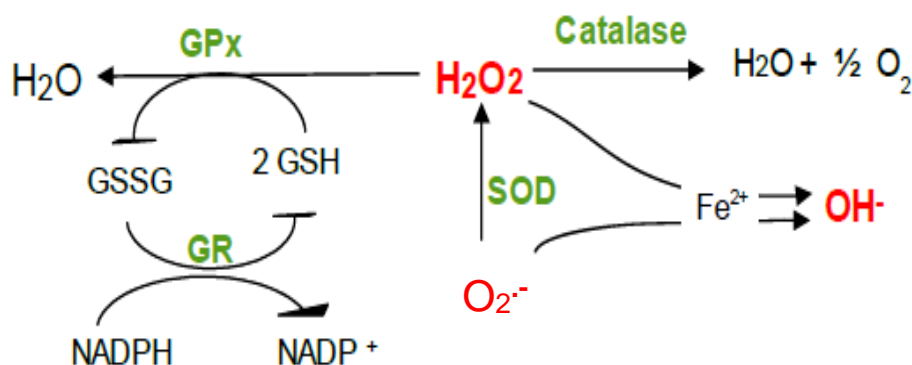


Figura 9: Sistema de defesa antioxidante e a interação entre as enzimas.  $\text{H}_2\text{O}$ : água; GPx: Glutathione Peroxidase;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrogênio;  $\text{O}_2$ : oxigênio; GSSG: Glutathione oxidada; GSH: Glutathione reduzida; GR: Glutathione Redutase; SOD: Superóxido de dismutase NADPH: fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo;  $\text{Fe}^{2+}$ : íon ferro;  $\text{OH}^{\bullet}$ : radical hidroxil (Moreira, 2015).

Para reforçar o sistema das defesas antioxidantes endógeno e manter o equilíbrio redox estável, os organismos aeróbios podem utilizar o sistema de suplementação de substâncias exógenas que desempenham a função de antioxidantes. São substâncias capazes de doar elétrons para os RL, assim estabilizando-os. Dentre elas estão vitaminas ( $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico ou vitamina C), glutathione, quercetina, flavonoides e melatonina (MLT) (Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012). Essa pesquisa tem por proposta investigar os efeitos antioxidante e anti-inflamatório da melatonina (Reiter et al., 2007), em animais cirróticos por LDB e com SHP.

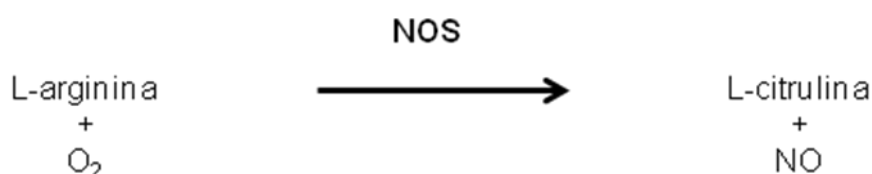
## 2.6 Estresse Nitrosativo

O NO é considerado um segundo mensageiro intracelular com inúmeras funções biológicas, incluindo as funções neurotransmissora, vasodilatadora, imunológica e metabólica (Bredt, 1999). O NO é gerado a partir dos substratos arginina e  $\text{O}_2$  por uma família de três isoformas do NOS: NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e a NOS induzível (iNOS). Estudos anteriores têm mostrado que essas isoformas exibem uma ampla distribuição tecidual, incluindo o tecido muscular esquelético (Reid, 2001). O NO é consideravelmente menos reativo que o radical  $\bullet\text{OH}$ , porém sua interação com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produz outra ERN, o  $\text{ONOO}^-$ , capaz de se

decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico. Ao contrário de outras EAO e a exemplo do  $\bullet\text{OH}$ , o NO, bem como o  $\text{ONOO}^-$ , não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e, principalmente, pelas concentrações de  $\text{O}_2\bullet^-$  disponíveis (Kooy e Royal, 1997).

As EAO e ERN são produtos do metabolismo celular fisiológico, possuindo um duplo papel, que pode ser nocivo ou benéfico para o organismo. Diversas funções fisiológicas são controladas por essas moléculas, incluindo a regulação do tônus vascular, defesa contra microorganismos invasores e células nocivas, monitoramento da tensão de oxigênio no controle da ventilação e na produção de eritropoetina, além de atuar como mediador e modulador de sinalização molecular (Ascensão *et al.*, 2007; Buonocore e Groenendaal, 2007).

A síntese do NO ocorre pela ação da enzima NOS, através da conversão de L-arginina e oxigênio em L-citrulina e NO (figura 9).



**Figura 10:** Síntese do NO. Fonte: Adaptada (Liaudet *et al.*, 2000).

A produção de NO é principalmente gerada através da síntese de óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima catalisa a oxidação de um nitrogênio guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina (figura 9). Existem três formas de NOS identificadas: eNOS, a nNOS e a iNOS. A eNos é uma NOS constitutiva e produz NO no endotélio vascular sob condições basais, mas a força de cisalhamento produzida pelo fluxo sanguíneo pode incrementar sua produção, a nNOS que regula a transmissão neuronal e a iNOS identificada primeiramente nos macrófagos está relacionada aos danos teciduais e presente na inflamação e apoptose celular (Knowles e Moncada, 1994; Davis *et al.*, 2001).

O NO pode ser dividido de acordo com o mecanismo de ação da molécula com sua célula alvo. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas: quando

interage diretamente com a molécula do sistema alvo e quando existem intermediários de espécies ativas de oxigênio como o  $O_2^{\bullet-}$  que podem reagir com o NO, podendo levar à formação de ERN, como o ONOO<sup>-</sup> (Villanueva e Giulivi, 2010). A produção exacerbada de espécies reativas de nitrogênio é conhecida como estresse nitrosativo. Isso ocorre quando a geração de ERN em algum sistema excede a habilidade do sistema em estabilizá-las e/ou eliminá-las (Valko *et al.*, 2007).

O óxido nítrico sob condições fisiológicas desempenha um papel essencial na homeostase vascular bem como no sistema imune e atua como uma molécula moduladora em diferentes processos fisiológicos como na regulação da integridade e motilidade intestinal (Wolin, 2000; Krieglstein *et al.*, 2001; Kolios *et al.*, 2004; Soufli *et al.*, 2016). Estímulos, como pela isquemia e reperfusão, levam ao aumento dos níveis de NO e à produção de peroxinitrito, causando acentuada peroxidação lipídica, protéica e modificações no DNA, resultando em danos celulares (Liu *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2013).

Na I/R intestinal, a produção aumentada de NO leva à disfunção celular da mucosa, acarretando uma série de eventos prejudiciais ao órgão isquêmico como perda da integridade da barreira da mucosa e a consequente liberação de mediadores inflamatórios para outros sistemas podendo levar à inflamação sistêmica característica da Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) (Carden e Granger, 2000; Krieglstein *et al.*, 2001; Granger e Kvietys, 2015). O aumento dos níveis de NO é associado à expressão da forma induzível iNOS que não está presente em condições normais, mas pode ser induzida em resposta a citocinas e fatores de transcrição nuclear, levando, assim, ao aumento dos níveis de NO, o que contribui para a fisiopatologia da lesão por isquemia/reperfusão (I/R) intestinal e consequentes danos sistêmicos (Takizawa *et al.*, 2011; Granger e Kvietys, 2015). Sun *et al.* (2015) utilizaram a dexmedetomidina (DEX) como tratamento na lesão intestinal induzida por I/R e demonstraram que os níveis de NO foram significativamente reduzidos em comparação com o grupo I/R, sugeriram que NO é um mediador crítico da resposta inflamatória durante o desenvolvimento da lesão intestinal. Estudos sugerem que a iNOS desempenha papel importante no agravamento da lesão I/R, e que a sua inibição implica a redução da produção de NO (Liu *et al.*, 2007; Kudoh *et al.*, 2014; Akcilar *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015). Takizawa *et al.* (2011) observaram aumento nos níveis de NO e uma expressão

aumentada do gene da iNOS em modelo animal de lesão intestinal I/R (Takizawa *et al.*, 2011).

## **2.7 Fator de transcrição nuclear kappa B**

### **Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B)**

O fator nuclear kB - NF $\kappa$ B – é considerado um dos principais fatores nucleares ligados a resposta inflamatória. Encontra-se no citoplasma na sua forma inativada, porém a fosforilação da subunidade NF $\kappa$ B (p65) pode afetar funções importantes, como a ativação da transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios e de sobrevivência celular. Os sinais que ativam o NF $\kappa$ B são originados por estímulos decorrentes de: citocinas, sinais mitogênicos, mediadores biológicos, produtos bacterianos, produtos virais, estresse físico, estresse oxidativo e agentes químicos (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994). Na presença do estresse oxidativo, pode ser ativado, resultando no desacoplamento do seu inibidor (I $\kappa$ B) e no movimento em direção ao núcleo (Figura 11 ). No núcleo, se liga a região promotora de genes alvos e iniciando a expressão de genes de moléculas de adesão e de mediadores inflamatórios (Thanos e Maniatis, 1995; Bakkar e Guttridge, 2010). É formado por um complexo dímero da família de polipeptídeos da família Rel/ NF $\kappa$ B, que se divide em duas classes: a primeira classe consiste de proteínas precursoras p105 e p100, que são processadas e maturadas nas formas de p50 e p52, respectivamente. A segunda classe é representada pelas proteínas do tipo Rel (c-Rel), v-Rel, Rel A (p65) e Rel B (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994).

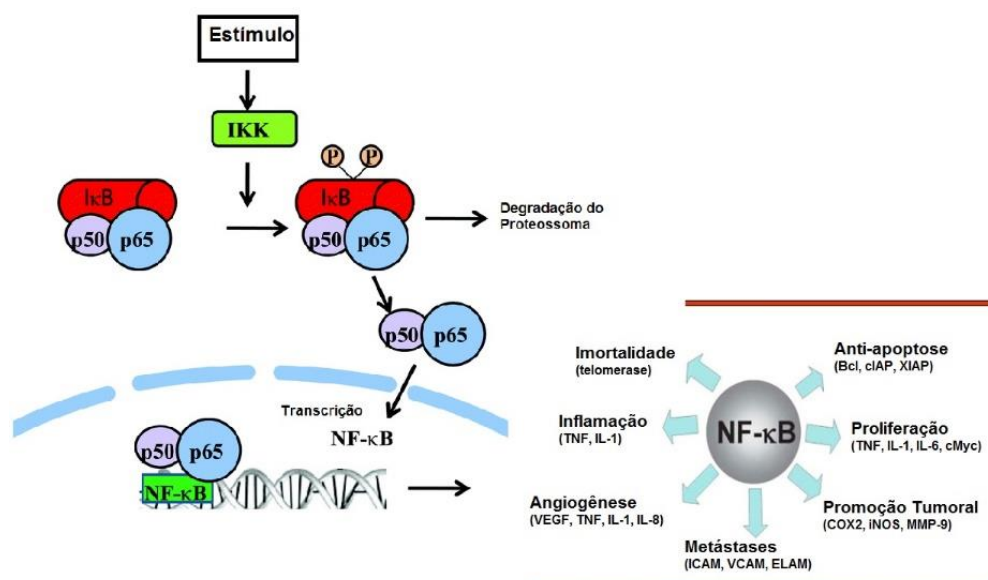


Figura 11: Ativação do NF $\kappa$ B e suas ações sobre a inflamação (Adaptado de Tabrunyn e Griffion, 2008; Walston, 2015).

Em condições basais o NF $\kappa$ B encontra-se inativo, no citoplasma, ligado a uma proteína inibitória I $\kappa$ B. Entretanto, inúmeros estímulos são capazes de inativar o inibidor, e assim permitir a rápida translocação do fator para o núcleo, para que seja iniciada a transcrição nuclear (Siebenlist, Franzoso e Brown, 1994).

Muitos pesquisadores acreditam que o conhecimento sobre esse fator e o entendimento das vias utilizadas por ele seja o caminho para elucidar a complexa rota inflamatória. Como exemplo, muitos sinais de transdução têm sido implicados na ativação do NF $\kappa$ B, capazes de iniciar a cascata de fosforilação (Bours et al., 1992). As vias de comunicação celular e de sinalização entre o citoplasma e o núcleo são extremamente complexas, porque a ativação da resposta dos fatores nucleares é dependente do estímulo transmembrana, dos receptores, da proteína quinase, do 2<sup>o</sup> mensageiro, dos processos de fosforilação e das proteínas citoplasmáticas envolvidas.



Existem bases científicas que sugerem que substâncias oxidantes, como as EAO, sejam capazes de atuar como sinalizadores ao NF $\kappa$ B. E que antioxidantes exercem capacidade regulatória sobre a função do fator nuclear  $\kappa$ B. Este fato demonstra que, o NF $\kappa$ B é um fator de transcrição responsivo ao estresse oxidativo (Van Den Berg et al., 2001).

## **2.8 Melatonina**

### **Melatonina: características e funções**

Muitos autores têm apresentado o desequilíbrio redox como peça central na patogênese e progressão de doenças hepáticas. E como prova dessa hipótese, eles têm demonstrado que o uso de antioxidantes é capaz de reverter o quadro de doença instalado. Com base nessas evidências, tem sido proposto que o controle do estresse oxidativo pode ser uma forma promissora de terapia alternativa, bem como, o uso de antioxidantes exógenos para compensar os danos sistêmicos e hepáticos (Moreira et al., 2004; Tieppo et al., 2009; Bona et al., 2012).

N-acetil-5-metoxitriptamina, conhecida por melatonina (MLT), é uma indolamina lipofílica, formada a partir do triptofano e produzida, principalmente, pela glândula pineal dos vertebrados (Reiter e Tan, 2002; Reiter et al., 2007). As principais funções da melatonina estão associadas ao controle e tratamento de alterações ligadas ao ritmo circadiano (Kostoglou-Athanassiou, 2013; Perdomo et al., 2013); ao ritmo do sono, ao humor, à maturação sexual e reprodução, à função imunitária e ao envelhecimento (Mills et al., 2005, Allegra et al., 2003, Reiter et al., 2001). Recentemente, está sendo citada como um potente antioxidante, que atua de forma sinérgica ao sistema de defesa antioxidante (Perdomo et al., 2013).

A melatonina é descrita por inúmeras ações, que são dependentes do receptor que se liga (M1, M2 e M3), do tipo de célula em que está atuando e dos níveis de hormônios corticotrópico. Dentre as ações, podem ser elencadas: atividade anti-angiogênica (Lissoni et al., 2001), atividade anti-inflamatória (Lissoni et al., 1997), imunoestimulação (Brzezinski et al., 1997, Lissoni et al., 2002), antioxidante (Reiter et al., 2004) e oncostática (Mills et al., 2005; Reiter et al., 2007, Blask et al., 2002). Os efeitos oncostáticos foram descritos pela primeira vez por Blask et al. (2002), e atualmente, são amplamente estudados, principalmente em tumores de mama, cólon e ovário (Shiu et al., 2003, Mills et al., 2005; Otolora et al., 2008; Jung et al., 2010; Carbajo-Pescador et al., 2011).

Dentre os antioxidantes exógenos não enzimáticos, a melatonina foi considerada a que melhor desempenhou o papel de substância antioxidante, apresentando resultados melhores no controle do estresse oxidativo que o *α*-tocoferol e o ácido ascórbico (Reiter et al., 2001; Reiter et al., 2003). Sua estrutura molecular é composta de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, que lhe permite doar elétrons para estabilizar RL. Graças a essa característica química, ela exibe ação antioxidante. A melatonina tem boa mobilidade pelas barreiras morfofisiológicas, devido ao seu peso e pela propriedade de anfifilicidade. Esse trânsito facilitado garante seu rápido acesso aos locais de produção de radicais livres, por exemplo, nas cristas mitocondriais (Reiter et al., 2001; Reiter et al., 2003) (Figura 12). Reiter et al., 2003 refere que a melatonina atua como *scavenger* sobre os radicais livres e também, estimula a produção de várias enzimas antioxidantes.

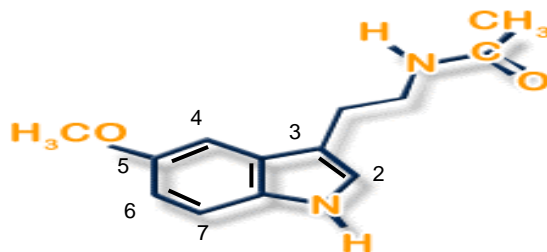


Figura 12: A estrutura química da Melatonina. É uma indolamina, com PM de 232,27 g/mol, característica química de anfifilicidade, A propriedade antioxidante é conferida pela dupla ligação presente nos carbonos 2 e 3 (do anel pirrólico) que possuem alta capacidade de doar elétrons (Cipolla-Neto e Afeche, 2008).

Somado aos efeitos antioxidantes, a melatonina também atua como anti-inflamatório, por sua capacidade de reduzir a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da ciclo-oxigenase (COX-2) (Mauriz et al., 2013; Perdomo et al., 2013). Nos estudos que demonstraram tal efeito, provaram que o controles dessas enzimas resultaram em redução na liberação de inúmeras de moléculas pró-inflamatórias (Perdomo, et al., 2013). A melatonina modula a ativação de: NFκB, controlando resposta inflamatória e proliferativa; do fator induzível por hipóxia (HIF), revertendo as disfunções vasculares e sobre o fator nuclear eritróide-2 (Nrf2), estimulando a ação cito-protetora (Mauriz et al., 2013; Carbajo-Pescador et al., 2013; Vriend e Reiter et al., 2015).

Esse fator, Nrf2, é estimulado na presença de substâncias oxidantes ou de ambientes em estresse oxidativo agudo, porém foi provado que a melatonina é capaz de ativar o Nrf2 que é responsável pela transcrição de várias enzimas antioxidante (Venugopal e Jaiswal, 1996; Tripathi e Jena, 2010). Devido a isto, é possível que sistemas biológicos expostos à melatonina obtenham altos níveis de enzimas detoxificantes da fase I, tornando-os mais preparados para situações de estresse oxidativo ou situações de toxicidade.

Tripathi e Jena, (2010) relataram que após o uso de melatonina, foi observado aumento da expressão de enzimas detoxificantes - Heme Oxigenase 1 (HO-1) e NAD(P) quinona oxidoreductase-1 (NOQ1), e eles associam esse aumento pela ativação do Nrf2.

O fator de transcrição NF $\kappa$ B exerce comportamento dual nos organismos celulares, pois é responsável pela expressão de muitos genes que regulam a resposta imune, inflamatória e apoptótica. Entretanto, pode ser o responsável por inúmeras doenças quando se encontra excessivamente ativado. Baeuerle e Henkel, (1994) relatam que a regulação deste fator pode resultar no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias. A melatonina auxilia o sistema de defesas antioxidantes das células, devido a regulação gênica do Nrf2 e pela modulação do NF $\kappa$ B (Cuzzocrea e Reiter, 2002; Mauriz et al., 2013; Hill 1988; Papazisis et al., 1999; Petranka et al., 1999; Fariol et al., 2000).

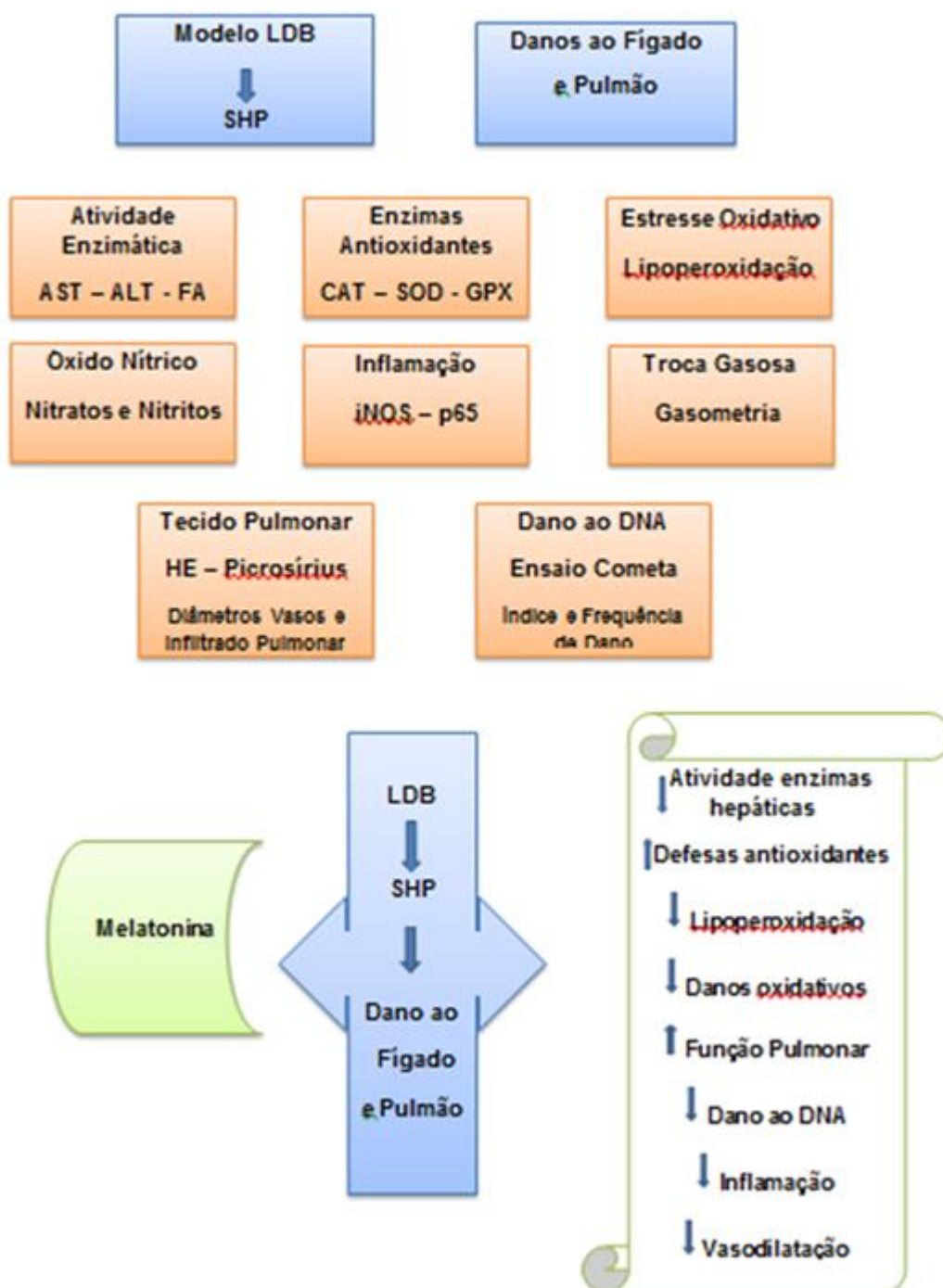
A melatonina atua como antiapoptótica em doenças inflamatórias hepáticas. Entretanto, estudos *“in vitro”*, comprovaram ações pró-apoptótica em células tumorais, controlando o crescimento tumoral (Martin-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2013, 2013a). Essa ação oposta acredita-se que esteja associado ao tipo de receptor em que ela se liga (M1, M2 e M3) (Sainz et al., 2003). Por ser capaz de atuar em inúmeros mecanismos e ser seletiva nas ações de regulação do estresse celular e oxidativo, torna a melatonina um interessante agente terapêutico no tratamento de doenças hepáticas.

Nesse contexto, esse trabalho buscou estudar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatório da melatonina sobre o pulmão de animais cirróticos por LDB e que desenvolveram SHP.

### 3. MARCO CONCEITUAL

A Síndrome Hepatopulmonar apresenta-se com uma tríade clínica que inclui alteração da função hepática, anormalidades nas trocas gasosas e presença de dilatações vasculares pulmonares, sendo atualmente um diagnóstico muito prevalente e incapacitante para os pacientes acometidos. O estresse oxidativo desempenha papel central na patogênese e na progressão de doenças crônicas, sendo o uso de antioxidantes uma alternativa terapêutica, com o objetivo de compensar os danos sistêmicos e hepáticos.

Dentre os antioxidantes utilizados, a MLT vem despertando grande interesse devido ao seu efeito antioxidante. A capacidade da MLT em atuar sobre os radicais livres deve-se à 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 (figura 13).



**Figura 13:** Marco conceitual, construído a partir da base teórica que sustenta o estudo.

#### 4. JUSTIFICATIVA

São cada vez maiores as prevalências e as incidências de doenças inflamatórias hepáticas com repercussões em outros sistemas, sendo elas motivo de preocupação para a saúde pública no País. Por outro lado, ainda se deve evoluir na elucidação do comprometimento dos diversos sistemas envolvidos na evolução da doença, como no sistema pulmonar, sendo da mesma forma fundamental a busca por novos tratamentos que previnam ou minimizem sequelas. O estudo das vias de sinalização inflamatória, do estresse celular, dano ao DNA, trocas gasosas e vasodilatação pulmonar durante a evolução da doença, torna-se fundamental para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos, buscando assim novos tratamentos terapêuticos.

A contribuição científica a ser alcançada por este projeto de pesquisa diz respeito ao avanço no conhecimento do comportamento da doença hepática, sua relação com o sistema respiratório e a utilização de um tratamento antioxidante (Melatonina) para minimizar os feitos deletérios da mesma.

Assim, faz-se necessário elucidar o envolvimento de outros sistemas participantes na Síndrome Hepatopulmonar (SHP), desenvolvendo novas propostas de tratamento. Quando utilizada em diferentes modelos experimentais, a Melatonina apresenta resultados positivos, mas não especificamente na SHP, portanto se pretende -por meio deste estudo- esclarecer os possíveis marcadores e mecanismos envolvidos no processo da doença, além de investigar as alterações no tecido pulmonar, e, posteriormente à utilização da melatonina, reconhecer os possíveis marcadores que possam prevenir e/ou retardar o desenvolvimento da doença.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações existentes no tecido hepático e pulmonar em animais com síndrome hepatopulmonar induzida por ligadura de ducto biliar, e o efeito antioxidante da Melatonina.

### 5.2 Objetivos Específicos

#### 5.2.1 Objetivos específicos do artigo I

- Realizar revisão da literatura sobre a Síndrome Hepatopulmonar, estresse oxidativo e exercício físico.

Respondidos no artigo I intitulado, "*Hepatopulmonary Syndrome: Oxidative Stress and Physical Exercise*".

Enviado para publicação no periódico *European Medical Journal*.

Tipo de Artigo: Artigo de Revisão.

#### 5.2.2 Objetivos específicos do artigo II

- Avaliar as alterações do tecido pulmonar através da técnica de Hematoxilina e Eosina e picrosírius.

- Avaliar o estresse oxidativo e o efeito antioxidante da MLT.

- Avaliar as trocas gasosas através da gasometria arterial.

- Verificar o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e a relação pesopulmonar/ peso corporal (%).

Respondidos no artigo II intitulado, "Efeitos da melatonina sobre o tecido pulmonar no modelo experimental de síndrome hepatopulmonar".

Enviado para o periódico *Jornal Brasileiro de Pneumologia*.

Tipo de Artigo: Artigo Original.



### 5.2.3 Objetivos específicos do artigo III

- Verificar a integridade hepática de ratos com SHP por meio da avaliação das enzimas séricas Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA) de ratos tratados e não tratados com Melatonina.

- Avaliar os gases sanguíneos por meio da gasometria arterial de ratos tratados e não tratados com Melatonina.

- Avaliar a lipoperoxidação dos tecidos pulmonar através da determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais tratados e não tratados com Melatonina.

- Quantificar a atividade enzimáticas antioxidante da SOD, CAT e GPX de animais tratados e não tratados.

- Analisar o diâmetro dos capilares pulmonares pela histologia por coloração com hematoxilina e eosina dos animais tratados e não tratados.

- Avaliar o fator de transcrição nuclear kappa B através da subunidade p65 no tecido pulmonar dos animais com SHP e que receberam melatonina.

- Avaliar a expressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), da p65 e da SOD no tecido pulmonar.

- Avaliar o índice e a frequência de dano ao DNA pelo ensaio cometa.

Respondidos no artigo III intitulado, "Efeitos da melatonina sobre o tecido hepático e pulmonar em animais com síndrome hepatopulmonar por ligadura do ducto biliar"

Enviado para publicação no periódico *Respiratory Physiology & Neurobiology*.

Tipo de Artigo: Artigo Original.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTI Ag *et al.* **Effects of propranolol on arterial oxygenation and oxygen transport to tissues in patients with cirrhosis.** Am Rev Respir Dis, 1990;142(2):306-10.

AGUSTI Ag. *et al.* **Pulmonary hemodynamics and gas exchange during exercise in liver cirrhosis.** Am Rev Respir Dis, 1989; 139(2):485-91.

AKCILAR R. *et al.* **Effects of Ukrain on intestinal apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury in rats.** Int J Clin Exp Med, 2015; 8:22158-66.

ALLEGRA M *et al.* **The chemistry of melatonin's interaction with reactive species.** J Pineal Res, 2003; 34:1-10.

ARGUEDAS MR *et al.* **Prospective evaluation of outcomes and predictors of mortality in patients with hepatopulmonary syndrome undergoing liver transplantation.** Hepatology, 2003; 37(1):192-7.

ASCENSÃO A, FERREIRA R, MAGALHÃES J. **Exercise-induced cardioprotection – biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria.** Int J Cardiol., 2007; 117:16-30.

BAEUERLE PA, HENKEL T. **Function and activation of NF-kappa B in the immune system.** Annu Rev Immunol, 1994; v. 12, p. 141-79.

BATALLER R, BRENNER DA. **Liver fibrosis.** J Clin Invest, 2005; Apr;115(4):1100.

BAKKAR N, GUTTRIDGE DC. **NF- B Signaling: A Tale of Two Pathways in Skeletal Myogenesis.** Physiol Rev, 2010; 90:495–511.

BARP J *et al.* **Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones.** Braz J Med Biol Res, 2002; 35:1075-81.

BERLETT BS, STADTMAN ER. **Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress.** J Biol Chem, 1997; 33:20313-6.

BERTHELOT P. *et al.* **Arterial changes in the lungs in cirrhosis of the liver-lung spider nevi.** N Engl J Med, 1966; 274: 291-98.

BLASK DE, DAUCHY RT, SAUER LA. **Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal.** Endocrine 2005, 27:179-88.

BLASK DE, SAUER LA, DAUCHY RT. **Melatonin as a chronobiotic/ anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadianbased cancer therapy.** Curr Top Med Chem, 2002; 2:113-32.

BONA S *et al.* **Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis.** ISRN Gastroenterol, 2012; 762-920.

BONA S. **Melatonina protege o fígado em um modelo experimental de cirrose.** 2014. 94 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

BONA S. **Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos.** 2010. 64 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Medicina: Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Rio Grande do Sul.

Bours V *et al.* **A novel mitogeninducible gene product related to p50-p105-NF-kB participates in transactivation through a kB site.** Mod. Cell. Biol, 1992; 12:685-95.

BOVERIS A, CHANCE B. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** Biochem J, v. 134, n. 3, p. 707-16, Jul 1973. ISSN 0264-6021.

BOVERIS A.; CHANCE B. **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** Biochem J. 1973; Jul;134(3):707-16.

BREDDT D. **Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology.** Free Rad Res, 1999 ; 31:577-96.

BRENNER C. *et al.* **Decoding cell death signals in liver inflammation.** J Hepatol, 2013; 59(3):583-94

BRZEZINSKI A. **Melatonin in humans.** N Engl J Med, 1997; 336:186–195.

CARBAJO-PESCADOR S. *et al.* **Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells.** Br J Cancer, 2013 Jul; v. 109, n. 1, p. 83-91.

CARBAJO-PESCADOR S. *et al.* **Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells.** Br J Cancer, 2013; 108:442-49.

CARBAJO-PESCADOR S. *et al.* **Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor.** J. Pineal Res, 2011; 51:463-71.

CARDEN DL, GRANGER DN. **Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.** J Pathol, 2000; Feb;190(3):255-66.

CHANCE B, SIES H, BOVERIES A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** Physiol Res, 1979; 59:527-605.

CHANG SW, OHARA N. **The lung in liver disease.** Clin Chest Med, 1996; 17: 1-17.

CHEESEMAN KH, SLATER TF. **An introduction to free radical biochemistry.** In: **Cheeseman K H, Slater T F, (eds). Free Radical in Medicine.** NewYork: Churchill Livingstone; 1993; 481-93.

CIPOLLA-NETO J, AFECHE SC. **Glândula Pineal.** In Aires, MM. *Fisiologia*, 3 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008; 981-990.

COELHO JCU. **Aparelho Digestivo – Clínica e Cirurgia.** Atheneu, 2012; 4a ed. Rio de Janeiro.

COLARES, Josieli. **Efeito da Melatonina sobre a Cirrose Biliar Secundária induzida pela Ligadura de Ducto Biliar.** Tese de Mestrado. Universidade Luterana do Brasil. 2016

COLARES JR. *et al.* **Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid.** *J Coloproctol*, 2016; 36(2):97-103.

CRUZ CAT. *et al.* **Alterações imunológicas na obstrução biliar extra-hepática.** In: Silva OC, Zucoloto S, Beer A. *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia.* São Paulo: Robe, 1998.

CUZZOCREA S, REITER R. **Pharmacological Actions of Melatonin in Acute and Chronic Inflammation.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* Feb; 2002; 2(2):153-65.

DA ROSA DP *et al.* **Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats.** *Arquivos de Gastroenterologia*, 2010, v. 47.

DAVIS KL *et al.* **Novel effects of nitric oxide.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:203-36.

DRÖGE W. **Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.** *Physiol Rev.* 2002; 82:47–95.

DUO XU1 *et al.* **Inhibition of autophagy ameliorates pulmonary microvascular dilation and PMVECs excessive proliferation in rat experimental hepatopulmonary syndrome.** *Scientific Reports* 6, article number 30833, 2016; DOI: 10.1038/sresp30833.

ESCAMES G *et al.* **Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence.** *J Pharm Pharmacol.* 2006; Sep; 58(9):1153-65.

FALLON MB *et al.* **The Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Pathogenesis of a Rat Model of Hepatopulmonary Syndrome.** *Gastroenterol* 1997; 113: 606-614.

FANG FC. **Perspective series, host/pathogen interactions. Mechanism of nitric oxide related antimicrobial activity.** *J Clin Invest.* 1997 Jun; 15;99(12):2818-25.

- FAUSTINI-PEREIRA *et al.* Exercise capacity of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *Annals of Hepatology*. 2015; 14: 361-368.
- FAVIER AE. *et al.* **Analysis of free radicals in biological systems**. Boston: Birkhäuser, 1995.
- FRIEDMAN SL, ARTHUR MJ. **Reversing hepatic fibrosis**. *Sci Med*. 2002; 8(4): 194-205.
- FRIEDMAN SL. **Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver**. *Physiol Rev*. 2008; 88(1):125-72
- GARCIA E. *et al.* **Síndrome Hepatopulmonar**. *J Pneumol* 1996; 22: 279-284
- GRANGER DN, KVIETYS PR. **Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept**. *Redox Biol*. 2015 Dec; 6:524-51.
- GRILO-BENSUSAN *et al.* **Hepatopulmonary syndrome: What we know and what we would like to know**. *World J . Gastroenterol* 2016 July 7; 22(25): 5728-5741.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th edn. NewYork: Oxford University Press Inc; 2007.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- HALLIWELL B. **Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?** *Lancet*.1994; 344(8924): 721-4.
- HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN SL. **Pathogenesis of liver fibrosis**. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:425-56.
- HERVÉ P *et al.* **Pulmonary vascular disorders in portal hypertension**. *Eur Respir J*. 1998; 11(5):1153-66.
- HILL SM, BLASK DE. **Effects of the pineal hormone melatonina on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture**. *Cancer Res*. 1988; 48:6121–6126.
- JI LL. **Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise**. *Soc Exper Biol Med*. 1999; 222:283-291.
- JUNG-HYNES B, REITER RJ, AHMAD NJ. **Sirtuins, melatonina and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer**. *J Pineal Res*, 2010; 48:9–19.
- KLAUNIG JE, KAMENDULIS LM, HOCEVAR BA. **Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis**. *Toxicol Pathol*,2010 jan; v. 38, n. 1, p. 96-109.

- KNOWLES RG, MONCADA S. **Nitric oxide synthases in mammals.** Biochem J. 1994 Mar 1; 298 ( Pt 2):249-58.
- KOCH, DG, FALLON, MB. **Hepatopulmonary Syndrome.** Clin Liver Dis 18 2014; 407–20.
- KOLIOS G, VALATAS V, WARD SG. **Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle.** Immunology. 2004 Dec; 113(4):427-37.
- KONTOURAS J, BILLING BH, SCHEVER PJ. **Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat.** Br. J. Exp. Pat. 1984; 65, 305-11.
- KOOY NW, ROYALL JA, ISCHIROPOULOS H. **Oxidation of 2',7'-Dichlorofluorescein by peroxynitrite.** Free Rad Res Comm 1997; 27(3):245-54.
- KOSTOGLOU-ATHANASSIOU, I. **Therapeutic applications of melatonin.** Ther Adv Endocrinol Metab. 2013; 4(1):13–24.
- KOUL A, BHATIA V, BANSAL MP. **Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice.** BMC Biochem 2001; v. 2, p. 14.
- KRIEGLSTEIN CF *et al.* **Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide.** J Exp Med. 2001 Nov 5;194(9):1207-18.
- Kretzmann, N *et al.* **Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis,** Inflamm. Bowel Dis. 2008; 14:1504–13.
- KROWKA MJ *et al.* **Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: a report of the multicenter liver transplant database.** Liver Transpl. 2004; 10(2):174-82.
- KROWKA MJ, CORTESE DA. **Hepatopulmonary syndrome. Current concepts in diagnostic and therapeutic considerations.** Chest. 1994; 105(5):1528-37.
- KROWKA MJ. **Hepatopulmonary syndrome: what are we learning from interventional radiology, liver transplantation, and other disorders?** Gastroenterology. 1995; 109(3):1009-13.
- KUDOH K *et al.* **Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice.** Ann Surg 2014, 260:118-27.
- LISSONI P, *et al.* **Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia?** Eur J Cancer 1996; 32A:1340–43.
- LISSONI P, *et al.* **Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients.** Neuroendocrinol Lett. 2001; 22:45–47.

LISSONI P, *et al.* **Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent.** J Biol Regul Homeost Agents . 1997; 11:157–59.

LISSONI P. **Is there a role for melatonin in supportive care?** Support Care Cancer. 2002; 10:110–16.

LIU KX *et al.* **Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide.** World J Gastroenterol. 2007 Jan 14; 13(2):299-305.

LUO B, ABRAMS GA, FALLON MB. **Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction.** J Hepatol 1998, 29: 571-78.

MAURIZ JL *et al.* **A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions:** recent insights and new perspectives. J Pineal Res, 2012 May.

MARTÍN-RENEDO J, *et al.* **Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line.** J. Pineal Res. 2008; 45:532–40.

MAURIZ J, *et al.* **Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism.** Transl. Res. 2007;149:46–53.

MAURIZ J, *et al.* **Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock,** Shock. 2003; 19:33–37.

MILLS E, *et al.* **Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis.** J. Pineal Res. 2005; 39:360–66.

MILTERSTEINER A, *et al.* **Uso da quercetina a longo prazo em ratos cirróticos.** Acta cirúrgica brasileira 2003; 18: 232-37.

MOLPECERES V, *et al.* **Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis.** J Gerontol Bio Sci. 2007; 62:687-95.

MOREIRA A, *et al.* **Oxidative Stress and Cell Damage in a Model of Precancerous Lesions and Advanced Hepatocellular Carcinoma in Rats.** Toxicology Reports. 2015; 2:333-40.

MOREIRA A, *et al.* **Quercetin prevents oxidative stress and NF-κB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats.** Biochemical Pharmacology. 2004; 68:1939–46.

NOVO E, *et al.* **Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis.** Arch Biochem Biophys. 2014; 548:20-37.

OTALORA BB, *et al.* **Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice.** J Pineal Res. 2008; 44:307-15.

PAPAZISIS KT, *et al.* **Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines.** J Pineal Res. 1999; 25:211-18.

PAVANATO MA, *et al.* **Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride- induced cirrhosis.** Digest dis and sci 2003; 48: 824-829.

PERDOMO J, *et al.* **Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells.** J Pineal Res. 2013; 55(2):195-206.

PERES W. **Radicales Libres y Ciroosis Biliar Secundaria: Efecto Protector de Los Flavonoides Quercitina e Rutina.** [Tese de Doutorado]. León: Universidad de León; 1999.

PETRANKA J, *et al.* **The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line.** J Pineal Res. 1999; 26:129-36.

RABILLER, A *et al.* **Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome.** Am J. Respir Gut Care Med. 2002; 166, 517-7.

REID MB. **Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction.** Med Sci Sports Exerc. 2001; 33(3):371-6.

REITER RJ *et al.* **Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology.** Hum Reprod Update, Oct 2013.

REITER R J. **Mechanisms of cancer inhibition by melatonin.** J Pineal Res, 2004; 37:213–14.

REITER RJ, TAN DX. **Melatonin: an antioxidant in edible plants.** Ann N Y Acad Sci, 2002; 957:341-44.

REITER R *et al.* **Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species.** Cell Biochemistry and Biophysics, 2001; 34, 237-256.

REITER R *et al.* **Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans.** Acta Bioch Polonica, 2003; 50(4): 1129-46.

REITER R *et al.* **Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions.** Acta Bioch Polonica, 2007; 54(1): 1-9.

ROBERTS BW, MITCHELL J, KILGANNON JH, CHANSKY ME, TRZECIAK S. **Nitric oxide donor agents for the treatment of ischemia/reperfusion injury in human subjects: a systematic review.** Shock. 2013; 39(3):229-39.



ROCKEY D. **Vascular mediators in the injured liver.** Hepatology, 2003; v 37, n1, p 4-12.

RODRIGUEZ-ROISIN R, KROWKA M. **Hepatopulmonary syndrome-a liver induced lung vascular disorder.** N Engl J Med, 2008; v 358, n22, p 2378-87.

RODRÍGUEZ-ROISIN R *et al.* **ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonar-hepatic vascular disorders (PHD).** Eur Respir J. 2004; 24(5):861-80.

SAINZ RM *et al.*, **Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and Cancer Cells.** Cell Mol Life SCI. 2003; 60 (7): 1407-26.

SCHIFF ER, SORREL MF, MADDREY WC (Editors), **Schiff's diseases of the liver.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003; 9th ed.

SCHINONI MI. **Fisiologia hepática.** Gazeta Médica da Bahia. 2008; 76(2).

SHERLOCK S. **Chronic hepatitis and cirrhosis.** Hepatology (S.I). 1984; 4(1): 25-8.

SHIU SY *et al.* **Melatonin slowed the early biochemical progression of hormone-refractory prostate câncer in a patient whose prostate tumor tissue expressed MT1 receptor subtype.** J Pineal Res, 2003; 35:177-82.

SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K. **Structure, regulation and fuction of NF-κB.** Annu. Ver. Cell. Biol, 1994; 10:405-55.

SILVA JÚNIOR OC, MAZZETTO SA, SOUZA MEJ, PICINATO MANC, SANKARANKUTTY AK. **Obstrução Biliar Extra Hepática.** In: Silva OC, Zucoloto S, Beer A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. São Paulo: Robe, 1998.

SNOWDON VK, FALLOWFIELD JA. **Models and mechanisms of fibrosis resolution.** Alcohol Clin Exp Res. 2011; 35(5):794-9.

SOUFLI I, TOUMI R, RAFA H, TOUIL-BOUKOFFA C. **Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases.** World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2016 Aug 6; 7(3):353-60.

SUN Y, GAO Q, WU N, LI SD, YAO JX, FAN WJ. **Protective effects of dexmedetomidine on intestinal ischemia-reperfusion injury.** Exp Ther Med. 2015 Aug; 10(2):647-652.

SWANSON KL, WIESNER RH, KROWKA MJ. **Natural history of hepatopulmonary syndrome: impact of liver transplantation.** Hepatology. 2005; 41(5):1122-9.

TABRUYN SP, GRIFFIOEN AW. **NF-κB: a new player in angiostatic therapy, Angiogenesis,** 2008; 11:101-106.

- TAILLÉ C, CADRANEL J, BELLOCQ A, THABUT G, SOUBRANE O, DURAND F, et al. **Liver transplantation for hepatopulmonary syndrome: a ten-year experience in Paris, France.** *Transplantation*. 2003; 75(9):1482-9.
- TAKIZAWA Y, KITAZATO T, ISHIZAKA H, KAMIYA N, TOMITA M, HAYASHI M. **Effect of aminoguanidine on ischemia/reperfusion injury in rat small intestine.** *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(11):1737-43.
- THANNICKAL VL, FANBURG BL. **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am. Journal Physiol*. *Lung Cell Mol Physiol*, 2000; 279, L:1005-L:1028.
- THANOS D, MANIATIS T. **NFkB: a lesson in family values.** *Cell*, 1995; 80: 529-32.
- TIEPPO J et al. **Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats.** *J Nutr*, 2009 Jul; v. 139, n. 7, p. 1339-46.
- TRAVACIO M, LLESUY S. **Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions.** *Journal of the Brazilian*, 1996; 48:9-3.
- TRIPATHI D, JENA G. **Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat.** *J. Pineal Res*, 2010; 48:324–331.
- TRIVIÑO T, ABIB SCV. **Anatomia cirúrgica do fígado<sup>1</sup>.** *Acta Cir Bras*. 2003;18(5).
- VALKO M *et al.* **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84.
- VAN DEN BERG *et al.* **Nuclear factor-kB activation is higher in peripheral blood mononuclear cells of male smokers.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001; 9:147-51.
- VENUGOPAL R, JAISWAL A. **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. USA*, 1996; 93:14960-1496.
- VERCELINO R *et al.* **N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative Stress Parameters in Cirrhotic Rats with Hepatopulmonary Syndrome.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 102(4): 370-6.
- VILLANUEVA C, GIULIVI C. **Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease.** *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(3):307-16.
- VRIEND J, REITER R. **The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome.** *Molecular and Cell Endocrinology*, 2015; 401:213-220.
- WANG X *et al.* **Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress.** *Cell Death Differ*, 2006; 13:2099-2108.

WEST JB, WAGNER PD. **Pulmonary gas exchange. In: West JB, editor. Bioengineering aspects of the lung.** New York: Marcel Dekker; 1977; p. 361-4.

WOLIN MS. **Interactions of oxidants with vascular signaling systems.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun; 20(6):1430-42.

ZIMMERMAN HJ. **DRUG – Induced Liver Disease. In: Schiff's Diseases of the Liver. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC.** Lippincott-Raver Publishers, Philadelphia N.Y.; 1999.

## 7. ARTIGOS DA TESE

### 7.1 Artigo I

Convite para publicar um artigo de revisão sobre o tema relacionado com a tese, pois fui uma das autoras do artigo intitulado: “Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation”, publicado na World J Gastroenterol 2016 October 28; 22(40): 8853-9038, e que está como anexo 1 desta tese.

Dear Dr Adriane Dal Bosco,

I hope that you are well.

I would like to introduce myself; I am an Editorial Assistant at the European Medical Journal, an independent, open-access journal, covering a host of therapeutic areas.

After looking at your paper “**Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation**” we have the pleasure of inviting you to write a paper on the topic of “Cirrhosis” for the European Medical Journal. We understand that the topic area is broad; the reason for this is that we would like to give you the freedom to choose a subtopic within this area that you are particularly interested in writing about.

As one of the leading specialists within this area, we would be delighted if you would write a short review article of no more than 2,000-3,000 words, excluding abstract and references. Please note that publication of a paper is based on a successful peer review outcome as well as the Editorial Board and Editor’s discretion.

Upon publication of the article we will send you a certificate of achievement. This will provide evidence of your contribution to our publication, and as such can be used in any personal appraisals that you undertake.

If you would be interested in submitting a paper or you have any questions, please do not hesitate to contact me. I have also provided a link to our EMJ website, which I hope will be of interest to you; <http://www.emjreviews.com/>.

Kind regards,

Priska Uusitalo | Editorial Assistant

European Medical Journal - ‘The go to place for healthcare professionals’

TEL: +44 (0) 1245 334450

Head Office: The MedBIC, Anglia Ruskin University, Alan Cherry Drive, Chelmsford, Essex, CM1 1SQ

Sales Office: Coppergate House, 16 Brune Street, London, E1 7NJ

[www.emjreviews.com](http://www.emjreviews.com)

[www.gorelynewmedia.com](http://www.gorelynewmedia.com)

**Name of Journal:** European Medical Journal

**Manuscript Type:** review article

**Hepatopulmonary Syndrome: Oxidative Stress and Physical Exercise**

**Adriane Dal Bosco.** Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [adriane.bosco@metodistadosul.edu.br](mailto:adriane.bosco@metodistadosul.edu.br)

**Filipe Boeira Schedler.** Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [fbschedler@gmail.com](mailto:fbschedler@gmail.com)

**Josieli Raskopf Colares.** Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [jozy.ma@hotmail.com](mailto:jozy.ma@hotmail.com)

**Alexandre Simões Dias.** Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Chief of Physiotherapy Service, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [asdias@hcpa.edu.br](mailto:asdias@hcpa.edu.br)

**Norma Possa Marroni.** Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. [nmarroni@terra.com.br](mailto:nmarroni@terra.com.br)

**Author contributions:** Dal Bosco A and Schedler FB performed the research and wrote the manuscript; Colares JR, Dias AS and Marroni NP contributed to the critical revision of the manuscript for important intellectual content.

**Conflict-of-interest statement:** No conflict of interest.

**Correspondence to:** Colares JR, MD, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, 90035-903, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. jozy.ma@hotmail.com

**Telephone:** +55-51-997516065

**Abstract**

Hepatopulmonary syndrome (HPS) may be defined by the following: 1- hepatic disease; 2- gas exchange abnormalities, which may lead to hypoxemia; and 3- the presence of pulmonary vascular dilations. The balance between the many substances involved in vasodilation and vasoconstriction occurs in the liver; thus, liver damage may generate systemic changes throughout the body. The pulmonary tissue may be damaged because of Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitric Oxide (NO). Dyspnoea is the most frequent pulmonary symptom, which may become worse when an individual exercises. In experimental research, the surgical model of Bile Duct Ligation (BDL) comprises the optimal model to simulate the typical lung alterations present in Hepatopulmonary Syndrome, which increases oxidative stress in the hepatic and pulmonary tissues. In liver injury, the muscular system may also be damaged. Sarcopenia may seriously aggravate cirrhosis and is associated with cirrhotic patient mortality. Muscular changes may be explained by the actions of Myostatin and Insulin-like Growth Factor (IGF-1) and the increase in body levels of ammonia (NH<sub>3</sub>). As a result of impaired cardiopulmonary and muscular conditions, HPS patients may exhibit a low exercise tolerance, low muscle strength and low functionality. Studies that have investigated physical exercise as a therapy for cirrhosis suggest that this approach may be beneficial for cirrhotic patients primarily with regards to muscular and cardiorespiratory injuries.

**Key words:** Hepatopulmonary syndrome; Oxidative stress; Physical Exercise; Cirrhosis; Bile Duct Ligation; Sarcopenia

## INTRODUCTION

Hepatopulmonary Syndrome (HPS) may be defined by the following: 1- hepatic disease; 2- gas exchange abnormalities, which may lead to hypoxemia; and 3- the presence of pulmonary vascular dilations<sup>[1]</sup>. The pathophysiology of the hypoxemia in HPS is multifactorial and involves intrapulmonary shunting, a low ventilation-perfusion ratio (V/Q), low diffusion and an unbalanced alveolar-arterial oxygen gradient (AaDO<sub>2</sub>). The prevalence of HPS in cirrhotic patients is approximately 10 to 20% and contributes to an increased morbidity and mortality of these individuals<sup>[1, 2]</sup>.

Hypoxemic events are common in patients with HPS, and these alterations may be caused by intrapulmonary vascular dilations associated with hepatic disease. Lung capillary dilation is a typical vascular alteration of HPS; it may be localised and is less frequently present in the pleural and arteriovenous lung communications<sup>[3]</sup>. The hypoxemia in these situations may be explained by the unbalance of the V/Q ratio, the presence of intrapulmonary shunts and the decrease in the diffusion caused by intrapulmonary vasodilation<sup>[4,5]</sup>.

Vascular disorganisation results in the appearance of new alveolar units. These units have preserved ventilation; however, the presence of an arteriovenous shunt and intrapulmonary vasodilation compromises the maintenance of proper levels of arterial oxygen. The presence of biomolecular mediators produced by the liver, such as nitric oxide (NO), which is a powerful biological vasodilator derived from the endothelium, may comprise the main factor that causes pulmonary vasodilation. The decrease in the flow of oxygen to the blood capillaries does not occur because of the thickening of the alveoli-capillary membrane; it occurs because of poor vascular dilation, which is associated with increased cardiac output, a common alteration of cirrhotic patients with hyperdynamic circulation<sup>[6-8]</sup>.

## DIAGNOSIS, CLASSIFICATION AND SYMPTOMS

The main features present in HPS patients are dyspnoea and platypnea (increase in dyspnoea when changing from lying to standing), which may be associated with fatigue, as well as the clinical findings of peripheral cyanosis and digital clubbing. Dyspnoea is considered the more frequent pulmonary symptom, which may be worse when the patient exercises<sup>[6]</sup>. The diagnosis is made when the alveolar-arterial oxygen gradient (AaDO<sub>2</sub>) is



greater than 20 mmHg or when there is hypoxemia, which is defined by a Partial Pressure of Oxygen ( $\text{PaO}_2$ ) less than 70 mmHg. Intravascular lung dilations may be present, which facilitate confirmation of the diagnosis made by Echocardiogram [8].

According to Krowka and Cortese<sup>[9]</sup>, HPS may be classified into two subtypes based on the  $\text{PaO}_2$  and angiograph findings. HPS type I is defined by the presence of precapillary diffuse dilations that respond well to oxygen therapy. HPS type II is characterised by small vasodilatation and arteriovenous malformation. In contrast, Rodriguez-Roisin and collaborators [1] suggest a staging classification of HPS into four groups based on the gas exchange abnormalities, which are considered mild when the  $\text{PaO}_2$  is greater than 80 mmHg, moderate when the  $\text{PaO}_2$  is between 60 and 80 mmHg, severe when the  $\text{PaO}_2$  is between 50 and 60 mmHg and very severe when it is less than 50 mmHg.

#### HEPATIC DISEASE AND OXIDATIVE STRESS

The liver is critical in regulating the balance between vasoconstrictor and vasodilator substances, and hepatic tissue injury makes it difficult, which leads to many abnormalities. Liver damage makes it more difficult for the organ to filtrate blood from the portal vein, which leads to the appearance of portosystemic shunts and a decrease in the hepatic phagocytic capacity. Thus, the lung filtrates systemic blood to compensate for the decrease in hepatic phagocytosis [10], and the increase in the lung phagocytic activity results in macrophage accumulation in the pulmonary endothelium and increases the cytokine levels and NO in the extracellular environment. NO acts as a molecular signal that mediates the vasodilation of pulmonary capillaries when it is produced in low concentrations by vascular endothelial cells. NO has a toxic oxidant action when it is produced in high concentrations by lung macrophages. Phagocytes may also produce the superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ), which oxidises the plasmatic membrane and produces a substantial amount of Reactive Oxygen Species (ROS) [11].

ROS and Reactive Nitrogen Species (RNS) are products of physiological cellular metabolism and have double rules, in which they are noxious or beneficial to an organism. Many physiological functions are controlled by these molecules, including vascular tonus regulation, the defence against invading microorganisms and harmful cells, and the monitoring of oxygen pressure in ventilation control and molecular levels [12]. An unbalance

in this system may lead to tissue damage and may result in chronic-degenerative diseases [13].

Tieppo et al.<sup>[14]</sup> assessed the lipoperoxidation of pulmonary tissue following the experimental model of Common Bile Duct Ligation (CBDL); using the techniques of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Chemiluminescence, the authors identified a significant increase in the lipid peroxidation, which may be explained by the potential action of phagocytic cells when fighting against the process of bacterial translocation. The migration of macrophages to the lungs leads to the production of  $O_2^-$  and increases the antioxidant enzyme activity. Tieppo and collaborators <sup>[14]</sup> identified a significant increase in the enzyme Superoxide Dismutase (SOD) in the pulmonary tissue of the cirrhotic group, which suggests increased enzyme activity as a result of the aggression induced by ROS. The researchers concluded that the experimental model of CBDL simulates the main symptoms of HPS, which suggests it is a good model to investigate oxidative stress, hepatic changes and the respiratory system.

#### HPS AND EXPERIMENTAL MODELS

The experimental models more commonly utilised to investigate the abnormalities caused by HPS are the Bile Duct Ligation (BDL) and Partial Portal Vein Ligation (PPVL) models in rats. In both models, ON develops an important role regarding the pathogenesis of the experimental HPS, which causes vascular dilation and leads to hypoxemia, similar to the findings of cirrhotic patients.

Experimental studies that utilised the surgical model of Bile Duct Ligation have indicated an increased oxidative stress of hepatic and pulmonary tissues, as well as other lung alterations typical of HPS <sup>[14]</sup>. Long-term bile duct obstruction causes secondary biliary cirrhosis, which leads to acute inflammatory reactions that cause systemic changes <sup>[15]</sup>. Chang and O'Hara<sup>[16]</sup> demonstrated that animals that had undergone a LDB surgery presented progressive worsening of the gas exchange, which is similar to the changes that occur in humans with HPS. The researchers determined that the cirrhotic animals had an  $AaDO_2$  greater than 100 mmHg, which was associated with moderate hypoxemia (values less than 85 mmHg). These findings may be associated with intrapulmonary vasodilation

caused by high levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) present in pulmonary tissues [17].

Tieppo and collaborators [14] identified a decrease in the PaO<sub>2</sub> and Peripheral Oxygen Saturation in Haemoglobin (SatO<sub>2</sub>/Hb) and a significant increase in the Partial Pressure of Carbon Dioxide in the arterial blood (PaCO<sub>2</sub>) in cirrhotic animals compared with the control group. The same researchers also identified a significant difference in the AaDO<sub>2</sub> between the BDL and sham groups, which is consistent with the findings of Luo, Abrams and Fallon [18], in which animals developed a progressive hyperventilation and hypoxemia in association with the increase in the AaDO<sub>2</sub>.

Vercelino and collaborators [19] suggest the experimental model of Bile Duct Ligation (BDL) as the model that best simulates the alterations present in Hepatopulmonary Syndrome. The researchers investigated the gas exchange abnormalities of different experimental models of hepatic cirrhosis, and the BDL model exhibited more changes in the gas exchange values. An increase in the partial pressure of carbon dioxide in the arterial blood (PaCO<sub>2</sub>) was identified in the BDL group compared with the control group, as well as alterations in the PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub> and AaDO<sub>2</sub>. Table 1 was modified from the study of Vercelino and collaborators [19] and indicates the gas exchange values from different experimental models of cirrhosis. In addition to the gas exchange abnormalities, the BDL group also exhibited a larger intrapulmonary vasodilation evidenced by histological analysis. Therefore, the BDL is a method to efficiently simulate the vascular alterations and gas exchange abnormalities identified in HPS.

Berthelot and collaborators [20] identified an increase in the diameter of the lung arterioles of animals that had undergone BDL surgery, in which the ratio between the pulmonary and body weights (pulmonary weight/body weight) increased in the cirrhotic group compared with the control group. These alterations are likely caused by pulmonary shunts and intrapulmonary vascular dilations, as a result of intrapulmonary capillary congestion. The intrapulmonary vasodilation in these cases may be associated with bacterial translocation, which occurs as a result of the absence or decrease of bile in the small intestine. This bile deficit decreases the emulsifier and anti-endotoxic effect of the bile salts, which leads to an increase in the endotoxin levels in the large intestine, which are carried by the portal circulation to the pulmonary system [21].

## MUSCULOSKELETAL ALTERATIONS IN HPS

The striated muscle is a complex tissue that is versatile and heterogeneous and that is composed of specialised multinucleate cells: muscle fibres. These cells have a myonucleus placed in the periphery of the fibre immediately below the plasmatic membrane. Contractile units that are morphologically repeated, which are referred to as sarcomeres, comprise the muscle fibres. Each sarcomere is composed of many proteins, including the contractile proteins of Myosin (a thick filament formed by the polymerisation of 200 to 300 molecules of class II Myosin) and Actin (a thin filament associated with the regulator proteins of Troponin and Tropomyosin) [1].

Similar to other chronic diseases, the muscular system is one of the most damaged systems in hepatic injuries and determines the patient's limitations regarding physical exercise. Striated muscle composes 45% of the body weight, and it is critical in the preservation of bioenergetics homeostasis once it is the main place of processing and storage of energy, as well as the final destination of the primary support systems involved in exercising, such as the cardiovascular and respiratory systems [1]. Sarcopenia, or muscle loss, is the most common muscle abnormality of liver diseases, and a limited number of studies have investigated the mechanisms involved in this process [22]. Sarcopenia in cirrhosis may aggravate the clinical condition of patients because it decreases functionality and contributes to a worse disease prognosis as an independent factor that increases the mortality of the cirrhotic population [23]. Malnutrition in cirrhotic patients is also associated with a worse disease prognosis because when it is combined with low food intake and high metabolic activity, it may lead to cachexia, which damages the muscular system [24].

Sarcopenia is the result of a reduction in protein synthesis and an increase in muscular protein lysis, as well as the proliferation and uncontrolled differentiation of satellite cells of the muscular system [25]. Muscular tissue alterations depend on molecular factors, such as Myostatin and Insulin-like Growth Factor (IGF-1), which are the main regulators of the muscle skeletal growth process [26]. Myostatin and IGF-1 also participate in protein synthesis regulation and an increase in proteolysis, with high levels of Myostatin identified in cirrhotic patients with end stage liver disease [26, 27].

Many other molecular mediators also contribute to sarcopenia in cirrhotic patients, with an excess of serum Ammonia levels as one of the main factors involved in this process [28]. Once the liver is the main organ responsible for controlling ammonia levels in the body, the presence of hepatic dysfunction results in increased serum ammonia levels [28]. Hyperammonemia results in a process referred to as nitration, which damages protein cell functioning when the serum ammonia levels are increased [28]. In an attempt to degrade the damaged proteins of the muscle-skeletal tissue, a process of cellular autophagy may be initiated. However, the autophagy process may not work properly in specific diseases [28] and is associated with tissue damage in hepatic cirrhosis.

In contrast to sarcopenia, cachexia is defined as a concomitant loss of muscle and fat tissues [22]. Cachexia may be associated with malnutrition, which is intensified by the high resting energy demand and is not supplied because of an inadequate absorption of nutrients in cirrhotic patients [24]. Furthermore, the physiological state of hypermetabolism in association with bacterial translocation episodes activates the production of pro-inflammatory cytokines in cirrhotic patients, which leads to protein catabolism and decreases nutrient absorption [24].

Figure 1, modified from Darathy [22] and Córdoba and Mínguez [29], shows the increase in the serum ammonia levels ( $\text{NH}_3$ ) as a result of hepatocellular damage. Ammonia may damage astrocytes when it crosses the blood-brain barrier (BBB), thereby damaging mitochondria and the transport and metabolism of Glutamate (GLU) and Glutamine (GLN). The presence of ammonia in the systemic circulation may also damage the muscular tissue, thereby interfering in protein synthesis and causing sarcopenia. Physical Exercise and the use of Myostatin antagonists appear to be potential therapeutic approaches to revert sarcopenia, as well as Leucine supplementation, once there is a low amount of available amino acids in the body in patients with hepatic dysfunction.

## PHYSICAL EXERCISE AND LIVER DISEASE

Gas exchange abnormalities are associated with cirrhosis and are evident in HPS patients, which thus influence their exercise tolerance. HPS patients may exhibit a low Maximal Oxygen Consumption ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), worse results in the Six-Minute Walk Test and

lower respiratory muscular strength compared with cirrhotic patients who do not have an HPS diagnosis [30]. Furthermore, cirrhotic patients who have an increased AaDO<sub>2</sub> have earlier ventilatory thresholds and worse gas exchange during maximal efforts [31].

The muscular and respiratory weakness of cirrhotic patients negatively affects their exercise tolerance and functionality. Andersen and collaborators [32] have stated that patients with alcoholic cirrhosis have decreased lower and upper limb strength compared with healthy subjects. Tarter and collaborators [33] have also demonstrated that cirrhotic patients have lower strength capacities of the lower and upper limbs when both concentric and eccentric contractions were assessed. Moreover, the decrease in peripheral muscle strength may affect the respiratory muscle strength. Kaltsakas and collaborators [34] and Abdel-bary and collaborators [35] identified a negative correlation between the respiratory muscle strength and dyspnoea in cirrhotic patients. Galant and collaborators [36] identified a correlation between the VO<sub>2max</sub> and respiratory strength and a decrease in the quality of life, which suggests an interaction between physiological factors and decreased functionality in cirrhotic patients.

Different studies that investigated physical exercise as a therapeutic approach for cirrhosis suggest that these patients may benefit from exercise [37-39]. Patients with Child-Pugh A and B underwent an 8-week aerobic exercise program on a cycle ergometer, which indicated an increase in the quadriceps mass via ultrasound analysis and VO<sub>2max</sub> improvement [37]. Another study, which included cirrhotic patients from a waiting list for liver transplantation, demonstrated improvements in the VO<sub>2max</sub>, knee extensor maximal strength and six-minute walk distance following a 12-week program of aerobic and strength exercises [38]. Furthermore, cirrhotic patients with a Model For End-Stage Liver Disease (MELD) less than 25 improved their six-minute walk distance and Step Test values, as well as muscle mass following a 12-week moderate exercise program on a treadmill and bicycle, which was associated with Leucine supplementation [39].

## CONCLUSION

Physiological alterations present in HPS patients are similar to the alterations present in experimental models of BDL. The clinical features of intrapulmonary vasodilation and gas exchange abnormalities are better understood when investigated in combination with

the antioxidant system, inflammatory processes associated with bacterial translocation, and the presence of portosystemic and intrapulmonary shunts. HPS and other diseases that affect the hepatic system may contribute to the development of sarcopenia and cachexia because of hyperammonemia, malnutrition, hypermetabolism and proteolysis. Physical exercise is a potential therapeutic approach to revert existing impairments in the musculoskeletal and pulmonary systems and is an option for the treatment of HPS patients and other individuals with hepatic injury.

## REFERENCES

- 1 Rodríguez-Roisin R, et al. ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonar-hepatic vascular disorders (PHD). *Eur Respir J*. 2004; 24 (5): 861-80.
- 2 Garcia E, et al. Hepatopulmonary Syndrome. *J Pneumol*. 1996; 22: 279-84.
- 3 Koch DG, Fallon MB. Hepatopulmonary Syndrome. *Clin Liver Dis*. 2014; 18: 407-20.
- 4 Cuadrado A, et al. Heptopulmonary syndrome. *Gastroenterol Hepatol*. 2015; 38 (6): 398-408.
- 5 Grace JA, Angus PW. Hepatopulmonary syndrome: update on recent advances in pathophysiology, investigation, and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013; 28 (2): 213-9.
- 6 Agusti AG, et al. Effects of propranolol on arterial oxygenation and oxygen transport to tissues in patients with cirrhosis. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142 (2): 306-10.
- 7 Hervé P, et al. Pulmonary vascular disorders in portal hypertension. *Eur Respir J*. 1998; 11 (5): 1153-66.
- 8 Krowka MJ, et al. Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: a report of the multicenter liver transplant database. *Liver Transpl*. 2004; 10 (2): 174-82.
- 9 Krowka MJ, Cortese DA. Hepatopulmonary syndrome. Current concepts in diagnostic and therapeutic considerations. *Chest*. 1994; 105 (5): 1528-37.
- 10 Rabiller A, et al. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166: 514-7.
- 11 Thannickal VJ, Fanburg, BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279: 1005-28.
- 12 Ascensão A, et al. Exercise-induced cardioprotection – biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *In J Cardiol*. 2007; 117: 16-30.
- 13 Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007; 12: 287-95.
- 14 Tieppo J, et al. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol*. 2005; 42 (4): 244-8.
- 15 Silva Júnior OC, et al. Obstrução Biliar Extra Hepática. In: Silva OC, Zucoloto S, Beer A. *Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia*. São Paulo: Robe, 1998.
- 16 Chang SW, Ohara N. Pulmonary intravascular phagocytosis in liver disease. *Clin Chest Med*. 1996; 17 (1): 137-50.



- 17 Fallon MB, et al. The Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Pathogenesis of a Rat Model of Hepatopulmonary Syndrome. *Gastroenterol.* 1997; 113: 606-14.
- 18 Luo B, et al. Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: correlation with pulmonary dysfunction. *J Hepatol.* 1998; 29: 571-8.
- 19 Vercelesino R, et al. Modelos experimentais para avaliação das alterações pulmonares na síndrome hepatopulmonar. *J Bras Pneumol.* 2008; 34: 453-60.
- 20 Berthelot P, et al. Arterial changes in the lungs in cirrhosis of the liver-lung spider nevi. *N Engl J Med.* 1966; 274: 291-8.
- 21 Cruz CAT, et al. Alterações imunológicas na obstrução biliar extra-hepática. In: Silva OC, Zucoloto S, Beer A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. São Paulo: Robe, 1998.
- 22 Dasarathy S. Consilience in sarcopenia of cirrhosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012, 3: 225-37.
- 23 Montano-Loza AJ, et al. Muscle wasting is associated with mortality in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012; 10: 166-73.
- 24 Plauth M, Schütz ET. Cachexia in liver cirrhosis. *Int J Cardiol.* 2002; 85: 83-7.
- 25 Dasarathy S, et al. Sarcopenia associated with portosystemic shunting is reversed by follistatin. *J Hepatol.* 2011; 54: 915-21.
- 26 Periyalwar P, Dasarathy S. Malnutrition in cirrhosis: contribution and consequences of sarcopenia on metabolic and clinical responses. *Clin Liver Dis.* 2012; 16: 95-131.
- 27 García PS, et al. Brief-reports: Elevated myostatin levels in patients with liver disease: a potential contributor to skeletal muscle wasting. *Anesth Analg.* 2010; 111: 707-9.
- 28 Qiu J, et al. Hyperammonemia-mediated autophagy in skeletal muscle contributes to sarcopenia of cirrhosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 303: 983-93.
- 29 Córdoba J, Mínguez B. Hepatic Encephalopathy. *Semin Liver Dis.* 2008; 28: 70-80.
- 30 Faustini-Pereira JL, et al. Exercise capacity of cirrhotic patients with hepatopulmonary syndrome. *Ann Hepatol.* 2015; 14: 361-8.
- 31 Lemyze M, et al. Cardiopulmonary response to exercise in patients with liver cirrhosis and impaired pulmonary gas exchange. *Respir Med.* 2011; 105: 1550-6.
- 32 Andersen H, et al. Decreased muscle strength in patients with alcoholic liver cirrhosis in relation to nutritional status, alcohol abstinence, liver function, and neuropathy. *Hepatol.* 1998; 27: 1200-6.
- 33 Tarter RE, et al. Isokinetic muscle strength and its association with neuropsychological capacity in cirrhotic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 191-6.
- 34 Kaltsakas G, et al. Dyspnea and respiratory muscle strength in end-stage liver disease. *World J Hepatol.* 2013; 5: 56-63.

- 35 Abdel-bary SA, et al. Respiratory muscle strength, hypoxemia and dyspnea in liver cirrhosis patients. *Egypt J Chest Dis Tuberc.* 2014; 63: 1059-64.
- 36 Galant LH, et al. The aerobic capacity and muscle strength are correlated in candidates for liver transplantation. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48: 86-8.
- 37 Zenith L, et al. Eight weeks of exercise training increases aerobic capacity and muscle mass and reduces fatigue in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014; 12: 1920-6.
- 38 Debette-Gratien M, et al. Personalized Adapted Physical Activity Before Liver Transplantation: Acceptability and Results. *Transplantation.* 2015; 99: 145-50.
- 39 Román E, et al. Randomized pilot study: effects of an exercise programme and leucine supplementation in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2014; 59: 1966-75.

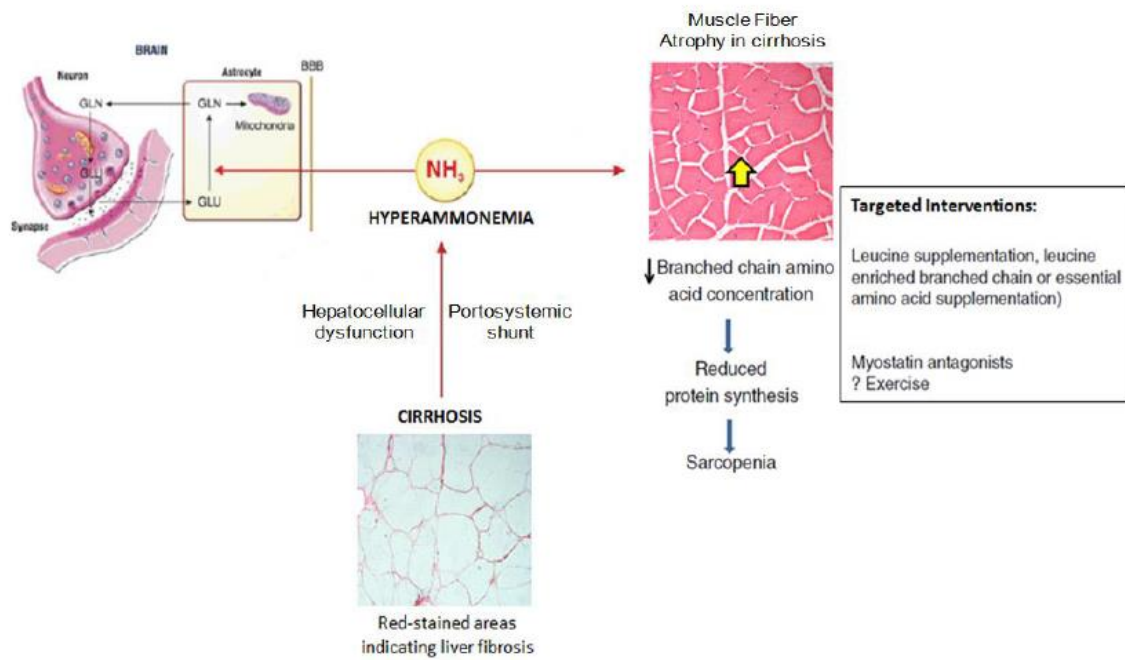


Figure 1 Alterations caused by ammonia in cirrhosis and its targeted interventions.

**Table 1 Serum enzyme levels, blood gases and alveolar-arterial oxygen gradient in the control and experimental groups of the four experimental models of cirrhosis.<sup>a</sup>**

Variable	IN CCl <sub>4</sub>		IP CCl <sub>4</sub>		PPVL		BDL	
	Co	Ex	Co	Ex	Co	Ex	Co	Ex
AST (IU/L)	191.3 ± 45.6	717.0 ± 207.6	132.5 ± 19.6	1715.0 ± 689.2*	133.7 ± 22.3	108.5 ± 19.4	105.2 ± 21.5	500.5 ± 45.1**
ALT (IU/L)	124.8 ± 46.4	759.6 ± 232.2*	86.7 ± 7.3	1399.5 ± 459.5*	79.7 ± 9.1	84.5 ± 16.9	78.7 ± 18.8	162.7 ± 17.7*
ALP (IU/L)	86.8 ± 8.7	196.4 ± 25.2**	88.2 ± 11.7	220.7 ± 60.9	116.0 ± 20.5	127.8 ± 29.7	160.0 ± 20.4	373.2 ± 45.4**
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	85.3 ± 0.8	63.8 ± 3.8**	107.0 ± 4.0	97.8 ± 7.4	69.7 ± 0.9	64.3 ± 5.2	85.2 ± 4.0	49.9 ± 11.3*
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	48.7 ± 2.9	54.7 ± 2.9	49.0 ± 5.0	46.5 ± 4.0	54.3 ± 1.7	56.3 ± 5.0	9.8 ± 3.3	64.0 ± 5.1*
SaO <sub>2</sub> (%)	95.3 ± 0.3	78.8 ± 9.3*	96.0 ± 1.3	96.2 ± 0.7	92.0 ± 0.0	86.0 ± 2.9	95.0 ± 0.7	73.3 ± 12.1*
AaDO <sub>2</sub> (mmHg)	23.1 ± 12.8	56.3 ± 2.8	12.9 ± 4.3	22.7 ± 5.8	12.1 ± 2.9	15.0 ± 3.9	30.4 ± 3.5	62.6 ± 10.5**

<sup>a</sup>The results expressed as the means ± standard errors of the means. IN CCl<sub>4</sub>: inhaled carbon tetrachloride; IP CCl<sub>4</sub>: intraperitoneal carbon tetrachloride; PPVL: partial portal vein ligation; BDL: bile duct ligation; Co: control; Ex: experimental; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; PaO<sub>2</sub>: arterial oxygen tension; PaCO<sub>2</sub>: arterial carbon dioxide tension; SaO<sub>2</sub>: arterial oxygen saturation; and AaDO<sub>2</sub>: alveolar-arterial oxygen gradient. \*p < 0.05 vs. the corresponding control group. \*\*p < 0.001 vs. the corresponding control group.

## 7.2 Artigo II

### ARTIGO II

Artigo que compõe a tese intitulado "EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O TECIDO PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR", enviado para publicação no Jornal Pneumologia, onde serei a primeira autora.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Resumo

**Objetivos:** avaliar as alterações pulmonares de animais com Síndrome Hepatopulmonar (SHP), submetidos à ligadura de ducto biliar (LDB), bem como o efeito antioxidante da Melatonina (MEL). **Métodos:** Quinze ratos machos da espécie Wistar, divididos em quatro grupos Sham, Grupo LDB, Grupo Sham + MEL e LDB + MEL. Foram avaliadas a histologia pulmonar e hepática, a lipoperoxidação e atividade antioxidante do tecido pulmonar, diferença alveolo-arterial de  $O_2$  e relação peso pulmonar/peso corporal (%). **Resultados:** Quando comparados os grupos observamos um aumento da vasodilatação e fibrose pulmonar no grupo LDB e a redução deste em relação ao grupo LDB+MEL. Observamos ainda alterações significativas na atividade da catalase,  $PaCO_2$ ,  $PaO_2$  no grupo LDB quando comparado aos demais grupos. **Conclusão:** A utilização da MEL demonstrou-se eficaz na redução da vasodilatação, níveis de fibrose e estresse oxidativo assim como na troca gasosa em modelo experimental de SHP.

**Palavras-chave:** Ducto Biliar; Síndrome Hepatopulmonar; Melatonina; Pulmão.

**Abstract**

**Objectives:** To evaluate the pulmonary alterations of animals with Hepatopulmonary Syndrome (SHP) submitted to biliary duct ligation (LDB), as well as the antioxidant effect of Melatonin (MEL). **Methods:** Fifteen male Wistar rats, divided into four Sham groups, LDB Group, Sham + MEL group and LDB + MEL. Pulmonary and hepatic histology, lipoperoxidation and antioxidant activity of lung tissue, alveolar-arterial O<sub>2</sub> difference and lung / body weight ratio (%) were evaluated. **Results:** When comparing the groups, we observed an increase of vasodilation and pulmonary fibrosis in the LDB group and the reduction of this in relation to the LDB + MEL group. We also observed significant changes in the activity of catalase, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub> in the LDB group when compared to the other groups. **Conclusion:** The use of MEL has been shown to be effective in reducing vasodilation, fibrosis levels and oxidative stress as well as gas exchange in an experimental SHP model.

**Keywords:** Bile Duct; Hepatopulmonary Syndrome; Melatonin; Lung.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Introdução

A cirrose se caracteriza pela presença de nódulos fibróticos no fígado que surgem como resultado da lesão hepática crônica<sup>1</sup>. Tais alterações podem levar à hipertensão portal e à doença hepática terminal, gerando alterações no sistema vascular e afetando diferentes órgãos<sup>2</sup>. No sistema respiratório a Síndrome Hepatopulmonar (SHP) e a Hipertensão Portopulmonar são as duas principais condições clínicas que afetam os pulmões<sup>2</sup>. A Síndrome Hepatopulmonar é a disordem vascular mais comum encontrada em pacientes com cirrose, que é responsável pela vasodilatação pulmonar, circulação hiperdinâmica e alterações nas trocas gasosas<sup>2,3</sup>.

Anormalidades nas trocas gasosas apresentadas por pacientes com SHP estão associadas com a presença de *shunts* arterio-venosos, discrepâncias na ventilação-perfusão e na difusão-perfusão<sup>2</sup>. Tais alterações presentes na SHP são em sua maioria explicadas pelos processos de angiogênese e vasodilatação intrapulmonar<sup>2</sup>, e diferentes modelos animais são utilizados para simular a cirrose hepática, sendo o modelo de Ligadura de Ducto Biliar (LDB) o que melhor simula as alterações presentes na síndrome<sup>4</sup>.

O modelo de LDB é capaz de causar alterações gasométricas similares às encontradas em pacientes com SHP<sup>2</sup>. O processo de angiogênese também está presente no modelo de LDB, sendo tal alteração presente devido à ação do Fator de Crescimento Vascular Endotelial-A (VEGF-A), o qual é produzido por monócitos pulmonares intravasculares<sup>5,6</sup>. A vasodilatação pulmonar no modelo experimental de LDB está associada ao aumento na produção de Endotelina-1 (ET-1) e Óxido Nítrico Sintetase Endotelial (eNOS)<sup>6</sup>.

Estudos recentes investigando o potencial terapêutico da Melatonina (MEL) sugerem que seu poder antioxidante pode ser utilizado no tratamento da SHP, pois



1 apresenta efeito anti-inflamatório<sup>7</sup>, e reduz níveis de VEGF em células de carcinoma  
2 hepático, contribuindo na redução da angiogênese<sup>8</sup>. A Melatonina também apresenta  
3 efeitos terapêuticos em modelos animais de hepatite fulminante e hipertensão pulmonar,  
4 onde reduz o estresse oxidativo e previne a redução da atividade de enzimas  
5 antioxidantes<sup>9,10,11</sup>. No tecido pulmonar, a Melatonina exerce efeito protetor em  
6 modelos animais de cirrose induzida por tetracloreto de carbono<sup>12</sup>.

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15 Devido à existência de um modelo experimental que simule a SHP e ao  
16 potencial efeito terapêutico da Melatonina nessa síndrome, este estudo tem como  
17 objetivo avaliar as alterações pulmonares de animais submetidos à Ligadura de Ducto  
18 Biliar, bem como o efeito antioxidante da Melatonina.  
19  
20  
21  
22  
23

#### 24 Métodos

25  
26 Neste estudo foram utilizados 15 ratos Wistar machos, pesando 250g em média.  
27 Os animais foram obtidos pelo Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e  
28 foram alojados em caixas plásticas (47 x 34 x 18cm) cobertas por maravalha, as quais  
29 eram armazenadas em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 25°C. Os  
30 animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12/12h, com livre  
31 disponibilidade para água e comida. O projeto de pesquisa recebeu aprovação prévia da  
32 Comissão de Ética de Uso de Animais da ULBRA (CEUA-ULBRA), estando todos os  
33 procedimentos de pesquisa de acordo com as regras estabelecidas pela Lei Nº 11.794,  
34 de 11 de outubro de 2008, e pela Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e  
35 Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA).  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 O procedimento de Ligadura de Ducto Biliar Comum (LDBC) foi utilizado para  
53 o desenvolvimento da SHP, de acordo com o preconizado por Kontouras<sup>13</sup>. Previamente  
54 a todos os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam uma dose anestésica de  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 Xilazina 2% (50mg/kg de peso corporal) e Ketamina (100mg/kg de peso corporal),  
2 ambos injetados na região intraperitoneal. O período para o desenvolvimento do  
3 modelo foi de 14 dias, seguidos de outros 14 dias para o tratamento com melatonina. O  
4 período total de experimento foi de 28 dias, sendo que no momento da realização da  
5 eutanásia, os animais receberam uma dose três vezes maior àquela usada para o  
6 procedimento cirúrgico.  
7

8 Utilizou-se no estudo quatro grupos: Grupo *Sham*: Realizado procedimento  
9 cirúrgico de LDBC simulado, ocorrendo a manipulação do ducto biliar e/ o animal  
10 anestesiado e os animais também receberam injeção intraperitoneal de NaCl (0,9%) a  
11 partir do 15º dia após cirurgia, durante 14 dias. Grupo *Sham*+Melatonina (*Sham*+MEL):  
12 o procedimento cirúrgico de LDBC foi simulado, e a administração de Melatonina  
13 (20mg/kg) ocorreu via injeção intraperitoneal durante 14 dias, iniciando no 15º dia após  
14 a cirurgia. Grupo Ligadura de Ducto Biliar (LDB): Os animais foram submetidos à  
15 LDBC e à aplicação de NaCl (0,9%) via intraperitoneal por 14 dias, iniciando no 15º dia  
16 após a cirurgia. Grupo Ligadura de Ducto Biliar + Melatonina (LDB+MEL): os animais  
17 foram submetidos à LDBC e receberam Melatonina (20mg/kg) via injeção  
18 intraperitoneal por 14 dias, iniciando no 15º dia após a cirurgia.  
19

20 Os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do  
21 Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde as demais análises e procedimentos  
22 foram realizadas no Laboratório de Hepatologia Experimental do Hospital de Clínicas  
23 de Porto Alegre (HCPA).  
24

25 Depois de 28 dias após a cirurgia os animais foram pesados e anestesiadas e o  
26 sangue foi coletado através da Técnica de Coleta Sanguínea Retro-orbital<sup>14</sup>, com o  
27 objetivo de analisar os níveis das enzimas hepáticas. Posteriormente, uma laparotomia  
28 antero-medial foi realizada para a coleta de sangue da aorta abdominal para a análise  
29 gasométrica, sendo utilizado um Radiômetro ABL 700 (*Copenhagen, Denmark*) para a  
30

1 mensuração dos gases sanguíneos. O método da iontoforese foi utilizado para a  
2 mensuração da Pressão Parcial de Oxigênio Arterial (PaO<sub>2</sub>), Pressão Parcial de Gás  
3 Carbônico Arterial (PaCO<sub>2</sub>) e Saturação Arterial de Oxigênio (SaO<sub>2</sub>). A Pressão  
4 Alveolar de Oxigênio (PAO<sub>2</sub>) foi calculada pela seguinte fórmula: PAO<sub>2</sub>=Fração  
5 Inspirada de O<sub>2</sub>(FiO<sub>2</sub>)-PaCO<sub>2</sub>/0.8<sup>15</sup>. A Diferença Alvéolo-Arterial de Oxigênio (D(A-  
6 a)O<sub>2</sub>) foi calculada pela fórmula: D(A-a)O<sub>2</sub> = PAO<sub>2</sub>- PaO<sub>2</sub> (15).

7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15 Após a eutanásia o pulmão foi pesado para posterior análise da relação Peso  
16 Pulmonar/ Peso Corporal. Uma porção do fígado e do lobo pulmonar inferior direito foi  
17 removida para a realização da análise histológica, sendo o restante do tecido pulmonar  
18 introduzido em Nitrogênio líquido e armazenado a uma temperatura de -80°C para  
19 posterior análises. Amostras pulmonares e hepáticas coletadas para a análise histológica  
20 foram inseridas em solução de Formaldeído 10% por 12 horas, sendo posteriormente  
21 inseridas em recipientes de Álcool 70% e coloridas com a coloração de Hematoxilina e  
22 Eosina (HE), amostras pulmonares também receberam a coloração de picrossirius. As  
23 análises histológicas foram realizadas de maneira duplo-cega por patologistas  
24 específicos do Laboratório de Patologia do HCPA.

25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37 O tecido pulmonar congelado foi homogeneizado por um homogeneizador Ultra-  
38 Turraz (*IKA Labortechnik, Staufen, Germany*) em tampão fosfato (KCl 140mM, Fosfato  
39 20 nM, pH 7.4). A lipoperoxidação foi mensurada pela técnica das substâncias que  
40 reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)<sup>16</sup>. As atividades das enzimas Catalase (CAT)  
41 e Glutathione-*s*-transferase (GST) foram medidas através do Espectrofotômetro<sup>17,18</sup>.

42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 Médias e Desvios Padrões (DP) foram calculados. Os dados foram analisados  
por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* de Tukey. Os  
valores foram considerados significativamente diferentes quando p<0.05. Foi usado o  
software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) versão  
21.0.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Resultados

A análise da atividade das enzimas hepáticas sanguíneas e da histologia hepática confirmaram o diagnóstico de Cirrose. Na Figura 1 pode ser observado pela a análise histológica pulmonar que os animais do grupo LDB apresentaram vasos de diâmetros aumentados em relação aos demais grupos. Uma vez que os achados em cada grupo são muito similares, será apresentado apenas um exemplo histológico de cada grupo experimental.

Na Tabela I podem ser observados o resultados referentes às alterações nas trocas gasosas através da Gasometria Arterial, com valores referentes à  $PaO_2$ ,  $PaCO_2$ ,  $SO_2$ ,  $PAO_2$  e  $D(A-a)O_2$  sendo comparados entre os quatro grupos experimentais. Diferenças significativas foram encontradas para a  $PaCO_2$  e  $PAO_2$ , sendo os valores referentes ao grupo LDB significativamente aumentados e diminuídos, respectivamente, em relação aos demais grupos ( $p<0.05$ ). A Tabela 2 também mostra um aumento significativo ( $p<0,01$ ) da Relação peso pulmonar/peso corporal no grupo LDB em relação aos outros grupos experimentais.

A vasodilatação intrapulmonar associada às alterações gasométricas confirmam o modelo experimental de SHP. A diminuição da vasodilatação intrapulmonar, da  $PaCO_2$  e da Relação peso pulmonar/peso corporal no grupo LDB+MEL, bem como o aumento da  $PAO_2$  em relação ao LDB, sugerem um efeito protetor da MEL no tecido pulmonar frente à SHP.

A Tabela I demonstra resultados referentes ao processo de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes, caracterizados pelos valores do TBARS, CAT e GST. Os valores aumentados do TBARS no grupo LDB em relação aos outros grupos ( $p<0.01$ ) indicam um aumento da lipoperoxidação neste grupo experimental. A atividade da CAT foi significativamente menor no grupo LDB ( $p<0.01$ ), enquanto a

1  
2 atividade da GST no grupo LDB esteve significativamente aumentada em relação aos  
3 outros grupos. O grupo LDB+MEL apresentou resultados menores para os valores de  
4 TBARS em relação ao grupo LDB, indicando um efeito antioxidante da MEL.  
5  
6

7  
8 Na Figura 2 um aumento da fibrose pulmonar, marcada pela coloração vermelha,  
9 foi encontrado no grupo LDB em relação aos outros grupos. Tal processo foi revertido  
10 com o uso da Melatonina, com a fibrose pulmonar se mostrando diminuída do grupo  
11 LDB+MEL em relação ao grupo LDB.  
12  
13  
14  
15  
16

### 17 18 19 20 Discussão

21  
22 O aumento no diâmetro dos vasos pulmonares, evidenciada pela análise  
23 histológica por HE, em associação com as alterações gasométricas, confirma no  
24 presente estudo a indução da SHP através da cirurgia de LDB. A diminuição do  
25 diâmetro dos vasos pulmonares no grupo LDB+MEL em relação ao grupo LDB, sugere  
26 efeitos terapêuticos da Melatonina no processo de adaptação vascular.  
27  
28  
29

30 De acordo com nossos resultados a  $\text{PaCO}_2$  aumentou no grupo LDB em relação  
31 aos demais grupos, enquanto a  $\text{PAO}_2$  diminuiu no mesmo grupo. Vercelino e  
32 colaboradores<sup>4</sup> também encontraram um aumento da  $\text{PCO}_2$  no grupo LDB quando  
33 comparado ao grupo controle, bem como alterações adicionais no grupo LDB, com  
34 alterações nos valores de  $\text{PaO}_2$ ,  $\text{SaO}_2$  e  $\text{D(A-a)O}_2$ . Diversos estudos associam as  
35 alterações gasométricas presentes na SHP com a ação de Óxido Nítrico (ON) no tecido  
36 pulmonar<sup>19,20</sup>. Tieppo e colaboradores<sup>21</sup> constataram que a ação antioxidante da  
37 Quercetina é capaz de reverter as alterações gasométricas no modelo experimental de  
38 SHP, sugerindo que o antioxidante é capaz de regular os níveis de ON na síndrome.  
39 Nossos resultados demonstram que a Melatonina melhora as alterações gasométricas no  
40 modelo de LDB, bem como reverte a vasodilatação intrapulmonar, sugerindo que a  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 Melatonina desempenha um papel semelhante ao da Quercetina na regulação dos  
2  
3 níveis de ON na SHP.  
4

5 Vercelino e colaboradores<sup>4</sup> também encontraram um aumento da  
6 lipoperoxidação e atividade antioxidante da enzima SOD no tecido pulmonar no grupo  
7 LDB, bem como um aumento da relação peso pulmonar/peso corporal em animais  
8 submetidos a cirurgia de LDB, estando de acordo com nossos resultados. Maarman e  
9 colaboradores<sup>11</sup> encontraram um aumento do peso pulmonar e uma diminuição do peso  
10 corpóreo no modelo experimental de Hipertensão Pulmonar, o qual foi revertido pelo  
11 uso da Melatonina. De maneira similar, em nosso estudo a Melatonina foi capaz de  
12 diminuir a relação peso pulmonar/peso corporal.  
13  
14

15 Encontramos um aumento da lipoperoxidação no grupo LDB e consequente  
16 reversão após administrar Melatonina. Uma diminuição na atividade da CAT e um  
17 aumento na atividade da GST foram encontrados no grupo LDB, as quais foram  
18 revertidas pelo uso da Melatonina. O aumento do estresse oxidativo no organismo e  
19 consequente lipoperoxidação, se deve ao desbalanço entre a presença de radicais livres e  
20 agentes antioxidantes<sup>22</sup>. Embora seja encontrado na literatura resultados diversos sobre  
21 a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GST, nossos resultados demonstram  
22 diminuição na lipoperoxidação e melhora no sistema antioxidante após o uso da  
23 Melatonina.  
24  
25

26 Diversos estudos associam o uso da Melatonina com a diminuição da  
27 lipoperoxidação, no entanto, a atividade das enzimas antioxidantes frente ao uso da  
28 Melatonina apresentam resultados diversos<sup>11,12,13,14</sup>. Maarman e colaboradores<sup>11</sup>  
29 encontraram uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT e da  
30 lipoperoxidação no plasma de animais com Hipertensão Pulmonar tratados com  
31 Melatonina. Taslidere e colaboradores<sup>12</sup> associam o uso da Melatonina à diminuição da  
32 lipoperoxidação e ao aumento da atividade das enzimas CAT e Glutathione (GSH) no  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1 tecido pulmonar de ratos após cirrose induzida por Tetracloreto de Carbono (CCl<sub>4</sub>).  
2  
3  
4 Borges e colaboradores<sup>23</sup> demonstram que o uso da Melatonina diminui a  
5 lipoperoxidação muscular gerada pelo exercício vigoroso, bem como aumenta a  
6 atividade da SOD, mas não existem alterações significativas na atividade da CAT e da  
7  
8 Glutathione Peroxidase (GPx). De maneira similar, Da Rosa e colaboradores<sup>24</sup>  
9 demonstraram que a Melatonina diminui a lipoperoxidação e aumenta a atividade da  
10 SOD no fígado de animais submetidos ao modelo experimental de Apneia do Sono.  
11  
12  
13  
14  
15  
16

17 Nossos resultados obtidos através da análise histológica por picrossirius sugerem  
18 que a Melatonina foi capaz de reduzir o acúmulo de colágeno pulmonar (Figura 2).  
19  
20 Maarman e colaboradores<sup>11</sup> encontram uma diminuição do colágeno no tecido cardíaco  
21 após o uso da Melatonina no modelo de Hipertensão Pulmonar, e Da Rosa e  
22 colaboradores<sup>25</sup> constataram uma redução do colágeno hepático após o uso da  
23 Melatonina no modelo experimental de cirrose por CCl<sub>4</sub>.  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 A ação antioxidante da Melatonina no tecido hepático e pulmonar está associada  
31 com a reversão das principais alterações na SHP. Este efeito terapêutico da Melatonina  
32 pode ocorrer por uma melhora direta da atividade antioxidante no pulmão, ou  
33 simplesmente pela melhora da condição hepática, revertendo as alterações sistêmicas na  
34 doença. O exercício físico também exerce diminuição do estresse oxidativo e aumento  
35 da atividade antioxidante de maneira sistêmica. Visto que a cirrose e SHP afetam  
36 diferentes órgãos, intervenções terapêuticas que atuem sobre os diferentes sistemas  
37 corporais são potencialmente mais indicadas para o manejo da patologia. Portanto, o  
38 uso da Melatonina e a prática do exercício físico, associadas às intervenções tradicionais  
39 e medicamentosas já bem estabelecidas, podem futuramente auxiliar os pacientes  
40 acometidos pela doença.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 A ação antioxidante da MEL no tecido pulmonar se mostrou eficaz na redução  
56 da vasodilatação, fibrose, estresse oxidativo, assim como na melhora da relação peso  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

pulmonar/peso corporal,  $PCO_2$  e  $PAO_2$  no modelo experimental de SHP. Tais achados sugerem um efeito antioxidante da MEL frente aos danos pulmonares da SHP, sendo eficaz na redução das alterações gasométricas e estruturais ocasionadas pela síndrome.

For Review Only



## Referências

1. Schuppan D, & Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet*, 2008; *371*(9615): 838-851.
2. Zhang J, & Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome: update on pathogenesis and clinical features. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 2012; *9*(9): 539-549.
3. Grace JA, & Angus PW. Hepatopulmonary syndrome: update on recent advances in pathophysiology, investigation, and treatment. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2013; *28*(2):213-219.
4. Vercelino R, Tieppo J, Junior LAF, Dias AS, Marroni CA, Marroni NP. Modelos experimentais para avaliação das alterações pulmonares na síndrome hepatopulmonar. *J Bras Pneumol*, 2008; *34*(7): 453-460.
5. Zhang J, Luo B, Tang L, Wang Y, Stockard CR, Kadish I, Fallon MB. Pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*, 2009; *136*(3): 1070-1080.
6. Yang W, Zhang J, Hu B, Wu W, Venter J, Alpini G, Fallon MB. The role of receptor tyrosine kinase activation in cholangiocytes and pulmonary vascular endothelium in experimental hepatopulmonary syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014; *306*(1): G72-G80.
7. 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. *Journal of pineal research*, 2013; *54*(1): 1-14.
8. Carbajo-Pescador S, Ordoñez R, Benet M, Jover R, Garcia-Palomo A, Mauriz JL, González-Gallego J. Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *British journal of cancer*, 2013; *109*(1): 83-91.

9. Crespo I, Miguel BS, Laliena A, Álvarez 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. *Journal of pineal research*, 2010; *49*(2): 193-200.

10. Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, González-Gallego J. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of pineal research*, 2013; *55*(3): 221-228.

11. Maaman G, Blackhurst D, Thienemann F, Blauwet L, Butrous G, Davies N, Lecour S. Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. *Journal of pineal research*, 2015; *59*(3): 343-353.

12. Taslidere E, Esrefoglu M, Elbe H, Cetin A, Ates B. Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental lung research*, 2014; *40*: 59-65.

13. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Path.*, 1984; *65*: 305-311.

14. Halpern BN, Pacaud A. Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus. *Comptes rendus des seances de La Societe de biologie et de ses filiales*, 1951; *145*(19-20): 1465-1466.

15. Ribeiro-Silva A, Silva GAD. Trocas gasosas intrapulmonares sob respiração em ar ambiente em pacientes hipercapneicos. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1992; *50*(1): 32-36.

16. Buege JA, Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 1978; *52*: 302-310.

- 1  
2 17. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown  
3 of hydrogen peroxide by catalase. *J BiolChe.* 1952; 195:133-140.
- 4  
5 18. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. The first enzymatic step in mercapturic acid  
6 formation. *J BiolChem*, 1974; 249: 7130-7139.
- 7  
8 19. Rolla G, Brussino L, Colagrande P, Dutto L, Polizzi S, Scappaticci E, Bergerone  
9 S, Morello M, Marzano A. Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in  
10 hepatic cirrhosis. *Hepatology*, 1997; 26: 842-7.
- 11  
12 20. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi, KA, Zerbib E,  
13 Dulmet E, Moreau R. Role of nitric oxide in hepatopulmonary syndrome in cirrhotic  
14 rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 164: 879-85.
- 15  
16 21. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tuñón MJ, Marroni NP, González-Gallego J.  
17 Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *The*  
18 *Journal of nutrition*, 2009; 139(7): 1339-1346.
- 19  
20 22. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the Oxidative Stress in  
21 *Inflammation: Role of Melatonin*. *International journal of molecular sciences*, 2015;  
22 16(8): 16981-17004.
- 23  
24 23. Borges LDS, Dermargos A, Junior EPDS, Weimann E, Lambertucci RH,  
25 Hatanaka E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced  
26 by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *Journal of pineal*  
27 *research*, 2015; 58(2): 166-172.
- 28  
29 24. Da Rosa DP, Forgiarini LF, e Silva MB, Fiori CZ, Andrade CF, Martinez D,  
30 Marroni NP. Antioxidants inhibit the inflammatory and apoptotic processes in an  
31 intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Inflammation Research*, 2015; 64(1): 21-29.
- 32  
33 25. Da Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP.  
34 Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic  
35 rats. *Arquivos de gastroenterologia*, 2010; 47(1): 72-78.
- 36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Tabela 1-** Gases sanguíneos, gradiente alvéolo-arterial de oxigênio e a relação peso pulmonar/peso corporal nos quatro grupos experimentais.<sup>a</sup>

Variável	Sham	Sham+MEL	LDB	LDB+MEL
PaO <sub>2</sub>	67±11.3	66.3±12.4	57.2±6.2	71±5.4
PaCO <sub>2</sub>	45±1.4	48±5.2	56.6±1.5*	48.2±4.5
SaO <sub>2</sub>	91±4.2	88.3±6.4	84.8±6.2	92.5±2.6
PAO <sub>2</sub>	93.4±1.7	89.7±6.6	78.9±1.9*	89.4±5.7
D (A-a)O <sub>2</sub>	26.4±13	23.4±5.9	21.7±5.7	18.4±11
Relação pesopulmonar/ peso corporal (%)	0,32±0,09	0,34±0,05	0,57±0,05**	0,37±0,02

LDB: ligadura de ducto biliar; Sham+MEL: Sham e melatonina; LDB+MEL: ligadura de ducto biliar e melatonina. PaO<sub>2</sub>: pressão parcial arterial de oxigênio; PaCO<sub>2</sub>: pressão parcial arterial de gás carbônico; SaO<sub>2</sub>: saturação arterial de oxigênio; PAO<sub>2</sub>: pressão parcial alveolar de oxigênio; e D (A-a)O<sub>2</sub>: gradiente alvéolo-arterial de oxigênio. <sup>a</sup>Resultados expressos como média + desvio padrão. \*p < 0,05 vs. grupo Sham, Sham+MEL, LDB+MEL. \*\*p < 0,01 vs. grupo Sham, Sham+MEL, LDB+MEL.

**Tabela 2-** Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína), atividade antioxidante da enzima catalase (pmol/min/mg prot.) e glutationa-s-transferase (nmol/min/mg prot.)<sup>a</sup>

Variável	Sham	Sham+MEL	LDB	LDB+MEL
TBARS (nmol/mg proteína)	0.38±0.09	0.37±0.15	0.83±0.13**	0.5±0.08
CAT (pmol/min/mg proteína)	8.32±1.27	9.09±1.01	5.17±0.72**	8.52±1.14
GST (nmol/min/mg proteína)	2.54±1.05	2.08±1.09	7.78±1.22**	3.95±1.99

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico); CAT: catalase; GST (glutathione-S-transferase). LDB: ligadura de ductobiliar; Sham+MEL: Sham e melatonina; LDB+MEL: ligadura de ducto biliar e melatonina. <sup>a</sup>Resultados expressos como média + desvio padrão. \*\*p < 0.01 vs. grupo Sham, Sham+MEL, LDB+MEL.

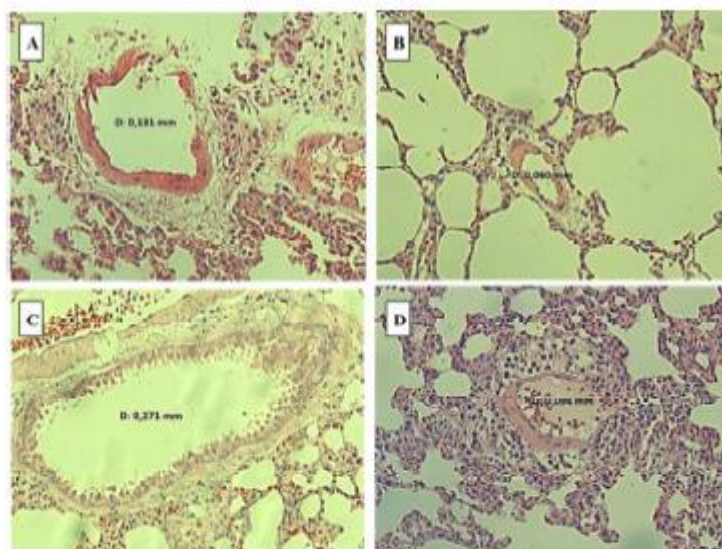


Figura 1- Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 100x. A-Grupo Sham; B-Grupo Sham e Melatonina; C-Grupo Ligadura de Ducto Biliar; D- Grupo Ligadura de Ducto Biliar e Melatonina.

254x190mm (72 x 72 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

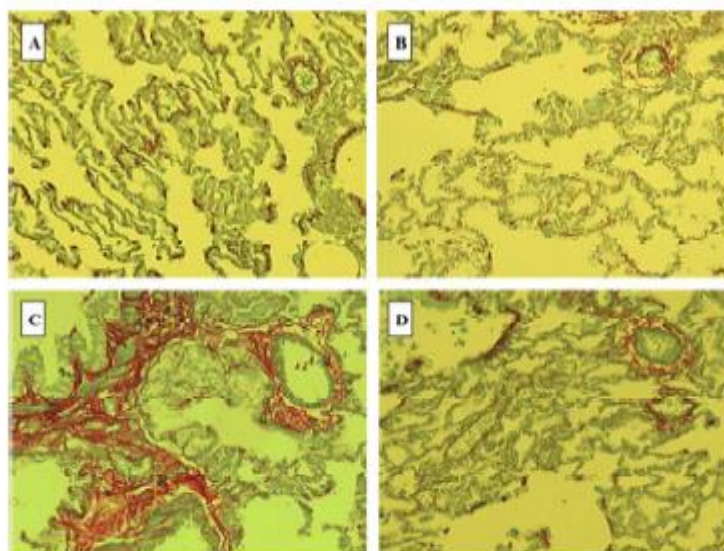


Figura 2- Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar coradas por picrosirius, aumento de 100X. A-Grupo Sham; B-Grupo Sham e Melatonina; C-Grupo Ligadura de Ducto Biliar; D- Grupo Ligadura de Ducto Biliar e Melatonina.

254x190mm (72 x 72 DPI)

### 7.3 Artigo III

#### ARTIGO III

Artigo que compõe a tese intitulado "EFFECTS OF MELATONIN ON LIVER AND LUNG TISSUES OF ANIMALS WITH BILE DUCT LIGATION-INDUCED HEPATOPULMONARY SYNDROME", enviado para publicação no periódico *DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES*, onde serei a primeira autora.



**EFFECTS OF MELATONIN ON LIVER AND LUNG TISSUES OF ANIMALS  
WITH BILE DUCT LIGATION-INDUCED HEPATOPULMONARY SYNDROME**

ADRIANE DAL BOSCO<sup>1,2,7</sup>, JOSIELI RASKOPF COLARES<sup>1,2</sup>, SÍLVIA BONA<sup>1,2</sup>, LÍVIA BARBOZA DE ANDRADE<sup>5</sup>, ALEXANDRE SIMÕES DIAS<sup>1,5,6</sup>, NORMA POSSA MARRONI<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> *Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-RS, Brasil.*

<sup>2</sup> *Postgraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

<sup>3</sup> *Posgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

<sup>4</sup> *Posgraduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas- RS, Brazil*

<sup>5</sup> *Posgraduate Program in Pneumological Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

<sup>6</sup> *Posgraduate Program in Human Movement Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, Brazil.*

<sup>7</sup> *Centro Universitário Metodista, IPA*

*Short title:* Use of melatonin in hepatopulmonary syndrome

## ABSTRACT

**Introduction:** Hepatopulmonary syndrome (HPS) is characterized by a combination of liver disease, gas exchange abnormalities, and pulmonary vascular dilation. The effect of melatonin on oxidative and nitrosative stress compared with other antioxidants has not been completely elucidated yet. **Objective:** To assess the antioxidant effect of melatonin (MLT) on liver and lung tissues of animals with bile duct ligation (BDL)-induced HPS.

**Methods:** A model of BDL-induced biliary cirrhosis was used in 24 male Wistar rats divided into four groups: control group (CG), control group receiving melatonin (CG+MLT), hepatopulmonary syndrome (HPS), and hepatopulmonary syndrome with melatonin (HPS+MLT). Animals were treated with MLT or vehicle solution administered intraperitoneally from day 15 to day 28 days after BDL. On day 29, animals were killed by exsanguination and blood, liver, lung, and femur were collected for analysis.

**Results:** There was a significant increase in liver transaminases in the HPS compared with the CG and CG+MLT groups and a decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.001$ ). Lipoperoxidation (LPO) was increased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups but was reduced in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ). The activity of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase was reduced in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups and increased in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ). Glutathione-S-transferase activity was increased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups, and was decreased in the HPS+MLT group compared with the HPS group. The nitrite/nitrate ratio increased in the HPS group and decreased in the HPS+MEL group ( $p < 0.05$ ). SOD expression was decreased decreased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups and increased in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ). The same was observed for inducible nitric oxide synthase, interleukin 1 $\alpha$  and with the p65 subunit of nuclear factor kappa B in the HPS group, with decrease in the HPS+MLT group ( $p < 0.05$ ). Histological analysis of the lung tissue revealed normal lung parenchyma in the CG and CG+MLT groups and increased diameter of pulmonary vessels, and inflammatory infiltrate in the HPS group, which was not

observed in the HPS+MLT group. Blood gas analysis showed hypoxemia in the HPS group, with the HPS+MLT exhibiting better results. There was also an increase in damage and frequency damage in the HPS group compared with the control groups, whereas there was a decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p<0.05$ ).

**Conclusions:** Results suggest that MLT has an antioxidant effect on liver and lung tissues in animals with BDL-induced HPS.

Keywords: Hepatopulmonary Syndrome; Blood Gas Analysis; Melatonin.  
Experimental Model

## INTRODUCTION

Hepatopulmonary syndrome (HPS) is characterized by a combination of liver disease, gas exchange abnormalities, and pulmonary vascular dilation [1]. Intrapulmonary vascular dilation causes arteriovenous pulmonary changes leading to reduced arterial oxygenation [2]. Experimental models of secondary biliary cirrhosis induced by prolonged bile duct obstruction showed that this condition leads to acute inflammatory reactions and subsequently to systemic changes [3].

HPS interferes with the physiological functioning of hepatic and pulmonary systems and thus contributes to the worsening of patient's clinical status. This finding has already been reported by Oded *et al* (2016), who investigated the clinical status of patients with cystic fibrosis and portal hypertension [4].

Studies using experimental models of bile duct ligation (BDL) found that pulmonary vascular dilatation that characterizes HPS may result from autophagy promoted by pulmonary tissue cells responsible for accelerating the formation and proliferation of pulmonary macrovascular endothelial cells. This mechanism aims to remove organelles that were damaged in the pathophysiological process caused by liver disease [5,6].

Oxidative stress has a key role in the progression and maintenance of several diseases, meaning that the administration of antioxidants may contribute to reduce hepatic and pulmonary changes. This was observed in experimental studies using a BDL model of HPS and antioxidant therapy [7,8]. Although melatonin (MLT) is usually associated with control and treatment of circadian rhythm changes, in recent years it has been much investigated for its antioxidant capacity in several tissues [9].

Liver tissue changes resulting from BDL-induced cirrhosis and the effect of melatonin were analyzed in the study by Colares *et al* (2016), which observed improvements in parenchymal structure and in liver function after the use of melatonin [10]. The effect of antioxidants such as quercetin and S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) on HPS has been studied elsewhere [11,12,13], but the effect of melatonin on lung tissue has not been described in the literature yet.

In a review by Tan *et al* (2009), MEL was found to be more efficient in reducing oxidative/nitrosative stress compared with other antioxidants like vitamins C and E [9]. In cells, MLT is for gene regulation of genes and nuclear factors contributing to the formation and regulation of antioxidant enzymes [14]. It also contributes to the clinical treatment of several diseases [15], however, the results and

mechanisms of this treatment are still controversial in the literature, depending on the tissue being evaluated. Thus, the action of MLT on liver and lung diseases such as HPS, especially its antioxidant effect, requires further study.

The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of MLT on liver and lung tissues in animals with BDL-induced HPS.

## **MATERIAL AND METHODS**

An experimental study was conducted with 24 male Wistar rats with a mean weight of 250 g and from the Animal Experimentation Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. They were maintained on a 12:12 h light/dark cycle, at a temperature of 22±2°C, at a relative air humidity between 40-60%, and were given water and standard rat feed *ad libitum*.

A model of secondary biliary cirrhosis was used according to that established by Kountouras [16], based on bile duct ligation (BDL). The sample was divided into four groups of six animals each. Group 1: Control group (CG) - a simulation of BDL was performed and vehicle solution – sodium chloride (NaCl 0.9%) – was administered intraperitoneally (i.p.). Group 2: Control group + melatonin (CG+MLT) - a simulation of BDL was performed and MLT was administered i.p. (20 mg/kg of body weight). Group 3: Hepatopulmonary syndrome (HPS) was performed and vehicle solution – sodium chloride (NaCl 0.9%) was administered i.p. Group 4: Hepatopulmonary syndrome + melatonin (HPS+MLT) – BDL was performed and MLT was administered i.p. (20 mg/kg of body weight).

After fourteen (14) days of BDL the animals received the vehicle or MLT according to the group and after fourteen (14) days of treatment were anesthetized to collection of blood and lung, liver, and femur tissues, totaling twenty-eight (28) days of experiment. Blood samples collected by retro-orbital venous plexus puncture were used to assess liver function by measuring the levels of the following enzymes: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP). Analyses were performed using an automated enzymatic method (Siemens Advia 1800 Chemistry System). AST and ALT levels were determined by the Kinetic UV test, and AP levels were determined by a colorimetric kinetic enzyme assay.

The vehicle solution or MLT started to be administered 14 days after the surgical procedure, with MLT (SIGMA® Chemical Co St Louis, Mo) being administered i.p. (20 mg/kg) at a volume proportion of 0.6 mL daily for 14 days.

After being collected, tissues were weighed and placed in a 9 mL phosphate buffer per gram of tissue, then homogenized with Ultra-Turrax (IKA-WERK) for 2 minutes at a temperature of 0-2 °C, and finally homogenized and centrifuged in a refrigerated centrifuge (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) for 10 minutes at 4,000 revolutions per minute (rpm) [17].

Lipoperoxidation (LPO) was measured through the quantitative thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method, in which the colored product obtained was collected and read in a spectrophotometer (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) at 535 nm. TBARS levels were expressed in nmol/mg of protein [18].

Catalase (CAT) enzyme activity was determined using the method proposed by Boveris and Chance [19], and superoxide dismutase (SOD) activity was determined using an assay based on the ability of SOD to inhibit the formation of adrenochrome, a product resulting from the oxidation of adrenaline [20].

Glutathione peroxidase (GPx) is an enzyme that catalyzes the reaction of hydroperoxide with reduced glutathione (GSH), yielding oxidized GSH (GSSG) and the product of hydroperoxide reduction. Its activity may be determined by measuring the consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) when reducing GSSG to GSH [21].

The glutathione S-transferase (GST) activity assay is based on an enzyme reaction which at 30 °C catalyzes the formation of 1 µmol DNP-SG using a GSH concentration of 1 mmol/L and chloro dinitrobenzene (CDNB). The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and expressed as µmol/min/mg protein [22].

Nitric oxide production was indirectly measured with a quantitative Griess colorimetric assay, which is based on enzymatic reduction of nitrates (NO<sub>3</sub>) to nitrites (NO<sub>2</sub>) in the presence of nitrate reductase and NADPH, with subsequent colorimetric determination of NO<sub>2</sub> by the Griess reagent (a mixture of sulphanilamide and naphthylethylenediamine specific for NO<sub>2</sub>). Because excess NADPH inhibits the Griess reaction, it is necessary to oxidize all NADPH that was not used in the reduction of NO<sub>3</sub>. This was achieved by adding nitrate reductase. The reading was

performed in a microplate reader at 540 nm and results were expressed in mmol of NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> [23].

Cytokine levels were determined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (Read-SET-Go, eBioscience, San Diego, USA). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was expressed in pg/mL, as described previously [24].

SOD, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) were assessed using Western blot analysis, as described by Laemmli *et al* [25] and Towbin *et al* [26]. Nuclear extracts were prepared from lung homogenates and the supernatant was collected and stored at -80°C. Lysate proteins were fractioned by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. 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 anti-NF- $\kappa$ B/p65 (SC8008/65kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200-1,000 dilution with TTBS in 5% nonfat dry milk and with anti- $\beta$ -actin (A5060/42kDa) antibodies (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 h at room temperature with anti-IgG-horseradish peroxidase (HRP) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:4,000 dilution.

Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence (ECL) commercial kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), membranes were exposed for 2 min, bands were quantified by densitometry using the Scion Image 4.02 for Windows (Scion Corporation, Frederick, USA), and results were expressed in arbitrary units (a.u.).

Hematoxylin and eosin (HE) and picrosirius red staining were used for histological examination of the lung. The diameter of blood vessels and the degree of fibrosis in lung tissues were assessed.

Samples for arterial blood gas analysis were collected from abdominal aorta to evaluate the following variables: potential of hydrogen (pH), partial pressure of carbon dioxide (PCO<sub>2</sub>), partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>), carbonic acid (HCO<sub>3</sub>), and oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>). Gas analysis was performed by iontophoresis using an ABL 700 analyzer (Radiometer, Copenhagen).

All animals were killed by exsanguination under deep anesthesia and then lung tissue was taken for analysis.

The comet assay was used to analyze the index and frequency of DNA damage as described by Speit and Hartmann [27], including changes suggested by Picada *et al* [28]. Damage index (DI) may range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (maximum damage), and the damage frequency (%) was calculated based on the number of cells with tail versus those with no tails [28].

Repeated-measures one-way analysis of variance (ANOVA) was used for intergroup comparison. Differences were assessed by the Student–Newman–Keuls procedure and data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 17.0 or higher. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Table 1 shows the results for hepatic enzymes (transaminase activity), lung tissue LPO, and activity of antioxidant enzymes and reveals the effects of MLT on the treated groups.

Figure 1 presents the results for  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  ratio in lung tissue. The  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  ratio and interleukin-1  $\alpha\alpha$  levels were significantly increased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups ( $p < 0.05$ ) but decreased in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ).

The HPS group also showed a decrease in SOD and an increase in iNOS and p65 compared with the CG and CG+MLT groups ( $p < 0.05$ ), whereas the HPS+MLT group exhibited an increase in SOD and a decrease in iNOS and p65 compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ) (Figure 2).

Figure 3 shows that the diameter of pulmonary vessels was significantly increased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups but significantly decreased in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ).

Histological analysis of lung tissue (Figure 4A) revealed preserved lung parenchyma with ventilated alveoli and alveolar septa. The HPS group exhibited tissue disorganization associated with increased vascular diameter and inflammatory infiltrate in lung parenchyma. Conversely, the HPS+MLT group showed tissue



restructuring, similar to that of the CG and CG+MLT groups, but also presented with inflammatory infiltrates. Figure 4B shows a photomicrograph of lung tissue sections evidencing increased pulmonary fibrosis in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups. This change was attenuated by treatment with MEL, since there was a decrease in pulmonary fibrosis in the HPS+MLT group compared with the HPS group.

Arterial blood gas analysis (Table 2) revealed a significant decrease in pH ( $p < 0.05$ ) and an increase in  $PCO_2$  ( $p < 0.001$ ) in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups, as well as a decrease in  $PO_2$  and  $SpO_2$  in the HPS group compared with the CG ( $p < 0.01$ ) and the CG+MLT groups ( $p < 0.05$ ). All these variables were improved in the HPS+MLT group ( $p < 0.05$ ) compared with the HPS group.

Table 3 shows that damage index and frequency as determined by the comet assay were significantly increased in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups ( $p < 0.05$ ) and significantly decreased in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSION

This study was able to demonstrate the antioxidant and anti-inflammatory effect of MLT on liver and lung tissues, and our experimental model found a decrease in the index and frequency of DNA damage and reduced histological damage in lung parenchyma.

Using the same experimental model to assess pulmonary alterations caused by BDL, Tieppo *et al* [29] found an increase in AST, ALT and AP activity and changes in lung parenchyma. These results were similar to those obtained in the present study, which found changes in hepatic enzymes and lung tissue, with improvements after treatment with MLT.

A study by Colares *et al* [10], using the same experimental model as ours showed that hepatic alterations observed in animals with HPS improved after treatment with MLT, but lung tissue was not assessed.

In chronic diseases affecting different organs such as liver, lung, and nervous system, it is possible to observe an increase in the amount of collagen and proteins in tissues composing these organs [30]. Oxidative stress as assessed by LPO

promotes disorganization in cell membranes, with increased permeability and leakage of enzymes between intra- and extracellular media, leading to cell death [31]. In the present study, there was an increase in lung tissue LPO in the HPS group, but these levels were reduced in the HPS+MLT group.

The activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD, and GPx had a significant decrease in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups, and an increase in the HPS+MLT group compared with the HPS group. However, glutathione-S-transferase (GST) showed an opposite behavior, with a significant increase in the HPS group and a decrease in the HPS+MLT group.

The antioxidant defense system, composed mainly of SOD, CAT and GPx, may be the responsible for this tissue response because this system neutralizes reactive oxygen species (ROS) due to its capacity of donating electrons [32].

Bona *et al* [33] showed the antifibrinogenic effect of MLT in the liver tissue, with improved oxidative stress, and inflammatory and angiogenic processes caused by liver cirrhosis experimentally induced by CCl<sub>4</sub> in rats.

MLT is an indoleamine that has a potent antioxidant effect due to its chemical structure consisting of a double bond at carbons 2 and 3, thus protecting different tissues against the action of free radicals [34] and having an anti-inflammatory and immunomodulatory action [35].

We believe that, in our study, MLT was responsible for removing the reactive oxygen species (ROS) in lung tissue and for regulating antioxidant enzyme activity, exhibiting a similar effect to that observed in the liver tissue by Schemitt *et al* [36].

There was also an indirect increase in nitric oxide metabolism assessed by the ratio between nitrites and nitrates in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups and a decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group. A similar result was reported by Feng & Hong [37], who evaluated vasoactive substances and hemodynamic anomalies in patients with HPS caused by chronic liver disease, with increased concentrations in the ratio between nitrites and nitrates and a negative correlation with vascular resistance in the pulmonary artery.

Arginine metabolism mediated by nitric oxide synthases, especially by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), has an important participation in the production of endogenous nitric oxide (NO) and in circulating nitrate levels in the organism [38]. iNOS and eNOS contribute to the development of HPS through

pulmonary vasodilation, and exhaled nitric oxide levels were also increased in patients with HPS [39].

Using an experimental model of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), Bona *et al* [33] reported increased NF- $\kappa$ B and iNOS and increased nuclear expression of the p65 subunit. These findings were consistent with those of the present study, which demonstrated an increased iNOS in the HPS group and reduced iNOS in the HPS+MLT group. In agreement with the studies by Bona *et al* [33] and Mauriz *et al* [40], MLT promoted the modulation of NF- $\kappa$ B, thus enabling the control of the inflammatory process, as shown by the reduction in iNOS in the HPS+MEL group. The same occurred with interleukin 1- $\beta$ , which exhibited increased levels in the HPS group and reduced levels in the HPS+MLT group, corroborating findings by Kunak *et al* [41], although these authors evaluated the kidney tissue.

This mechanism may be explained by the action of phagocytic cells that act in the process of bacterial translocation occurring in the HPS, in which the migration of macrophages to the lung tissue leads to production of superoxide radical anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) that binds to the nitric oxide produced by the iNOS. Increased enzyme antioxidant activity as observed by the significant increase in SOD expression in lung tissue homogenates in the HPS group may be a response to protect the tissue against aggression caused by increased ROS.

The histological analysis of the lung tissue performed in the present study revealed tissue disorganization in the HPS group, with increased vascular diameter and infiltrate area in lung parenchyma, with tissue restructuring and reduced vascular diameter in the HPS+MLT group. Vascular disorganization with arteriovenous shunt and pulmonary vasodilatation compromise the maintenance of adequate levels of arterial oxygen. In the HPS group, limited oxygen diffusion to capillary result from the presence of vascular bed dilation associated with increased cardiac output characteristic of hyperdynamic circulation in cirrhosis rather than from thickening of alveolar-capillary membrane [42].

Tieppo *et al* [7] found a decrease in PaO<sub>2</sub> and SatO<sub>2</sub>/Hb and a significant increase in PaCO<sub>2</sub> in cirrhotic animals compared with the CG. These findings corroborate those of the present study, arterial blood gas parameters pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, SpO<sub>2</sub> were reestablished after treatment with MLT.

DNA changes may be assessed by micronucleus and comet assays, and this study found a significant increase in damage index and frequency in the HPS group

and a reduction in animals treated with melatonin. In the study by Vercelino *et al* [43], there was an increase in the frequency of micronuclei in bone marrow and increased DNA damage in lung and liver tissues in animals from the HPS group, although damage could not be reversed at a dose of 10 mg/kg using treatment with S-NAC antioxidant, a fact that occurred in our study after the administration of melatonin.

The results of the present study indicate that MLT has the capacity of improving oxidative stress, activity of the antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, and GST, SOD expression, inflammatory process, gas exchanges, vasodilation, DNA damage index and frequency, suggesting its use in clinical trials in patients with chronic liver disease diagnosed with HPS.

**Acknowledgments.** This study was supported by the Fund for Research and Event Promotion (FIPE)/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology (HCPA/UFRGS) e Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants (ULBRA).

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## APPENDICES:

Table 1: Activity of hepatic enzymes, lipid peroxidation, and antioxidant activity in lung tissue.

<b>Groups</b>	<b>CG</b>	<b>CG+MLT</b>	<b>HPS</b>	<b>HPS+MLT</b>
<b>AST (U/L)</b>	82.25±9.31	94.75±7.95	444.50±48.12*	106.33±18.48#
<b>ALT (U/L)</b>	38.25±1.44	36.75±2.53	113.25±12.19*	38.67±0.76#
<b>AP (U/L)</b>	110.75±4.01	106±5.94	395.75±36.42*	97.67±10.80#
<b>TBARS</b>	0.38±0.05	0.37±0.07	0.83±0.07*	0.50±0.04#
<b>CAT</b>	8.32±0.45	9.09±0.36	5.17±0.25*	8.52±0.40#
<b>GST</b>	2.54±0.37	2.08±0.39	7.78±0.43*	3.95±0.70#
<b>SOD</b>	4.37±0.38	4.79±0.29	1.99±0.19*	4.24±0.61#
<b>GPx</b>	6.68±0.23	5.96±0.22	3.21±0.12*	6.88±0.47#

Data expressed as mean±standard error. Experimental groups: Control group (CG), Control+melatonin group (CG+MLT), hepatopulmonary syndrome group (HPS), and hepatopulmonary syndrome+melatonin group (HPS+MLT).

AST- aspartate aminotransferase, ALT- alanine aminotransferase, AP- alkaline phosphatase

\* Significant increase in the HPS group compared with the CG and CG+MEL groups (p<0.001).

# Significant decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group (p<0,001).

TBARS- thiobarbituric acid-reactive substances, CAT- catalase, GST- glutathione-S-transferase, SOD- superoxide dismutase, and GPx- glutathione peroxidase.

\* Difference in the HPS group compared with the CG and CG+MLT group; p<0.01.

# Difference in the HPS+MLT group compared with the HPS group; p<0.001.

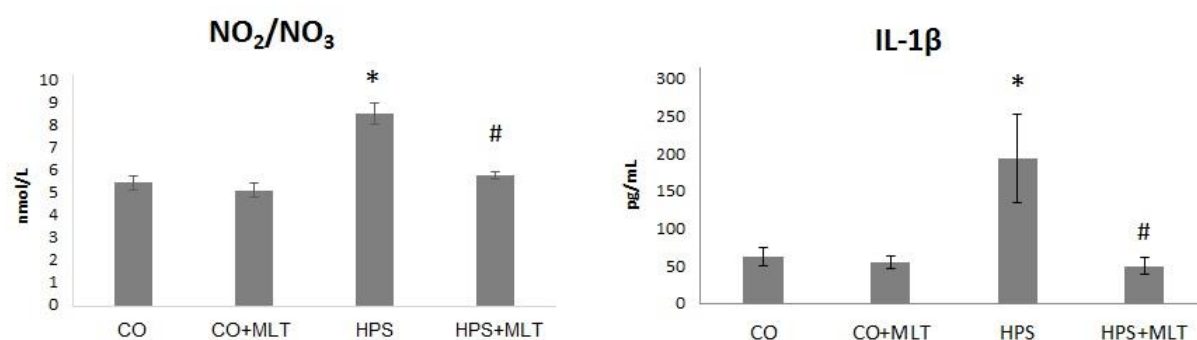


Figure 1: Nitrite/nitrate (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) ratio and interleukin 1-β. Experimental groups: Control group (CG), Control group+Melatonin (CG+MLT), Hepatopulmonary syndrome group (HPS), and Hepatopulmonary syndrome+Melatonin group (HPS+MLT).

\* Significant increase in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups (p<0.05).

# Significant decrease in the HPS+MLT compared with the HPS group (p<0.05).

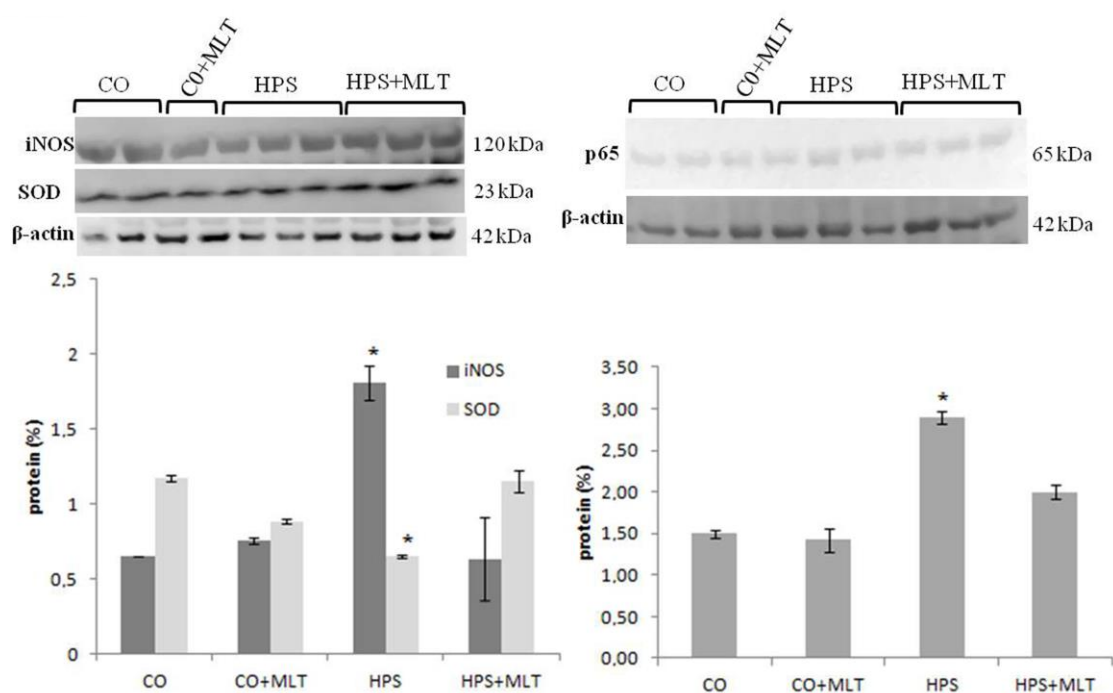


Figure 2: Western blot of superoxide dismutase (SOD), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and p65. There was a significant decrease in SOD and increase in iNOS and p65 in the HPS group compared with the CG and the CG+MLT groups, with an increase in SOD and decrease in iNOS and p65 in the HPS+MLT compared with the HPS group.\* Significant increase compared with the CG and CG+MLT groups and significant decrease in the HPS group; p<0.05.

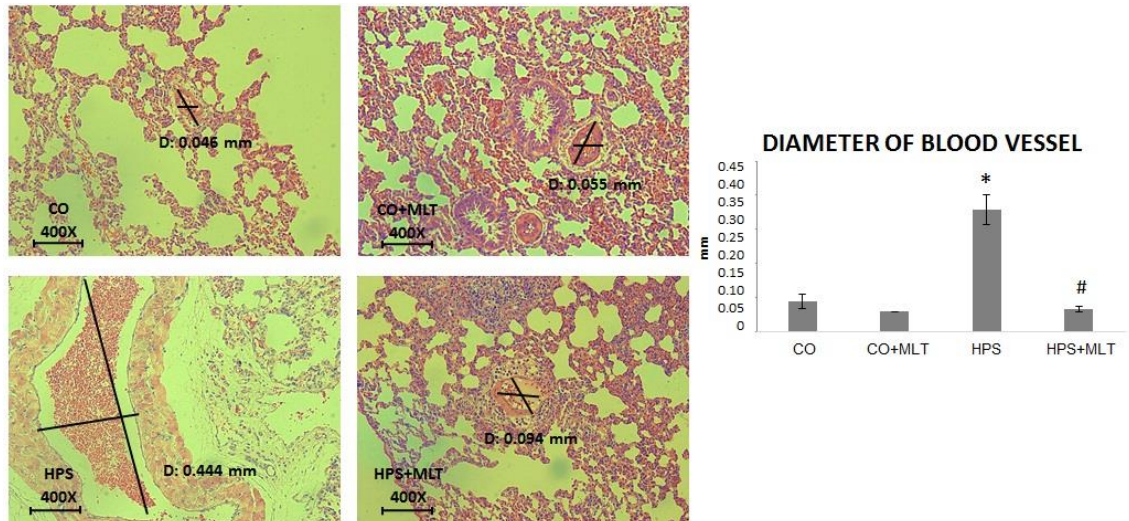


Figure 3: Photomicrograph of lung vascular diameter (mm). Data expressed as mean+standard error. Experimental groups: Control group (CG), Control+Melatonin group (CG+MLT), Hepatopulmonary syndrome (HPS) and Hepatopulmonary syndrome+Melatonin (HPS+MLT).

\*Significant increase in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups ( $p < 0.05$ ).

# Significant decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group ( $p < 0.05$ ).

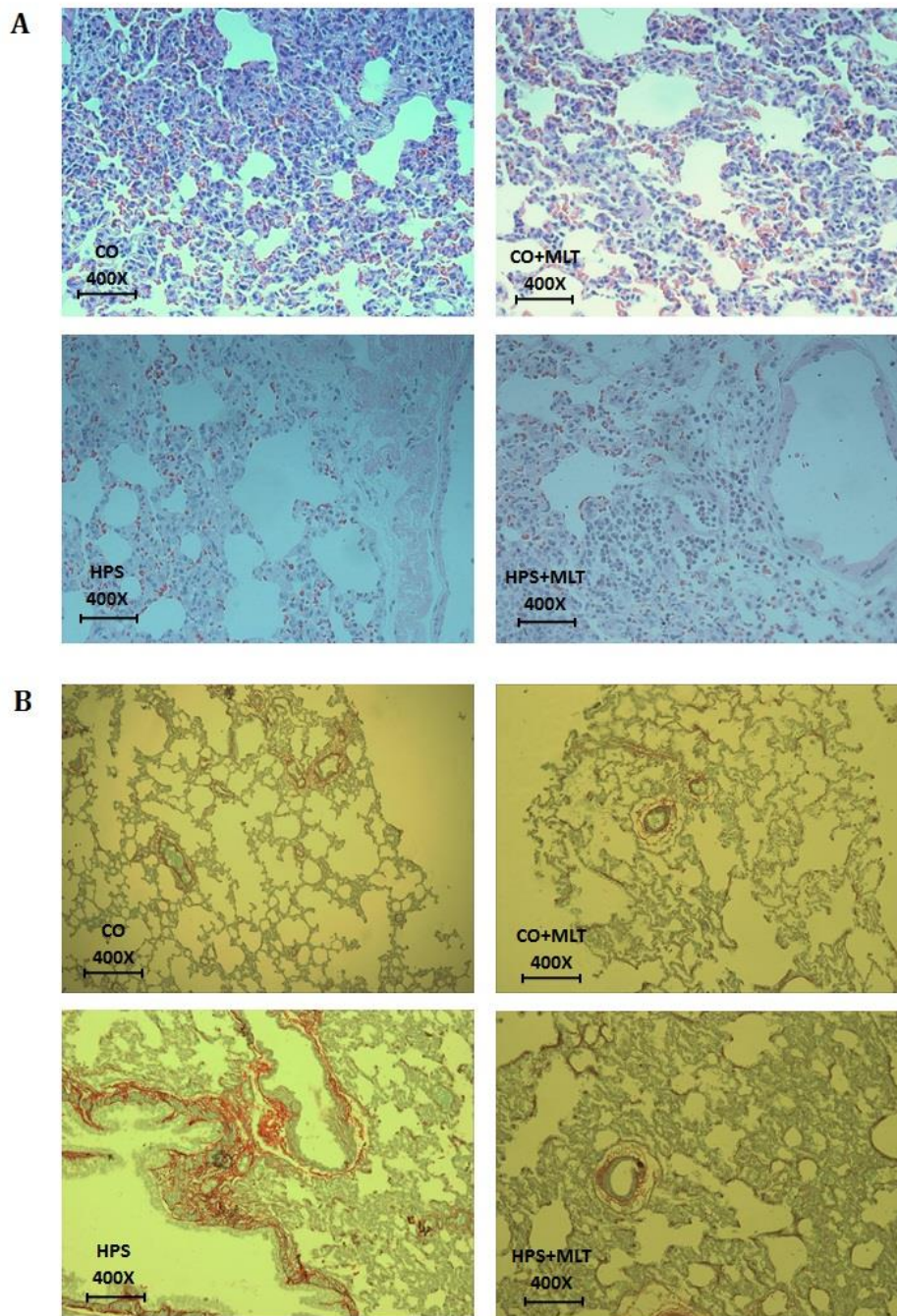


Figure 4:

(A) Photomicrograph of lung parenchyma by HE, magnification of 400X.

CG and CG+MLT: normal lung parenchyma.

HPS group: presence of infiltrates in lung tissue.

HPS+MLT group: lung tissue restructurating with maintenance of lung infiltrates.

(B) Photomicrograph of lung tissue samples stained with picrosirius (magnification of 400X).

Increased pulmonary fibrosis in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups, and reduced pulmonary fibrosis in the HPS+MLT group compared with the HPS group.



Table 2: Arterial blood gas

<b>Groups</b>	<b>CG</b>	<b>CG+MLT</b>	<b>HPS</b>	<b>HPS+MLT</b>
<b>pH</b>	7.37±0.04	7.35±0	7.24±0*	7.36±0.01#
<b>PCO<sub>2</sub></b>	45±1.41	45±1.41	56.66±1.51**	46.33±3.05##
<b>PO<sub>2</sub></b>	77±2.82	73.50±0.7	57.20±6.22#	73±4.58##
<b>HCO<sub>3</sub></b>	25.95±0.91	25.77±1.19	26.48±0.96	25.03±1.2
<b>SpO<sub>2</sub></b>	92±3.43	92±1.41	81.33±5.77#	92.50±2.64##

Data expressed as mean±standard error.

Experimental groups: control group (CG), control group+melatonin (CG+MLT), hepatopulmonary syndrome (HPS) and hepatopulmonary syndrome+melatonin (HPS+MLT). pH- potential of hydrogen, PCO<sub>2</sub>- partial pressure of carbon dioxide, PO<sub>2</sub>- partial pressure of oxygen, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ion bicarbonate, SpO<sub>2</sub>- oxygen periferic saturation.

\* Difference in pH between the HPS group compared with the CG and CG+MLT, p<0.05.

\*\* Difference in PCO<sub>2</sub> between the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups, p<0.001.

# Difference in PO<sub>2</sub> (p<0.01) and SpO<sub>2</sub> (p<0.05) between the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups.

## Difference between HPS+MLT and HPS groups, p<0.05.

Table 3: Comet assay in the different groups.

<b>Group</b>	<b>Damage index</b>	<b>Damage frequency</b>
<b>CG</b>	68.6±26.3	59.2±20.2
<b>CG+MLT</b>	72.9±16.8	67.6±12.9
<b>HPS</b>	233.2±43.4*	96.8±4.6 *
<b>HPS+MLT</b>	117.7±20.3#	73.9±12.6#

Data expressed as mean±standard error.

Experimental groups: Control group (CG), Control group+melatonin (CG+MLT), hepatopulmonary syndrome group (HPS), and hepatopulmonary syndrome+melatonin (HPS+MLT)

\* Significant increase in the HPS group compared with the CG and CG+MLT groups (p<0.05).

# Decrease in the HPS+MLT group compared with the HPS group (P<0.05).

## Bibliographic References

1. Krowka MJ, Fallon MB, Kawut SM, Fuhrmann V, Heimbach JK, Ramsay MAE, et al. International liver transplant society practice guidelines: diagnosis and management of hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension. *Transplantation*. 2016; 100: 1440–1452.
2. Koch DG, Fallon MB. Hepatopulmonary Syndrome. *Clin Liver Dis*. 2014 (18):407–20.
3. Silva Júnior OC, Mazzetto SA, Souza MEJ, Picinato MANC, Sankarankutty AK. Obstrução Biliar Extra Hepática. In: Silva OC, Zucoloto S, Beer A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. São Paulo: Robe, 1998.
4. Oded B, Eyal S, Michael W, Zeev P, Malena CC, Eitan K, et al. Hepatopulmonary syndrome in patients with cystic fibrosis and liver disease. *Chest*. 2016; 149(2):e35–e38
5. Xu D, Chen B, Gu J, Chen L, Belguise K, Wang X, et al. Inhibition of autophagy ameliorates pulmonary microvascular dilation and PMVECs excessive proliferation in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Scientific Reports*. 2016; *Scientific Reports* 6, Article number: 30833 (2016). doi:10.1038/srep30833.
6. Grilo-Bensusan I, Pascasio-Acevedo JM. Hepatopulmonary syndrome: W what we know and what we would like to know. *World J Gastroenterol*. 2016 July 7; 22(25): 5728-5741.
7. 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
8. Rosa DPD, 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.
9. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules* 2015, 20, 18886-18906; doi:10.3390/molecules201018886.
10. Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC, Bosco AD, et al. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(40): 8918-28.

11. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007 Jul;45(7):1140-6.
12. Li X, Chen Y, Wang L, Shang G, Zhang C, Zhao Z, et al Quercetin alleviates pulmonary angiogenesis in a rat model of hepatopulmonary syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49(7): e5326. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20165326>.
13. Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, González-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med.* 2010; 88(4):401-11.
14. Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J Pineal Res.* 2015; 59(3):292-307.
15. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 39:99-104, 2005.
16. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1984;65(3): 305-11.
17. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985; 71:241-9.
18. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302–10.
19. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134:707-16.
20. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *World J Biol Chem.* 1972; 247:3170–5.
21. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-21.
22. Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta) *Methods Enzymol.* 1981;77:231–235.
23. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 1999; 301:49-61

24. Sellares J, Loureiro H, Ferrer M, Amaro R, Farre R, Torres A. The effect of spontaneous breathing on systemic interleukin-6 during ventilator weaning. *Eur Respir J*. 2012; 39:654–660.
25. Laemmli U, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol*. 1970; 49:99-113.
26. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992; 24:145-9
27. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 1999; 113:203-12.
28. Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003; 114:80-5.
29. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol*. 2005; 42(4): 244-8.
30. 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):247–256.
31. Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23: 419-25.
32. Qiao D, Hou L, Liu X. Influence of intermittent anaerobic exercise on mouse physical endurance and antioxidant components. *Br J Sports Med*. 2006; 40(3):214-218.
33. Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, David CD, Valiatti B, Schaun MI, et al. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterology*, Volume 2012, Article ID 762920, 7 pages.
34. Brzozowski T.; Jawoewk J. Basic and clinical aspects of melatonin in the gastrointestinal tract. New advancements and future perspectives. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(30):4785-7.

35. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 376-86.
36. Schemitt EG. Ação da glutamina sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório na insuficiência hepática aguda grave. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.
37. Feng G, Rong H. The role of hemodynamic and vasoactive substances on hepatopulmonary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18: 380-386.
38. Waltz P, Escobar D, Botero AM, Zuckerbraun, BS. Nitrate/Nitrite as critical mediators to limit oxidative injury and inflammation. *Antioxid Redox Signal,* 2015; 23(4): 328-39.
39. Rodríguez-Roisin R, Krowka MJ, Hervé P, Fallon MB; ERS Task Force Pulmonary-Hepatic Vascular Disorders (PHD) Scientific Committee. Pulmonary-hepatic vascular disorders (PHD). *Eur Respir J.* 2004; 24(5):861-80.
40. 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.
41. Kunak CS, Ugan RA, Cadirci E, Karakus E, Polat B, Un H, et al. Nephroprotective potential of carnitine against glycerol and contrast-induced kidney injury in rats through modulation of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and apoptosis. *Br J Radiol* 2016; 89: 2-14.
42. Krowka MJ. Hepatopulmonary syndrome: what are we learning from interventional radiology, liver transplantation, and other disorders? *Gastroenterology.* 1995; 109(3):1009-13.
43. Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, et al. N-Acetylcysteine Effects on Genotoxic and Oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102(4): 370-6.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido às complicações decorrentes que podem lesar diferentes órgãos como o pulmão, a SHP está associada à elevada taxa de mortalidade. Alguns fatores podem estar associados a essas lesões como a geração de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, resposta inflamatória no tecido pulmonar, vasodilatação, fator de transcrição nuclear kappa B e dano ao DNA. Os estudos que estão sendo desenvolvidos nessa área demonstram que o uso de antioxidantes pode reduzir as lesões no fígado e no pulmão. Evidências indicam que a MLT desempenha um papel benéfico na restauração de tecidos, reduzindo dessa forma as lesões hepática e pulmonar na SHP, indicando que a MLT pode ser uma alternativa terapêutica na manutenção e recuperação de pacientes, podendo reduzir a mortalidade e melhorar a qualidade de vida deles.

Neste estudo, demonstramos que a MLT foi capaz de proteger o fígado e o pulmão dos animais com SHP.

### 8.1 Conclusões Artigo I

“Hepatopulmonary Syndrome: Oxidative Stress and Physical Exercise”.

- Na revisão da literatura foi possível observar que as alterações presentes em pacientes com SHP são muito semelhantes às encontradas no modelo experimental de LDB. As características clínicas, como vasodilatações pulmonares e alterações gasométricas são mais facilmente entendidas quando investigados o comportamento do sistema antioxidante, os processos inflamatórios associados à translocação bacteriana, bem como a existência de shunts portossistêmicos e intrapulmonares. A SHP, bem como as doenças que afetam o sistema hepático, podem contribuir com o desenvolvimento da sarcopenia e da caquexia, em decorrência da hiperamonemia, da desnutrição, do hipermetabolismo e da proteólise tecidual. O exercício físico surge como potencial intervenção terapêutica para reverter as alterações existentes nos sistemas musculoesquelético e pulmonar, e pode ser utilizado por pacientes que apresentem a SHP ou qualquer alteração no sistema hepático.

## 8.2 Conclusões Artigo II

“Efeitos da melatonina sobre o tecido pulmonar no modelo experimental de síndrome hepatopulmonar”.

- Redução na vasodilatação e a fibrose do tecido pulmonar, melhorando alterações estruturais ocasionadas pela SHP;
- Redução do estresse oxidativo no tecido pulmonar;
- Melhora na gasometria e nas trocas gasosas;
- Melhoras na relação peso pulmonar/ peso corporal (%) e gradiente alvéolo-arterial de oxigênio.

## 8.3 Conclusões Artigo III

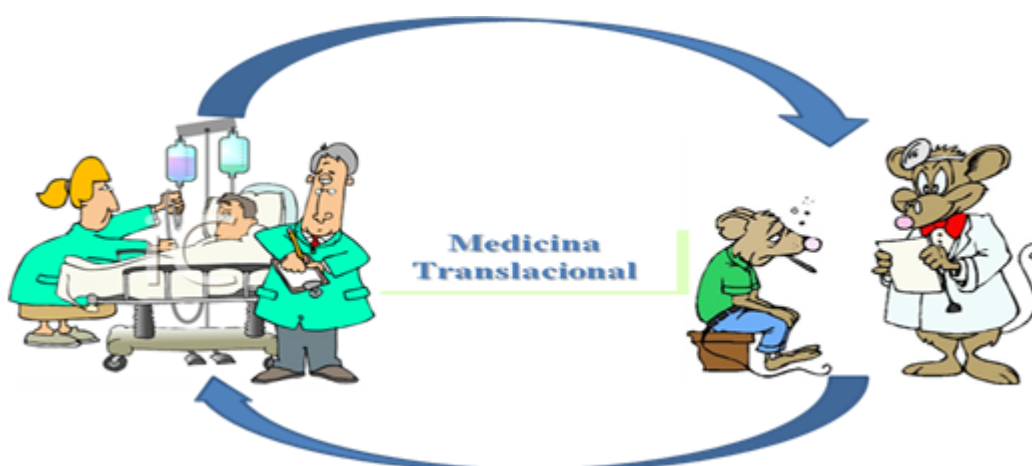
“Efeitos da melatonina sobre o tecido hepático e pulmonar em animais com síndrome hepatopulmonar por ligadura do ducto biliar”

- Restauração da integridade hepática com melhora nos níveis das enzimas séricas Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (FA);
- Melhora nas trocas gasosas avaliadas pela gasometria arterial;
- Redução na lipoperoxidação do tecido pulmonar;
- Melhora na atividade enzimática antioxidante da SOD, CAT, GPx e GST;
- Redução do diâmetro dos capilares pulmonares nos animais com SHP;
- Redução do processo inflamatório avaliado pela expressão da iNOS e p65 do NF-kB;
- Melhora no índice e na frequência de dano ao DNA.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, percebemos a necessidade de avaliação dos efeitos da ação da melatonina na SHP, associada a um programa de atividade física com o objetivo de verificar os benefícios do exercício no controle do estresse oxidativo, função pulmonar, processo inflamatório e integridade/recuperação do tecido muscular periférico.

A partir de novos estudos que indiquem a possibilidade da intervenção com o exercício associado aos benefícios do uso da melatonina em diversos tecidos, poderemos aproximar a pesquisa experimental à realidade clínica, com a expectativa de promover a medicina translacional (figura 14)



**Figura 14:** Medicina translacional – da bancada à clínica.



## 10. ANEXOS

### 10.1 Artigos publicados durante a vigência do doutorado

ISSN 1007-9327 (print)  
ISSN 2219-2840 (online)

# World Journal of *Gastroenterology*

*World J Gastroenterol* 2016 October 28; 22(40): 8853-9038



 Published by Baishideng Publishing Group Inc

 <b>World Journal of Gastroenterology</b>	
Contents	Weekly Volume 22 Number 40 October 28, 2016
<b>EDITORIAL</b>	
8853	Transarterial chemoembolization with drug-eluting beads in hepatocellular carcinoma <i>Nam HC, Jang B, Song MJ</i>
<b>THERAPEUTICS ADVANCES</b>	
8862	Liver-targeted hydrodynamic gene therapy: Recent advances in the technique <i>Yokoo T, Kamimura K, Abe H, Kobayashi Y, Kanefuji T, Ogawa K, Goto R, Oda M, Suda T, Terai S</i>
<b>REVIEW</b>	
8869	Cardiovascular risk after orthotopic liver transplantation, a review of the literature and preliminary results of a prospective study <i>Pisano G, Fracanzani AL, Caccamo L, Donato MF, Fargion S</i>
8883	Pathophysiological and clinical aspects of gastric hyperplastic polyps <i>Markowski AR, Markowska A, Guzinska-Ustymowicz K</i>
8892	Indications and surgical options for small bowel, large bowel and perianal Crohn's disease <i>Toh JWT, Stewart P, Rickard MJFX, Leong R, Wang N, Young CJ</i>
<b>MINIREVIEWS</b>	
8905	Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases <i>Zhang M, Yang XJ</i>
<b>ORIGINAL ARTICLE</b>	
<b>Basic Study</b>	
8910	Polymorphisms and resistance mutations of hepatitis C virus on sequences in the European hepatitis C virus database <i>Kliemann DA, Tovo CV, da Veiga ABG, de Mattos AA, Wood C</i>
8918	Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation <i>Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC, Bosco AD, Marroni NP</i>
8929	Fecal microbiota in pouchitis and ulcerative colitis <i>Li KY, Wang JL, Wei JP, Gao SY, Zhang YY, Wang LT, Liu G</i>

## Contents

*World Journal of Gastroenterology*  
Volume 22 Number 40 October 28, 2016

**Retrospective Study**

- 8940 Ansa pancreatica as a predisposing factor for recurrent acute pancreatitis  
*Hayashi TY, Gono W, Yoshikawa T, Hayashi N, Ohtomo K*
- 8949 Fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Noninvasive assessment using computed tomography volumetry  
*Fujita N, Nishie A, Asayama Y, Ishigami K, Ushijima Y, Takayama Y, Okamoto D, Shirabe K, Yoshizumi T, Kotoh K, Furusyo N, Hida T, Oda Y, Fujioka T, Honda H*
- 8956 Neuroendocrine neoplasms of liver - A 5-year retrospective clinico-pathological study applying World Health Organization 2010 classification  
*Burad DK, Kodiatte TA, Rajeeb SM, Goel A, Eapen CE, Ramakrishna B*

**Clinical Trials Study**

- 8967 Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma  
*Saeki I, Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Maeda M, Fujisawa K, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I, Ishikawa T, Uchida K, Tani K, Sakaida I*

**Observational Study**

- 8978 Factors affecting the quality of life of patients after gastrectomy as assessed using the newly developed PGSAS-45 scale: A nationwide multi-institutional study  
*Nakada K, Takahashi M, Ikeda M, Kinami S, Yoshida M, Uenosono Y, Kawashima Y, Nakao S, Oshio A, Suzukamo Y, Terashima M, Kadera Y*

**Prospective Study**

- 8991 Oropharyngeal acid reflux and motility abnormalities of the proximal esophagus  
*Passaretti S, Mazzoleni G, Vailati C, Testoni PA*

**SYSTEMATIC REVIEW**

- 8999 Systematic review: Safety of balloon assisted enteroscopy in Crohn's disease  
*Arulanandan A, Dulai PS, Singh S, Sandborn WJ, Kalmaz D*
- 9012 Efficacy of thioguanine treatment in inflammatory bowel disease: A systematic review  
*Meijer B, Mulder CJJ, Peters GJ, van Bodegraven AA, de Boer NKH*

**CASE REPORT**

- 9022 Safety and efficacy of self-expandable metallic stents in malignant small bowel obstructions  
*Tsuboi A, Kuwai T, Nishimura T, Iio S, Mori T, Imagawa H, Yamaguchi T, Yamaguchi A, Kouno H, Kohno H*
- 9028 Two cases of adenocarcinoma occurring in sporadic fundic gland polyps observed by magnifying endoscopy with narrow band imaging  
*Togo K, Ueo T, Yonemasu H, Honda H, Ishida T, Tanabe H, Yao K, Iwashita A, Murakami K*

**Contents**

*World Journal of Gastroenterology*  
Volume 22 Number 40 October 28, 2016

**LETTERS TO THE EDITOR**

- 9035 Establishment of various biliary tract carcinoma cell lines and xenograft models for appropriate preclinical studies

*Ojima H, Yamagishi S, Shimada K, Shibata T*

<b>Contents</b>		<i>World Journal of Gastroenterology</i> Volume 22 Number 40 October 28, 2016
<b>ABOUT COVER</b>	Editorial board member of <i>World Journal of Gastroenterology</i> , Michihiro Mutoh, MD, PhD, Head, Division of Cancer Prevention Research, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-Ku 1040045, Tokyo, Japan	
<b>AIMS AND SCOPE</b>	<p><i>World Journal of Gastroenterology</i> (<i>World J Gastroenterol</i>, <i>WJG</i>, print ISSN 1007-9327, online ISSN 2219-2840, DOI: 10.3748) is a peer-reviewed open access journal. <i>WJG</i> was established on October 1, 1995. It is published weekly on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, and 28<sup>th</sup> each month. The <i>WJG</i> Editorial Board consists of 1375 experts in gastroenterology and hepatology from 68 countries.</p> <p>The primary task of <i>WJG</i> is to rapidly publish high-quality original articles, reviews, and commentaries in the fields of gastroenterology, hepatology, gastrointestinal endoscopy, gastrointestinal surgery, hepatobiliary surgery, gastrointestinal oncology, gastrointestinal radiation oncology, gastrointestinal imaging, gastrointestinal interventional therapy, gastrointestinal infectious diseases, gastrointestinal pharmacology, gastrointestinal pathophysiology, gastrointestinal pathology, evidence-based medicine in gastroenterology, pancreatology, gastrointestinal laboratory medicine, gastrointestinal molecular biology, gastrointestinal immunology, gastrointestinal microbiology, gastrointestinal genetics, gastrointestinal translational medicine, gastrointestinal diagnostics, and gastrointestinal therapeutics. <i>WJG</i> is dedicated to become an influential and prestigious journal in gastroenterology and hepatology, to promote the development of above disciplines, and to improve the diagnostic and therapeutic skill and expertise of clinicians.</p>	
<b>INDEXING/ABSTRACTING</b>	<i>World Journal of Gastroenterology</i> ( <i>WJG</i> ) is now indexed in Current Contents®/Clinical Medicine, Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®), Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, PubMed, PubMed Central, Digital Object Identifier, and Directory of Open Access Journals. The 2015 edition of Journal Citation Reports® released by Thomson Reuters (ISI) cites the 2015 impact factor for <i>WJG</i> as 2.787 (5-year impact factor: 2.848), ranking <i>WJG</i> as 38 among 78 journals in gastroenterology and hepatology (quartile in category Q2).	
<b>FLYLEAF</b>	<b>I-IX</b>	Editorial Board
<b>EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<b>Responsible Assistant Editor:</b> <i>Xiang Li</i> <b>Responsible Electronic Editor:</b> <i>Fen-Fen Zhang</i> <b>Proofing Editor-in-Chief:</b> <i>Lian-Sheng Ma</i>	<b>Responsible Science Editor:</b> <i>Zi-Mao Gong</i> <b>Proofing Editorial Office Director:</b> <i>Jin-Lei Wang</i>
<b>NAME OF JOURNAL</b> <i>World Journal of Gastroenterology</i>  <b>ISSN</b> ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)  <b>LAUNCH DATE</b> October 1, 1995  <b>FREQUENCY</b> Weekly  <b>EDITORS-IN-CHIEF</b> Damian Garcia-Olmo, MD, PhD, Doctor, Professor, Surgeon, Department of Surgery, Universidad Autonoma de Madrid; Department of General Surgery, Fundacion Jimenez Diaz University Hospital, Madrid 28040, Spain  Stephen C Strom, PhD, Professor, Department of Laboratory Medicine, Division of Pathology, Karolinska Institutet, Stockholm 141-86, Sweden  Andrzej S Tarnawski, MD, PhD, DSc (Med), Professor of Medicine, Chief Gastroenterology, VA Long Beach Health Care System, University of Cali-	fornia, Irvine, CA, 5901 E. Seventh Str., Long Beach, CA 90822, United States  <b>EDITORIAL BOARD MEMBERS</b> All editorial board members resources online at <a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/editorialboard.htm">http://www.wjgnet.com/1007-9327/editorialboard.htm</a>  <b>EDITORIAL OFFICE</b> Jin-Lei Wang, Director Yuan Qi, Vice Director <i>World Journal of Gastroenterology</i> Baishideng Publishing Group Inc 8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA Telephone: +1-925-2238242 Fax: +1-925-2238243 E-mail: <a href="mailto:editorialoffice@wjgnet.com">editorialoffice@wjgnet.com</a> Help Desk: <a href="http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx">http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a>  <b>PUBLISHER</b> Baishideng Publishing Group Inc 8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA Telephone: +1-925-2238242 Fax: +1-925-2238243 E-mail: <a href="mailto:bpgoffice@wjgnet.com">bpgoffice@wjgnet.com</a> Help Desk: <a href="http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx">http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx</a>	<a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a>  <b>PUBLICATION DATE</b> October 28, 2016  <b>COPYRIGHT</b> © 2016 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this Open-Access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.  <b>SPECIAL STATEMENT</b> All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, and not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.  <b>INSTRUCTIONS TO AUTHORS</b> Full instructions are available online at <a href="http://www.wjgnet.com/bpg/geinfo/204">http://www.wjgnet.com/bpg/geinfo/204</a>  <b>ONLINE SUBMISSION</b> <a href="http://www.wjgnet.com/esps/">http://www.wjgnet.com/esps/</a>

## Basic Study

## Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Adriane Dal Bosco, Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, Brazil

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Mariana do Couto Soares, Adriane Dal Bosco, Norma Possa Marroni, Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Canoas 92425-900, Brazil

Francielli Licks, Graduate Program in Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90050-170, Brazil

**Author contributions:** Colares JR and Marroni NP participated in the study design and development, analysis and interpretation of data and writing of the article; Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC and Bosco AD participated in the oxidative stress and immunohistochemistry analyses and the interpretation of results.

Supported by Research and Event Promotion (FIPE) end accomplished in Hospital de Clínicas de Porto Alegre, No. 14-0474.

**Institutional review board statement:** The study was realized and approved by the Ethics Committee of HCPA (No. 14-0474).

**Institutional animal care and use committee statement:** All collections of biological samples and analyses carried out were in accordance with ethical principles of the Committee for Ethics on Animal Use (CEUA-HCPA [No. 14-0474]).

**Conflict-of-interest statement:** To the best of our knowledge, no conflict of interest exists.

**Data sharing statement:** No additional data are available.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Correspondence to:** Josieli Raskopf Colares, MD, Cellular Biology and Molecular Applied to Health, Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Avenida Farroupilha 8001, Canoas 92425-900, Brazil. [jozy.ma@hotmail.com](mailto:jozy.ma@hotmail.com)  
 Telephone: +55-51-97516065  
 Fax: +55-51-33598760

Received: June 28, 2016

Peer-review started: June 29, 2016

First decision: August 8, 2016

Revised: August 24, 2016

Accepted: September 14, 2016

Article in press: September 14, 2016

Published online: October 28, 2016

### Abstract

#### AIM

To evaluate the effects of melatonin (Mel) on oxidative stress in an experimental model of bile duct ligation (BDL).

#### METHODS

Male Wistar rats ( $n = 32$ , weight  $\pm 300$  g) were

allocated across four groups: CO (sham BDL), BDL (BDL surgery), CO + Mel (sham BDL and Mel administration) and BDL + Mel (BDL surgery and Mel administration). Mel was administered intraperitoneally for 2 wk, starting on postoperative day 15, at a dose of 20 mg/kg.

### RESULTS

Mel was effective at the different standards, re-establishing normal liver enzyme levels, reducing the hepatosomatic and splenosomatic indices, restoring lipoperoxidation and antioxidant enzyme concentrations, reducing fibrosis and inflammation, and thereby reducing liver tissue injury in the treated animals.

### CONCLUSION

The results of this study suggest a protective effect of Mel when administered to rats with secondary biliary cirrhosis induced by BDL.

**Key words:** Antioxidant; Cirrhosis; Fibrosis; Melatonin; Oxidative stress

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Secondary biliary cirrhosis is a late complication of prolonged extrahepatic bile duct obstruction that leads to structural and functional changes in the liver. Melatonin, the main product of the pineal gland, provides hepatic protection in the experimental model of bile duct ligation.

Colares JR, Schemitt EG, Hartmann RM, Licks F, Soares MC, Bosco AD, Marroni NP. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World J Gastroenterol* 2016; 22(40): 8918-8928 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i40/8918.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i40.8918>

## INTRODUCTION

The liver has a complex structure, allowing it to play a key role in operation and maintenance of several vital functions of the organism, including synthesis activity and excretion of substances. In the liver lobes, hepatocytes are arranged in an orderly fashion out from a central vein, forming the sinusoids, from which they are separated by a narrow space (the space of Disse). This space is the site of the hepatic stellate cells (HSCs), which are known to possess contractile and fibrogenic properties, as well as the ability to synthesize extracellular matrix (ECM)<sup>[1-3]</sup>.

Obstruction of the biliary tract is a congestive process that leads to numerous changes, such as ductular proliferation, stellate cell activation, and accumulation of ECM in the space of Disse. Occurrence

of these changes may lead to the development of liver fibrosis, which, in turn, can lead to secondary biliary cirrhosis<sup>[4]</sup>. Cirrhosis of the liver represents the most advanced stage of fibrosis, in which there is evident loss of structure of the hepatic parenchyma. It is directly associated with development of septa and fibrotic nodules, changes in hepatic blood flow, and high risk of liver failure<sup>[5]</sup>.

Studies have shown that HSCs are directly involved in the process of fibrosis formation and that their activation is influenced by products generated from lipid peroxidation (LPO), formation of reactive oxygen species (ROS), and presence of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukins, and nuclear factor-kappa B<sup>[4,6]</sup>.

As cirrhosis constitutes a major public health problem<sup>[7]</sup>, much research is being conducted to develop and test different substances that could be used in its treatment. The objective of such substances aims to improve quality of life, increase survival, slow disease progression, and, possibly, mitigate the damage caused by formation of ROS and free radicals (FRs)<sup>[8,9]</sup>.

Prolonged obstruction of the bile duct in rats is an experimental model for induction of secondary biliary cirrhosis<sup>[10]</sup>. In this model, the characteristic features of the disease are established at approximately 28 d<sup>[10]</sup>. Studies have demonstrated that the changes occurring in cirrhosis in human patients are similar to those found in experimental models, including jaundice, hepatomegaly, splenomegaly, abnormal gas exchange, and oxidative damage<sup>[11-15]</sup>.

Melatonin (Mel; *N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is the main product synthesized by the pineal gland, which produces Mel in a rhythmic manner, with production inhibited by light, so that its peak production occurs during the dark phase<sup>[16,17]</sup>. Several effects have been attributed to Mel, including antioxidant capacity, as well as anti-inflammatory and immunomodulatory properties<sup>[18-21]</sup>.

There is an existing important link between cirrhosis, inflammation and oxidative stress; in this sense, treatments are required to protect the liver against these types of damage. Therefore, this present study investigated whether Mel (an anti-inflammatory agent and antioxidant) would afford hepatic-protection in an experimental model of cirrhosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All animal procedures were conducted in accordance with the recommendations of the Health Research Ethics Committee of the Research and Graduate Studies Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Brazil (approval number 14-0474), and as recommended in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals<sup>[22,23]</sup>. The sample comprised male Wistar rats  $n = 32$ , weight  $\pm 300$  g) that were

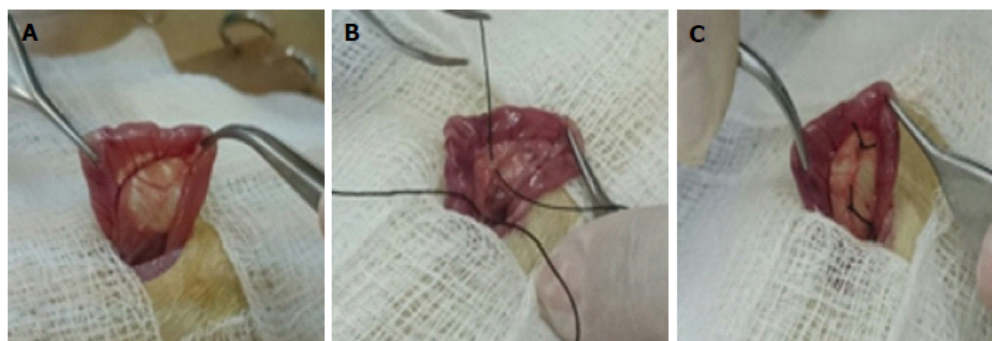


Figure 1 Bile duct ligation surgery. A: Localization of the bile duct; B: Passage of silk thread for duct isolation; C: Resection of the bile duct.

allocated across four groups: CO [sham bile duct ligation (BDL)], BDL (BDL surgery), CO + Mel (sham BDL and Mel administration) and BDL + Mel (BDL surgery and Mel administration). Cirrhosis was induced surgically by BDL as described by Kountouras *et al.*<sup>[10]</sup>.

#### Animal care and use statement

During the experiment, the animals were kept in boxes lined with wood shavings, under a 12-h light/dark cycle and controlled temperature conditions (18–22 °C), with free access to water and chow. As shown in Figure 1A, animals in the CO and CO + Mel groups only underwent localization and manipulation of the bile duct (sham surgery). Figure 1B and C show the procedures performed in the BDL and BDL + Mel groups respectively: after localization of the bile duct, it was isolated and tied off with two knots made with 3-0 silk thread. All animals were euthanized at 29 d after the start of the experiment<sup>[24]</sup>.

#### Administration of Mel

Treatment started on day 15 after BDL surgery. Mel was administered at a dose of 20 mg/kg body weight, always at 7:00 p.m., away from light.

#### Extraction of plasma

After the blood was collected through the retro-orbital plexus and placed in assay tubes with heparin, it was centrifuged at 4000 rpm for 10-min time. The precipitate was displaced and the plasma was removed with pipette (Labsystems 4500, 100–200 µL) for the different analyses of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) *via* commercial kit Labtest®.

#### Liver homogenates

For the preparation of the homogenate we used 9 mL of phosphate buffered solution (1.15% KCl) per gram of tissue (liver) and phenylmethylsulfonyl fluoride at a concentration of 100 mmol/L in isopropanol (10 µL/mL of KCl). The tissue was homogenized in ULTRA-TURRAX for 40 s at 0–2 °C and subsequently centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a refrigerated

centrifuge. The precipitate was discarded and the supernatant removed and frozen at –80 °C for subsequent biochemical analyses<sup>[25]</sup>.

#### Liver enzyme activity

Activity of the liver enzymes AST and ALT, which are markers of hepatocyte integrity, were measured by the ultraviolet kinetic method. AP was measured by the colorimetric method. All tests were performed in plasma, under routine HCPA laboratory methods, using a Liquiform Labs® test commercial kit.

#### Hepatosomatic index and splenosomatic index

The liver and spleen were resected and weighed for derivation of the hepatosomatic index (HSI) and splenosomatic index (SSI), which were calculated as the percentage of total organ (liver and spleen) weight divided by the body weight of the animal: HSI = liver weight (g)/rat weight (g) × 100; SSI = spleen weight (g)/rat weight (g) × 100<sup>[26]</sup>.

#### LPO

Liver tissue samples were placed in test tubes containing a mixture of trichloroacetic acid (TCA) 10% and thiobarbituric acid (TBA) 0.67%, heated at 100 °C in a water bath for 15 min, and cooled on ice for approximately 5 min. TBA reacts with LPO products to form a Schiff base, whereas TCA is used to denature proteins present and acidify the reaction. After cooling the samples, 1.5 mL of n-butyl alcohol was added to extract the formed pigment. Samples were stirred for 45 s and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Finally, the stained product present in the top fraction was read in a spectrophotometer at a wavelength of 535 nm. The TBARS concentration obtained was expressed as nmol/mg protein<sup>[27]</sup>.

#### Activity of antioxidant enzymes and glutathione levels

**Superoxide dismutase:** The activity of superoxide dismutase (SOD) is defined by its ability to inhibit the reaction of superoxide radicals with adrenaline, and was monitored spectrophotometrically at 560 nm. Results were expressed as USOD/mg protein<sup>[28]</sup>.



**Catalase:** The activity of Catalase (CAT) was determined by measuring the decrease in absorption in action medium containing 50 mmol/L phosphate buffered saline (pH 7.2) and 0.3 mol/L hydrogen peroxide. The enzyme activity was assayed spectrophotometrically at 240 nm and expressed as pmol/mg protein<sup>[29]</sup>.

**Glutathione peroxidase:** The activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) was assessed by the NADPH oxidation rate in the presence of reduced glutathione (GSH) and glutathione reductase. Sodium azide was added to inhibit CAT activity. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and expressed as nmol/min/mg protein<sup>[30]</sup>.

**Glutathione S-transferase:** The glutathione S-transferase (GST) activity assay is based on an enzyme reaction which at 30 °C catalyzes the formation of 1 µmol DNP-SG using a GSH concentration of 1 mmol/L and chloro dinitrobenzene (CDNB). The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm and expressed as µmol/min/mg protein<sup>[31]</sup>.

**GSH reduced:** To prepare the homogenate for measuring levels of GSH reduced, for every 1 g of tissue, 20 mL of perchloric acid (2 mmol/L) + EDTA (4 mmol/L) was diluted in 1 mL H<sub>2</sub>O. The levels GSH were evaluated spectrophotometrically at 412 nm by quantifying intracellular levels of GSH from modification of 2-nitrobenzoic acid and expressed as µmol/mg protein<sup>[32]</sup>.

#### Histological analysis

After anatomical dissection of the liver of each animal, approximately 2 cm were removed for histological evaluation. The tissues were isolated and immersed in 10% buffered formalin for 24 h for fixation, followed by histological processing (dehydration in a graded alcohol series of six concentrations, clearing in xylol at two concentrations, and embedding in paraffin at 64 °C). The resulting paraffin blocks were attached to a microtome (Leitz® 1512) and slices of 3 µm thickness were obtained. These specimens were placed in a histological bath at 50 °C. For the staining step, the slides were immersed in vats containing hematoxylin-eosin (HE) and Picrosirius red (5 min in each stain). After the hydration stage, the sample was covered with a coverslip and fixed with Canada Balsam or the blade, finalizing the preparation process. The slides were examined by a pathologist who was blinded to group allocation and were photographed under a NIKON LABOPHOT binocular microscope at 200 × magnification.

#### Immunohistochemistry (iNOS and TNF-α)

For immunohistochemistry, liver tissue samples were fixed in 10% formalin and placed in a histological tissue

processor (ANCAP), through a graded ethanol series and two vats of xylene, for dehydration. Specimens were then embedded and blocks were cooled, modeled, and attached to a microtome (Leitz® 1512) to obtain slices 4 µm thick. The resulting slides were incubated with mouse anti-iNOS (SC-7271; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, United States) and TNF-α polyclonal antibodies (SC-52746; Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:200 overnight at 4° C, followed by incubation with the secondary antibody (SC-2005; Santa Cruz Biotechnology) at 1:300 for 30 min at room temperature. The slides were analyzed by a pathologist who was blinded to group allocation and were photographed under a NIKON LABOPHOT binocular microscope at 200 × magnification. Digital images were analyzed in Image-Pro Plus version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, United States). The expression level was determined by multiplying the average density of the image by the percent area positively stained by the antibodies [brown colored areas obtained by the peroxidase + diaminobenzidine reaction].

#### Ethical consideration

The present study was accomplished in the HCPA with the approval of the project (No. 14-0474).

#### Animal care and use statement

All experimental design, collections of biological samples and analyses carried out were in accordance with ethical principles of the Committee Ethics on Animal Use (CEUA-HCPA).

#### Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean ± SD error. The comparison between groups was performed by one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls procedure. *P* < 0.05 was considered as statistically significant.

## RESULTS

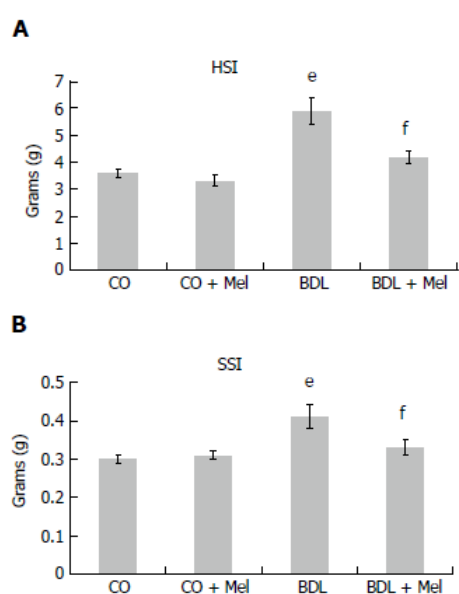
#### Liver enzyme activity

Evaluation of liver enzyme activity performed in plasma showed a significant increase in all enzymes in the BDL group compared with the control groups, as well as a significant reduction of these values in the BDL + Mel group compared to the BDL group. AST levels increased 379% in the BDL group compared to the CO group, and were 72% reduced in the BDL + Mel group compared to the BDL group. ALT, a specific marker of liver damage, was 186% increased in the BDL group in relation to the CO group and 60% lower in the BDL + Mel group compared to the BDL group. AP levels were 211% higher in the BDL group compared to the CO group and 72% lower in the BDL + Mel group compared to the BDL group (*P* < 0.001) (Table 1).

**Table 1 Plasma levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase in the different experimental groups**

Group	AST (U/L)	ALT (U/L)	AP (U/L)
CO	88.8 ± 0.07	37.0 ± 1.9	122.4 ± 13.5
CO + Mel	90.4 ± 8.4	38.8 ± 3.2	111.6 ± 8.1
BDL	425.8 ± 46.6 <sup>e</sup>	105.8 ± 13.5 <sup>e</sup>	381.2 ± 35.5 <sup>e</sup>
BDL + Mel	117.5 ± 18.8 <sup>f</sup>	42.0 ± 3.4 <sup>f</sup>	104.3 ± 11.03 <sup>f</sup>

All concentrations are expressed as mean ± SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (<sup>e</sup>*P* < 0.001). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups (<sup>f</sup>*P* < 0.001). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.



**Figure 2 Mean hepatosomatic and splenosomatic index values in the different experimental groups.** All results are expressed as mean ± SD error. Significant difference existed between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (<sup>e</sup>*P* < 0.001). Significant difference existed between the BDL and BDL + Mel groups (<sup>f</sup>*P* < 0.001). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; HSI: Hepatosomatic index; SSI: Splenosomatic index.

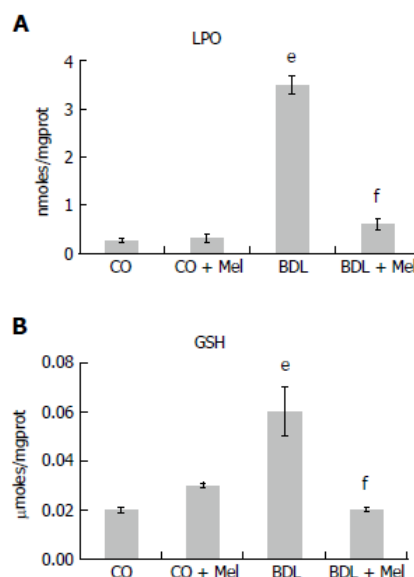
#### HSI and SSI

Analysis of HSI and SSI showed significant increases in the BDL group compared to control animals (CO and CO + Mel), as well as a significant decrease in the BDL + Mel group compared to the cirrhotic group (BDL) (Figure 2A and B).

#### Lip Peroxidation and GSH levels

The evaluation of LPO and GSH levels was performed on homogenized liver.

The LPO analysis revealed a significant increase in LPO markers in the BDL group compared to the CO and CO + Mel groups, and administration of Mel to BDL + Mel animals was associated with a significant decrease in damage in this group. GSH levels were



**Figure 3 Lip Peroxidation markers and glutathione levels in the different experimental groups.** All results are expressed as mean ± SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (<sup>e</sup>*P* < 0.001). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups (<sup>f</sup>*P* < 0.001). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; GSH: Glutathione; LPO: Lipid peroxidation.

increased in the BDL group compared to the control groups (CO and CO + Mel), and reduced in BDL + Mel compared to BDL (Figure 3A and B).

#### Antioxidant enzyme activity

Evaluation of SOD, CAT, GPx and GST activity revealed reductions in SOD and CAT in BDL animals compared to controls (CO and CO + Mel), as well as functional recovery of these enzymes in the BDL + Mel group compared to the BDL group. Activity of GPx and GST were increased in the BDL group compared to both control groups (CO and CO + Mel), and decreased in the BDL + Mel group compared with BDL (Table 2).

#### Histological analysis

**HE staining:** In the control groups (CO and CO + Mel), histological analysis by HE staining revealed normal liver parenchyma with clearly defined hepatocyte cords. In the BDL group, there was tissue disorganization with loss of hepatocyte cords and inflammatory infiltration. In the cirrhotic group treated with Mel (BDL + Mel), restructuring of these patterns was observed, with formation of hepatocyte cords arising from a centrilobular vein (Figure 4).

**Picrosirius staining:** Assessment of liver fibrosis in Picrosirius-stained sections revealed absence of fibrotic septa in the control groups (CO and CO + Mel). In animals subjected to BDL, there was positive labeling consistent with presence of fibrotic septa. However, in



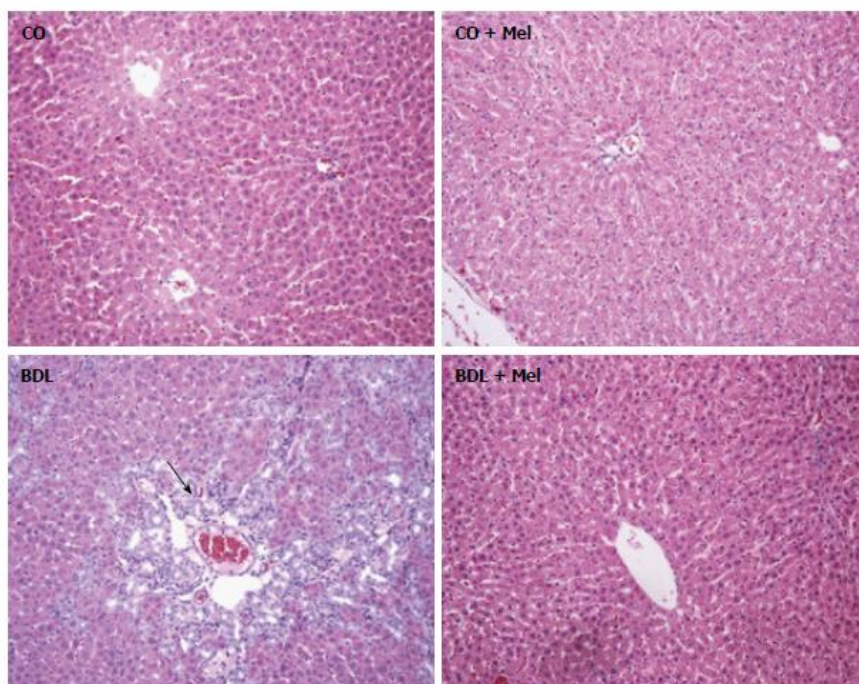


Figure 4 Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups. HE staining, 200 × magnification. The arrow indicates the presence of inflammatory infiltrate. CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.

Table 2 Activity of antioxidant enzymes in the different experimental groups

Groups	SOD (U <sub>SOD</sub> /mg prot)	CAT (pmol/mg prot)	GPx (nmol/min/mg prot)	GST (μmol/min/mg prot)
CO	2.43 ± 0.17	2.19 ± 0.21	6.93 ± 0.76	2.28 ± 0.20
CO + Mel	2.31 ± 0.25	2.21 ± 0.28	7.15 ± 1.05	2.57 ± 0.09
BDL	0.88 ± 0.21 <sup>1</sup>	1.09 ± 0.01 <sup>1</sup>	37.78 ± 2.39 <sup>1</sup>	5.08 ± 0.43 <sup>1</sup>
BDL + Mel	2.47 ± 0.22 <sup>2</sup>	2.46 ± 0.04 <sup>2</sup>	9.61 ± 1.20 <sup>2</sup>	1.93 ± 0.21 <sup>2</sup>

All values are expressed as mean ± SD error. <sup>1</sup>Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) (SOD,  $P < 0.01$ ; CAT,  $P < 0.05$ ; GPx and GST,  $P < 0.001$ ); <sup>2</sup>Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups (SOD and CAT,  $P < 0.01$ ; GPx and GST,  $P < 0.001$ ). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin. SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutathione peroxidase; GST: Glutathione S-transferase.

the BDL + Mel group, fibrosis was minimal (Figure 5).

#### Immunohistochemistry and quantification of iNOS and TNF- $\alpha$

Liver specimens from the BDL group exhibited strong positive staining for iNOS (Figure 6) and TNF- $\alpha$  (Figure 7), whereas specimens from the CO and CO + Mel groups did not stain. Treatment with Mel reduced iNOS and TNF- $\alpha$  positivity. Likewise, iNOS and TNF- $\alpha$  expression was significantly reduced in BDL + Mel compared to the BDL group ( $P < 0.001$ ; Figures 6 and 7).

## DISCUSSION

The BDL model is widely used to reproduce secondary

biliary cirrhosis in animals, as it induces changes that closely resemble those seen in cirrhosis in humans and in experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)<sup>[4,10,12]</sup>.

Liver integrity can be evaluated by measuring levels of the enzymes AST, ALT, and AP. Increases in these markers suggest liver dysfunction<sup>[32]</sup>. In the present study, animals subjected to BDL exhibited higher levels of AST, ALT, and AP than animals in all other groups. Our findings also demonstrated that administration of Mel to animals with cirrhosis induced by BDL reduced the liver damage caused by duct ligation. These results corroborate the findings of a previous study conducted by Bona *et al.*<sup>[4]</sup>, using the CCl<sub>4</sub> model of cirrhosis, in which animals exhibited a significant increase in AST, ALT and AP levels and

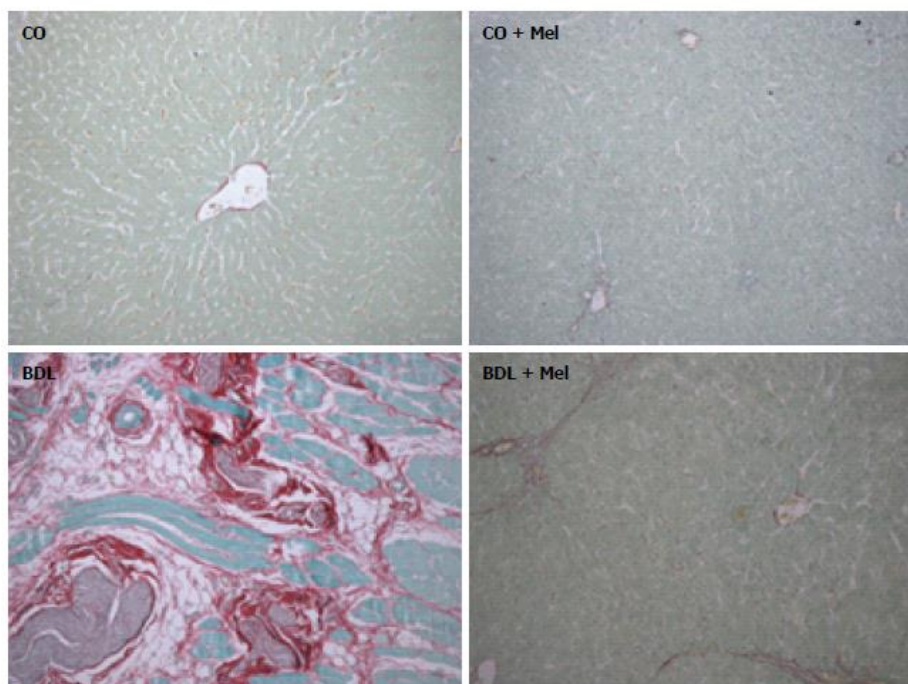


Figure 5 Histological analysis of liver tissue in the different experimental groups. Picrosirius staining, 200 × magnification. CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin.

equally significant reductions of these markers after treatment with the antioxidant quercetin. Shu *et al*<sup>[9]</sup> demonstrated that administration of tanshinone IIA, the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza*, reduced ALT and AST levels in an experimental model of cirrhosis in rats.

The terms hepatomegaly and splenomegaly refer, respectively, to enlargement of the liver and spleen. Hepatomegaly is often associated with hepatobiliary diseases. Splenomegaly, in turn, is associated with numerous chronic diseases of the liver<sup>[33,34,35]</sup>. In our study, both the HSI and SSI were significantly increased in the BDL group compared with both control groups, and both indices decreased to near control levels when administered Mel in the BDL + Mel group.

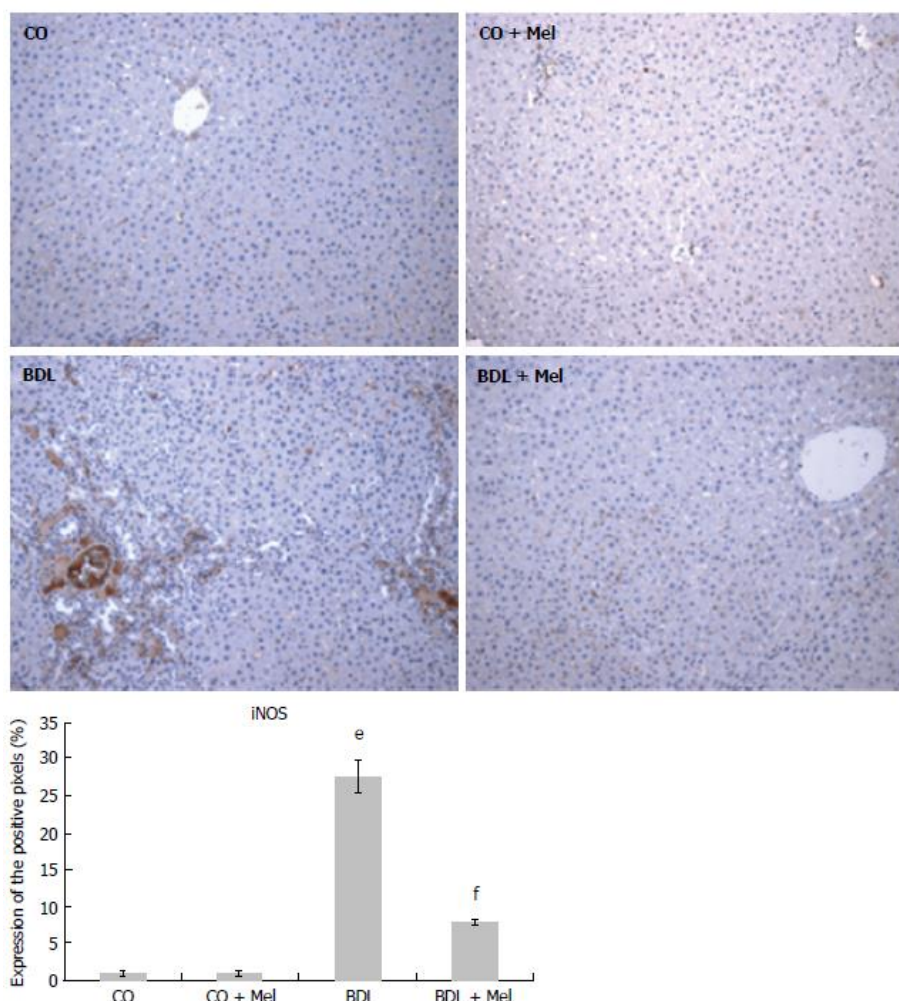
The splenomegaly observed in the BDL model is due to portal hypertension as a result of enlargement of the splenic veins. Hepatomegaly, in turn, is secondary to biliary retention and subsequent obstruction of biliary drainage, which ultimately leads to liver fibrosis<sup>[13,14,36]</sup>. Using a model of liver damage induced by administration of polychlorinated biphenyls, Oliveira *et al*<sup>[33]</sup> found that splenomegaly was minimal in exposed animals given the antioxidant quercetin. LPO causes disorganization of cell membranes, resulting in an increase in membrane permeability and consequent extravasation of enzymes, leading to cell death<sup>[37]</sup>. Studies have demonstrated that MDA levels may be associated with increased LPO<sup>[5]</sup>.

Studies report that, in the pathophysiology of

biliary cirrhosis, liver damage is maximized by the action of FRs<sup>[12]</sup>. This phenomenon was also observed in the present study by measuring LPO, which was significantly higher in the cirrhotic group (BDL) when compared to the other groups and, accordingly, may have been associated with a process of cell membrane damage. Furthermore, the BDL + Mel group exhibited a significant decrease in LPO as compared with the BDL group, which suggests a protective role of Mel against LPO induced by BDL. These data corroborate a previous study by Bona *et al*<sup>[4]</sup> (2012), in which LPO was found to be increased in a model of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis, and quercetin treatment appeared to decrease LPO significantly.

CAT catalyzes the breakdown of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and O<sub>2</sub>. SOD is regarded as the first line of defense against ROS formation, and decreases in its activity could be related to increased LPO and heightened consumption of the enzyme in an attempt to decrease oxidative damage from ROS dismutation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation<sup>[38]</sup>.

In the present study, activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT was significantly decreased in the BDL group compared to all others, and Mel administration was able to restore activity of these enzymes to near-control levels. These data suggest that treatment with Mel attenuated FR formation secondary to liver damage resulting from BDL-induced cirrhosis. These data corroborate the findings of Bona *et al*<sup>[4]</sup> (2012), a study in which rats with CCl<sub>4</sub>-induced



**Figure 6** Expression of inducible nitric oxide synthase in the different experimental groups. Magnification 200 ×. All values are expressed as mean ± SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ( $P < 0.001$ ). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups ( $P < 0.001$ ). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; iNOS: Inducible nitric oxide synthase.

cirrhosis exhibited an increase in antioxidant enzymes after treatment with quercetin.

Levels of the other enzymes evaluated (GPx and GST), as well as of GSH, were increased in the BDL group compared to the other groups, and decreased significantly to near-control values in the BDL + Mel group. The increases observed in cirrhotic animals may be associated with enzyme activation in an attempt to clear FRs and minimize oxidative damage from the disease, while the reduction in these levels in the group administered Mel suggests decreased FR formation<sup>[39]</sup>. These data corroborate the findings of Amália *et al.*<sup>[38]</sup>, who observed that, in a model of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis, GPx, GST and GSH levels were increased, and treatment with quercetin appeared to decrease these values.

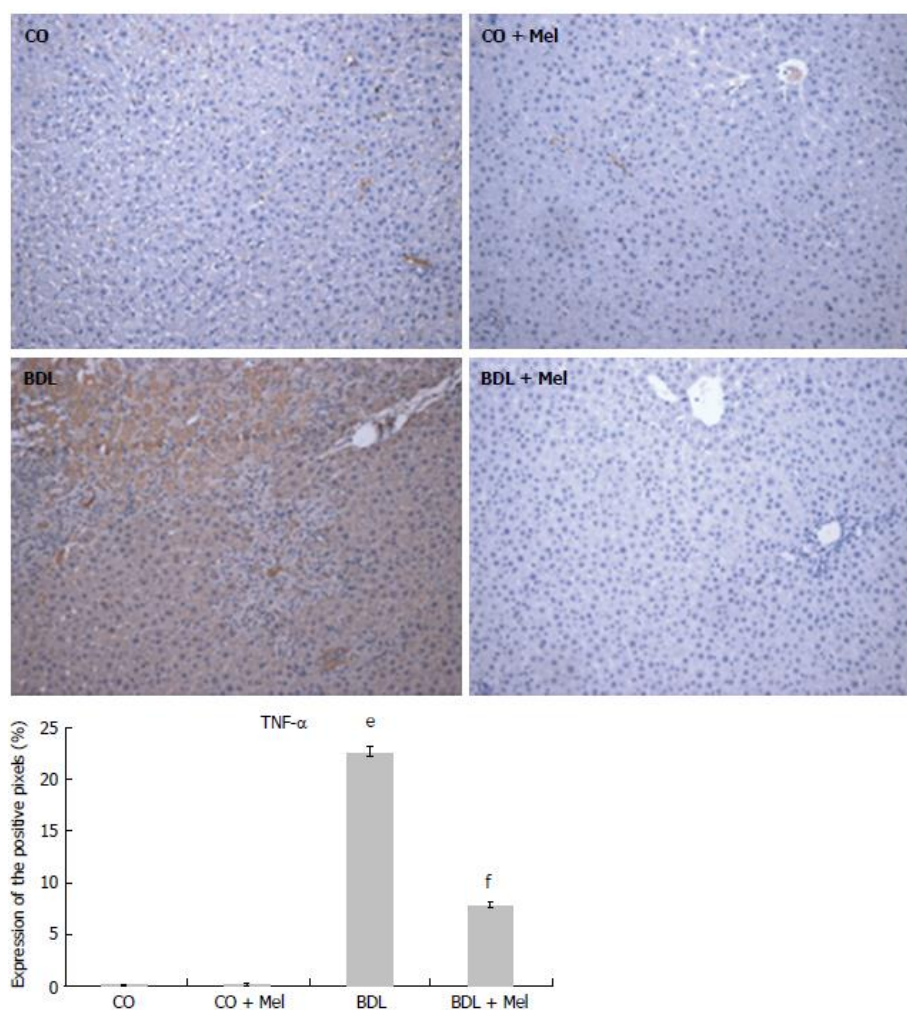
Changes in the hepatic parenchyma, as well as formation of fibrotic septa and necrosis, are often

associated with the cirrhotic process<sup>[4]</sup>. In our study, we observed loss of tissue organization in the BDL group when assessed by HE staining, demonstrating cellular disorganization with loss of hepatocyte cords and presence of inflammatory infiltrate. In the BDL + Mel group, a restructuring effect was observed, with tissue organization resembling that seen in the CO and CO + Mel groups.

Ferrari *et al.*<sup>[40]</sup> demonstrated that rats with cirrhosis, whether induced by BDL or by CCl<sub>4</sub>, exhibit necrosis, fibrotic nodules, inflammatory infiltrate and cellular changes. Tieppo *et al.*<sup>[14]</sup> also observed that rats subjected to BDL exhibit hepatic changes with ductular proliferation and fibrosis, findings that improved in cirrhotic rats treated with quercetin.

Fibrosis is the end result of long-term liver injury. Evaluation of fibrotic area in Picrosirius-stained slides revealed increased collagen deposition in the BDL group,

Colares JR *et al.* Action of melatonin in a BDL model



**Figure 7** Expression of tumor necrosis factor in the different experimental groups. Magnification 200  $\times$ . All values are expressed as mean  $\pm$  SD error. Significant difference exists between the BDL and control groups (CO and CO + Mel) ( $P < 0.001$ ). Significant difference exists between the BDL and BDL + Mel groups ( $P < 0.001$ ). CO: Control; CO + Mel: Control + melatonin; BDL: Bile duct ligation; BDL + Mel: Bile duct ligation + melatonin; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor-alpha.

in contrast to the BDL + Mel animals, in which collagen deposition was minimal. These data corroborate various studies which observed increased collagen deposition in the liver of rats with cirrhosis induced by  $\text{CCl}_4$  and BDL<sup>[4,14]</sup>. Saleh *et al*<sup>[41]</sup> administered the natural marine compound *Sepia officinalis*, known for its major antioxidant, antibacterial and antitumor effects, and observed a reduction in collagen deposition in animals subjected to bile duct ligation.

Increased production of TNF- $\alpha$  and iNOS is related to acute and chronic inflammatory processes. In the present study, we found higher TNF- $\alpha$  and iNOS expression in animals subjected to BDL, as well as decreased expression of these parameters in animals administered Mel. These findings corroborate those of Gonçalves Schemitt *et al*<sup>[42]</sup>, who observed lower expression of TNF- $\alpha$  and iNOS in animals treated with glutamine in an experimental model of fulminant

hepatic failure.

In view of the evidence presented herein, we suggest that the antioxidant and anti-inflammatory effects of Mel acted to restore serum levels of liver enzymes and the HSI and SSI, decrease LPO, restore antioxidant enzymes, and attenuate collagen deposition, inflammation and tissue damage in the livers of animals subjected to BDL. However, other pathways of Mel action should be studied to elucidate the protective mechanisms involved in this experimental model.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Coordination for the Higher-Level Personnel (CAPES), the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), the National Council of Research Development (CNPq),

the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA) for their support.

## COMMENTS

### Background

Liver cirrhosis is characterized by the appearance of septa and fibrotic nodules. Bile duct ligation (BDL) in rats is an effective experimental model of secondary biliary cirrhosis induction. Melatonin (Mel) has proven to be a potent antioxidant in different experimental models.

### Research frontiers

Experiments previous studies have proved that Mel presents itself as a potent antioxidant in different experimental models.

### Innovations and breakthroughs

This is the first study evaluating the antioxidant capacity of Mel in a surgical model of secondary biliary cirrhosis, in order to evaluate its possible therapeutic efficacy.

### Applications

Despite the secondary biliary cirrhosis affect, a significant number of patients, still do not have an effective treatment. These data indicate that Mel administration may be a target for further study and suggest its applicability for patients in order to better support the life of the same.

### Terminology

*N*-acetyl-5-methoxytryptamine, a physiologic hormone synthesized in a rhythmic manner by the pineal gland and with production inhibited by light. Exogenous administration has been related to its antioxidant capacity, and anti-inflammatory and immunomodulatory properties.

### Peer-review

This manuscript is a good research article. The study is interesting and appropriate because it provides novel information about the beneficial effects of Mel on a model of cirrhosis. The authors studied the antioxidant and anti-inflammatory effects of a treatment with the indoleamine and evaluated the possible reversion of the structural changes induced in the liver by BDL.

## REFERENCES

- Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999: 428-433
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250 [PMID: 10644669 DOI: 10.1074/jbc.275.4.2247]
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
- 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 [PMID: 22577570 DOI: 10.5402/2012/762920]
- Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53 [PMID: 12591185 DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00429-4]
- Guimarães EL, Franceschi MF, Grivicich I, Dal-Pizzol F, Moreira JC, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Guma FC. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2006; 26: 477-485 [PMID: 16629652 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01245.x]
- Sherlock S. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1984; 4: 25S-28S [PMID: 6420307]
- Zhang Y, He Y, Yu H, Ma F, Wu J, Zhang X. Liquiritigenin Protects Rats from Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Injury through PGC-1 $\alpha$  Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 649568 [PMID: 26199636 DOI: 10.1155/2015/649568]
- Shu M, Hu XR, Hung ZA, Huang DD, Zhang S. Effects of tanshinone IIA on fibrosis in a rat model of cirrhosis through heme oxygenase-1, inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Mol Med Rep* 2016; 13: 3036-3042 [PMID: 26936326 DOI: 10.3892/mmr.2016.4886]
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 305-311 [PMID: 6743531]
- Chang SW, Ohara N. Increased pulmonary vascular permeability in rats with biliary cirrhosis: role of thromboxane A $_2$ . *Am J Physiol* 1993; 264: L245-L252 [PMID: 8460713]
- Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arg Gastroenterol* 2005; 42: 244-248 [PMID: 16444380 DOI: 10.1590/S0004-28032005000400010]
- Vercelino R, Tieppo J, Dias AS, Marroni CA, Garcia E, Meurer L, Picada JN, Marroni NP. N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102: 370-376 [PMID: 18341514 DOI: 10.1111/j.1742-7843.2007.00181.x]
- 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: 1339-1346 [PMID: 19494027 DOI: 10.3945/jn.109.105353]
- Silveira KC, Viau CM, Colares JR, Saffi J, Marroni NP, Porawski M. Cirrhosis induces apoptosis in renal tissue through intracellular oxidative stress. *Arg Gastroenterol* 2015; 52: 65-71 [PMID: 26017086 DOI: 10.1590/S0004-28032015000100014]
- Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World J Diabetes* 2011; 2: 82-91 [PMID: 21860691 DOI: 10.4239/wjcd.v2.i6.82]
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrpineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 2997-3025 [PMID: 24554058 DOI: 10.1007/s00018-014-1579-2]
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 376-386 [PMID: 11268363]
- 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 [PMID: 16217132 DOI: 10.1385/ENDO:27:2:189]
- Neto JAS, de Castro BF. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. *Rev Bras Neurol* 2008; 44: 5-11
- Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arg Gastroenterol* 2010; 47: 72-78 [PMID: 20520979 DOI: 10.1590/S0004-28032010000100013]
- Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. 2 ed. Porto Alegre: HCPA; 1997
- Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C.: The national academies press; 2011
- Grigorov I, Bogoević D, Jovanović S, Petrović A, Ivanović-Matić S, Zolotarevski L, Poznanović G, Martinović V. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2014; 70: 441-450 [PMID: 24604251 DOI: 10.1007/s13105-014-0322-7]
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; 71: 241-249 [PMID: 3861023]
- Lizama MAP, Takemoto RM, Ranzani-Paiva MJT, Ranzani-Paiva MJT, da Silva Ayroza LM, Pavanelli GC. Relação parasitohospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado



Colares JR *et al.* Action of melatonin in a BDL model

- de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Acta Sci Biol Sci* 2007; 29: 223-231 [DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v29i2.594]
- 27 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310 [PMID: 672633]
- 28 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 [PMID: 4623845]
- 29 Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134: 707-716 [PMID: 4749271]
- 30 Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121 [PMID: 6727659]
- 31 Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymol* 1981; 77: 231-235 [PMID: 7329301]
- 32 Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888 [PMID: 13967893]
- 33 Oliveira CR, Ceolin J, de Oliveira RR, Schemitt EG, Colares JR, Bauermann LF, Costabeber IH, Morgan-Martins MI, Mauriz JL, da Silva J, Reyes JM, Marroni NP. Efecto de La quercetina sobre La lesión hepática inducida por bifenilos policlorados en ratas. *Nutr Hosp* 2014; 29: 1141-1148
- 34 Vera-Méndez FJ, Trujillo-Santos AJ, Cano-Sánchez A, Delgado-Romero B. [Toxicity and causes of change of antiretroviral regimen among immigrant patients with HIV infection]. *Rev Clin Esp* 2011; 211: 66-67 [PMID: 21183167 DOI: 10.1016/j.rce.2010.06.008]
- 35 Vargas VP, Hurtado MR, Villalobos AJA. Esplenomegalia. *Rev Fac Med* 2013; 56: 37-45
- 36 Yaari A, Sikuler E, Keynan A, Ben-Zvi Z. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J Hepatol* 1992; 15: 67-72 [PMID: 1506659]
- 37 Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 419-425 [PMID: 9214578 DOI: 10.1016/S0891-5849(97)00101-9]
- 38 Amália PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2616-2621 [PMID: 17431769 DOI: 10.1007/s10620-007-9748-x]
- 39 Ferreira ICFR, Abreu RMV. Stress oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* 2007; 2: 32-39
- 40 Ferrari RS, Tieppo M, Rosa DP, Forgiarini Jr LA, Dias AS, Marroni NP. Lung and liver changes due to the induction of cirrhosis in two experimental models. *Arq Gastroenterol* 2013; 50: 208-213 [PMID: 24322193 DOI: 10.1590/S0004-28032013000200037]
- 41 Saleh H, Soliman AM, Mohamed AS, Marie MA. Antioxidant Effect of Sepia Ink Extract on Extrahepatic Cholestasis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Biomed Environ Sci* 2015; 28: 582-594 [PMID: 26383596 DOI: 10.3967/bes2015.082]
- 42 Gonçalves Schemitt E, Raskopf Colares J, Minuzzo Hartmann R, Morgan-Martins MI, Marroni CA, Tuñón MJ, Possa Marroni N. Efecto de la glutamina en el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de rata con insuficiencia hepática fulminante. *Nutr Hosp* 2016; 33: 92 [PMID: 27238775 DOI: 10.20960/nh.92]

P- Reviewer: Chen WX, Maarman G, Vega-Naredo I S- Editor: Qi Y  
L- Editor: Filipodia E- Editor: Zhang FF





Published by Baishideng Publishing Group Inc  
8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA  
Telephone: +1-925-223-8242  
Fax: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1007-9327



Carta convite de aceite de publicação do artigo intitulado: "ALTERAÇÃO DO SISTEMA CARDIOPULMONAR EM PACIENTES CIRROTICOS", onde fui uma das autoras e que está como anexo 2 desta tese.

De: **Revista Brasileira de Medicina do Esporte RBME** <[noreply.ojs@scielo.org](mailto:noreply.ojs@scielo.org)>

Data: 8 de março de 2017 17:34

Assunto: [RBME] Decisão editorial - Aceito

Para: Dra Adriane Dal Bosco <[adriane.bosco@metodistadosul.edu.br](mailto:adriane.bosco@metodistadosul.edu.br)>

Prezado(a) Doutor(a) Adriane Dal Bosco,

Informamos a V.Sa. a conclusão da avaliação do manuscrito " ALTERAÇÃO DO SISTEMA CARDIOPULMONAR EM PACIENTES CIRROTICOS" foi aprovado para publicação na Revista Brasileira de Medicina do Esporte.

Agradecemos sua colaboração e se for de seu interesse, para consulta ao seu artigo após a publicação, acesse no site da SciELO

[www.scielo.br/rbme](http://www.scielo.br/rbme).

Colocamo-nos à disposição para suas observações.

Atenciosamente

Revista Brasileira de Medicina do Esporte RBME

[atharbme@uol.com.br](mailto:atharbme@uol.com.br)

Ana Carolina de Assis / Arthur T. Assis

Atha Comunicação e Editora

Tel/Fax:55-11-5579-5308

Revista Brasileira de Medicina do Esporte

<http://submission.scielo.br/index.php/rbme>

**ARTIGO ORIGINAL****ALTERAÇÃO DO SISTEMA CARDIOPULMONAR EM PACIENTES CIRRÓTICOS****CHANGE CARDIOPULMONARY SYSTEM IN CIRRHOTIC PATIENTS****CAMBIO DEL SISTEMA CARDIOPULMONAR EN PACIENTES CIRRÓTICOS****AUTORES**

**Rodrigo Casales da Silva Vieira** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Fisioterapeuta. Porto Alegre – RS, Brasil.

**Mario Reis Álvares-da-Silva** - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, médico. Porto Alegre, RS – Brasil.

**Álvaro Reischak de Oliveira** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, educador físico. Porto Alegre, RS – Brasil.

**Julia da Silveira Gross** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, educadora física. Porto Alegre, RS – Brasil.

**Renata Lopes Kruger** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, educadora física. Porto Alegre, RS, Brasil.

**Adriane Dal Bosco** - Centro Universitário Metodista – IPA, fisioterapeuta. Porto Alegre, RS – Brasil

**Norma Anair Possa Marroni** – Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Bióloga. Porto Alegre, RS – Brasil

**Luiz Alberto Forgiarini Junior** - Centro Universitário Metodista – IPA,  
Fisioterapeuta. Porto Alegre, RS – Brasil

**Alexandre Simões Dias** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS,  
fisioterapeuta. Porto Alegre, RS – Brasil.

**Autor correspondente:**

**Rodrigo Casales da Silva Vieira** - Universidade Federal do Rio Grande do SUL –  
UFRGS. Endereço: Rua General João Telles, 347, complemento 201, Bom Fim  
90035-121, Porto Alegre – RS. Fone: 55(51) 9377-1812. Email:  
[rodrigocasales@bol.com.br](mailto:rodrigocasales@bol.com.br); [rodrigocasales@hotmail.com](mailto:rodrigocasales@hotmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** A cirrose gera alterações nas trocas gasosas e a desnutrição proteico-calórica em pacientes hepatopatas. **Objetivo:** avaliar e comparar as variáveis cardiopulmonares, a força do aperto de mão (FAM) e a composição corporal entre pacientes cirróticos e indivíduos saudáveis e correlacionar o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2MAX}$ ) com a FAM em pacientes cirróticos pelo vírus da hepatite C.

**Materiais e métodos:** Esta pesquisa se caracteriza como um estudo de caso-controle composto por 36 participantes (18 pacientes cirróticos com HCV e 18 indivíduos hígidos) de ambos os sexos, maiores de 18 anos. A força de preensão palmar foi mensurada por dinamometria através de um dinamômetro mecânico de empunhadura com alça ajustável. As variáveis ventilatórias foram avaliadas através da ergoespirometria de com teste de carga progressiva em cicloergômetro. A composição corporal foi mensurada por um mesmo técnico em cineantropometria nível II. Foram utilizados os testes T – Independente e Mann-Whitney para comparação entre os grupos e a Correlação de Spearman para associação entre as variáveis.

**Resultados:** Foram encontradas diferenças para o consumo máximo de oxigênio (16,20 (11,60 - 18,55) Mediana e intervalo Interquartil) x 19,90 (16,27 - 26,85), ventilação 45,40 (36,45- 54,20) x 63,40 (50,40- 78,00), produção de dióxido de carbono 785,88 (655,81 - 963,14) x 988,04 (826,93 - 1546,21), a frequência cardíaca máxima ( $127,66 \pm 23,26$  média e  $\pm DP$ ) x ( $146,29 \pm 23,31$ ), 1º limiar ventilatório ( $10,700 \pm 3,19$ ) x ( $14,912 \pm 4,45$ ) e o 2º limiar ventilatório ( $14,16 \pm 4,48$ ) x ( $18,25 \pm 5,54$ ) entre cirróticos e controles respectivamente. Encontramos correlação positiva moderada entre o consumo máximo de oxigênio e a força do aperto de mão ( $r=0,474$ ,  $p=0,047$ ) **Conclusão:** Existe alteração nas variáveis cardioplumonares e há associação entre o  $VO_{2MAX}$  e a FAM em pacientes cirróticos pelo vírus da hepatite C.

**Palavras-Chave:** força do aperto de mão, cirrose, variáveis ventilatórias

## INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é o estágio final comum de uma série de processos patológicos hepáticos de diversas causas como a infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C <sup>1</sup>.

Uma das complicações da cirrose é a desnutrição protéico-calórica, um achado frequente em pacientes com hepatopatia avançada <sup>2,3</sup>. Atualmente, existem alguns métodos de avaliação nutricional como a avaliação antropométrica, que abrange a mensuração de medidas como peso, altura, índice de massa corporal (IMC) e dobras cutâneas <sup>4</sup>. A antropometria permite que se avalie a composição corporal que é a capacidade do ser humano em realizar qualquer tipo de esforço tendo relação com a maior ou a menor presença dos seus tecidos corporais fundamentais <sup>5</sup>.

Outras complicações oriundas da cirrose são a diminuição da pressão parcial de oxigênio arterial ( $PaO_2$ ) e na relação de oxigênio com a hemoglobina ( $SatO_2/Hb$ ) e o aumento na pressão parcial de gás carbônico ( $PaCO_2$ ) que ocorrem devido as alterações nas trocas gasosas entre o tecido pulmonar e o tecido sanguíneo <sup>6</sup>.

A associação entre doença hepática e anormalidades e sintomas pulmonares são comuns em pacientes hepatopatas crônicos e têm sido reconhecidas há mais de 100 anos. Entretanto, somente nos últimos quinze anos alterações vasculares pulmonares específicas associadas com a presença de doença hepática têm sido submetidas a maiores investigações <sup>7</sup>.

A doença hepática associada às alterações pulmonares causa um grande impacto nutricional, pois o fígado realiza inúmeras reações bioquímicas, como

produção, modificação e utilização de nutrientes e substâncias metabolicamente importantes para o organismo<sup>8</sup>.

O objetivo do estudo foi avaliar e comparar as variáveis ventilatórias, a força do aperto de mão e a composição corporal entre pacientes cirróticos pelo vírus da hepatite C e indivíduos saudáveis e correlacionar a força do aperto de mão com o consumo máximo de oxigênio em pacientes cirróticos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo caracteriza-se como um estudo de caso-controle em que foram avaliados 36 participantes (18 pacientes cirróticos e 18 indivíduos saudáveis). Os grupos foram pareados através do sexo e da idade.

*Tamanho da amostra:* Foi obtido a partir do estudo de Galant (2010), que investigou a capacidade funcional de indivíduos com cirrose através do teste de caminhada de seis minutos<sup>6</sup>.

*Critérios de inclusão:* Os pacientes deveriam ter o diagnóstico clínico de cirrose hepática compensada com etiologia viral C (VHC) e estar em acompanhamento clínico no Ambulatório de Hepatites Crônicas do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA.

*Critérios de exclusão:* Foram excluídos indivíduos que apresentassem outras causas de doença hepática, varizes esofágicas grau 3 e 4, anemia, coinfeção com outros vírus, insuficiência renal crônica, dispnéia em repouso e ou que fossem usuários de drogas lícitas e ou ilícitas.

*Perdas amostrais:* Indivíduos de ambos os grupos que apresentassem alterações nos sinais vitais antes ou durante a realização dos testes propostos.



*Procedimentos éticos:* Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HCPA e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem avaliados.

*Avaliações:* Os participantes selecionados foram submetidos à avaliação da composição corporal, da força do aperto de mão e do teste de esforço máximo cardiopulmonar.

*Composição corporal:* Foi mensurada por um mesmo técnico em cineantropometria nível II da *International Society for the Advancement of Kineanthropometry* (ISAK), utilizando procedimentos estabelecidos pela própria instituição<sup>10</sup>. As marcações dos locais e a técnica de tomada das dobras cutâneas seguiram os padrões da Sociedade Internacional para o Avanço da Cineantropometria (ISAK). As mensurações de estatura, massa corporal, comprimentos, diâmetros, perímetros e dobras cutâneas permitiram que a massa total fosse fracionada em cinco componentes (massa muscular, massa adiposa, massa residual, massa óssea e massa epitelial), o que proporcionou uma descrição e comparação detalhada da composição corporal dos participantes<sup>10</sup>.

*Força do aperto de mão (FAM):* Foi verificada através do dinamômetro mecânico de empunhadura com alça ajustável do tipo *Baseline Smedley Spring-Type Hand Dynamometer* (New York, USA). O valor obtido foi a média das 3 aferições da mão não dominante, as quais não deveriam diferir 10% entre as mensurações<sup>11</sup>.

*Teste de esforço máximo cardiopulmonar:* Foi mensurado através de um sistema de ergoespirometria de circuito aberto por analisador de gases (MGC, modelo CPX/D). Os testes de carga progressiva, em cicloergômetro (The Bike, Cibex, USA), foram realizados segundo protocolo em rampa. A intensidade inicial

estabelecida foi de 25W, com aumento de 25W a cada dois minutos ( $25W \cdot \text{min}^{-2}$ ), mantendo uma cadência entre 70 e 80 rotações por minuto (rpm)<sup>12</sup>. Os participantes informaram sobre a taxa de percepção subjetiva de esforço a cada aumento de intensidade e foram verbalmente estimulados para que realizassem esforço máximo durante o teste que teve duração de 8-12 minutos de acordo com as recomendações do *American College of Sports Medicine* (ACSM) e foi encerrado quando os participantes atingiram um dos seguintes critérios: pico e/ou platô no consumo de oxigênio; Frequência cardíaca  $\geq$  predita para idade; Valor de taxa de troca respiratória  $> 1,15$ ; percepção subjetiva de esforço  $> 18$  ou quando o participante voluntariamente interrompeu o teste<sup>13-14</sup>. No dia do teste os indivíduos foram instruídos a estarem alimentados, porém com intervalo de 2 horas da última refeição para evitar desconfortos ou náuseas.

Foram verificadas através do teste cardiopulmonar as seguintes variáveis ventilatórias: consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2\text{max}}$ ), produção de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ), limiares ventilatórios 1 e 2 (LV1absoluto – LV2 absoluto), ventilação (VE) e frequência cardíaca máxima ( $FC_{\text{max}}$ ).

A determinação dos limiares ventilatórios e do  $VO_{2\text{pico}}$  obedeceu os seguintes critérios:

- LV<sub>1</sub> foi considerado como a mínima carga em que  $VE/VO_2$  apresentou um aumento sistemático sem um aumento concomitante de  $VE/VCO_2$ .
- LV<sub>2</sub> foi considerado como a mínima carga em que  $VE/VO_2$  apresentou um aumento concomitante com  $VE/VCO_2$ .
- Caso nenhum dos critérios acima estabelecesse o LV<sub>2</sub>, um aumento não linear do RER foi utilizado

- O  $VO_{2max}$  foi considerado como a intensidade mínima em que os valores de  $VO_2$  atingissem um platô e/ou pico. Um platô foi considerado como uma variação inferior a  $1,5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  mesmo com incrementos subseqüentes da intensidade do exercício.

*Análise estatística:* Foi desenvolvida no software SPSS 18.0, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e poder de 80%. Para testar a distribuição dos dados foi utilizado o teste de normalidade Shapiro Wilk. As variáveis qualitativas foram descritas em proporção e porcentagem respectivamente. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste Qui-Quadrado. As variáveis quantitativas foram descritas em média e desvio padrão e mediana e intervalo interquartil. A comparação entre os dois grupos foi realizada pelos Testes T – Independente e Mann-Withney. Para correlação das variáveis foi utilizado o teste de Correlação de Spearman.

## RESULTADOS

As características antropométricas dos participantes estão descritas na tabela 1. Observaram-se resultados semelhantes nos dois grupos quanto a idade, gênero, peso, altura e índice de massa corporal (IMC) não havendo diferenças estatísticas entre os participantes.

Foram encontradas diferenças entre os grupos no teste ergoespirométrico para o  $VO_{2max}$ , VE,  $VCO_2$ , LV1absoluto, LV2 absoluto e  $FC_{MAX}$ . Os dados estão descritos na tabela 2.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos para a composição corporal nos seus cinco componentes (massa adiposa, massa muscular, massa residual, massa óssea e massa epitelial). Os dados estão expressos na tabela 3.

Quanto à FAM não houve diferenças estatísticas entre cirróticos ( $1,89 \pm 0,90$  média e  $\pm DP$ ) e controles ( $2,46 \pm 0,116$ ), ( $p=1,183$ ). Contudo, obtivemos uma correlação positiva moderada entre o  $VO_{2max}$  e a FAM ( $r=0,474$ ,  $p=0,047$ ), como pode ser visto na figura 1.

## DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram que as variáveis ergoespirométricas  $VO_{2max}$ , VE,  $VCO_2$ , LV1absoluto, LV2 absoluto e  $FC_{MAX}$  apresentaram-se alteradas no grupo cirrótico em relação ao grupo controle (tabela 2). Jones et al. (2012) descreveram em sua revisão sistemática que a maioria dos estudos que avaliaram a capacidade aeróbia em cirróticos, sob o teste cardiopulmonar de esforço máximo, mensuraram, apenas, o  $VO_{2pico}$  verificando importante redução nessa variável. Um estudo verificou que 8 pacientes com cirrose compensada apresentaram uma redução de 82% no  $VO_{2pico}$  considerando-se o sexo e a idade. Outro estudo encontrou uma redução de 60% a 78% no  $VO_{2pico}$  em comparação a indivíduos saudáveis. Poucos estudos, no entanto, avaliaram o metabolismo anairóbico durante o exercício. Todos eles sugerem que o metabolismo anairóbio ocorra mais cedo nos cirróticos quando comparado à indivíduos saudáveis indo ao encontro dos resultados encontrados em nosso estudo<sup>15</sup>.

A força do aperto de mão e a composição corporal não foram diferentes estatisticamente entre os grupos (tabela 3). Contudo, os valores encontrados no grupo cirrótico para a FAM foram inferiores aos encontrados no grupo controle sugerindo que os cirróticos estavam piorando sua condição muscular e nutricional em virtude da patologia. A força do aperto de mão é útil nessa população, pois

identifica os pacientes mais propensos a desenvolver complicações da cirrose, uma vez que reflete mudanças que ocorrem em grupos musculares mais nobres, como o diafragma<sup>11</sup>. Além disso, é o método que identifica os pacientes mais propensos à desnutrição. Nunes et al. (2012) avaliaram a força do aperto de mão em indivíduos com cirrose pelo vírus C classificados em seu grau de severidade como Child-Pilg A e concluíram que a FAM foi o método que mais identificou desnutrição nesses pacientes se comparado com outros métodos como a antropometria<sup>16</sup>. Todavia, são necessários mais estudos que comprovem que o estado nutricional de pacientes com cirrose seja refletido pelo músculo<sup>11</sup>.

Em nosso estudo, associamos um método de avaliação nutricional (antropometria) com um método de avaliação funcional (FAM). Nunes et al. (2012) relataram que não há um método de avaliação nutricional considerado padrão áureo em pacientes cirróticos, sugerindo o uso combinado de métodos de avaliação nutricional associados com métodos funcionais na avaliação de indivíduos com cirrose<sup>16</sup>. Além disso, a má nutrição energética proteica é um achado comum nos pacientes com cirrose hepática de etiologia etanólica, mas o valor prognóstico do metabolismo energético nos cirróticos de etiologia viral ainda não é bem estabelecido<sup>17</sup>.

A relação existente entre a força do aperto de mão e o  $VO_{2max}$  em indivíduos cirróticos encontrada em nosso estudo (figura 1) pode ser explicada pelas alterações encontradas na vasodilatação desses indivíduos interferindo na vasoconstrição arteriolar causando desvio do fluxo sanguíneo dos tecidos não ativos para os músculos esqueléticos em exercício, limitando a extração de  $O_2$  que é verificada em praticamente todos os pacientes com cirrose hepática cujo a magnitude desse prejuízo aumenta com a progressão da doença<sup>18,19</sup>.

O presente estudo teve como limitações a ausência de mensuração do tratamento medicamentoso para o VHC e sobre a presença de comorbidades como diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial sistêmica, uma vez que o  $VO_{2MAX}$  possui associação com sexo, idade, presença de doenças e uso de medicações em pacientes hepatopatas<sup>20,21</sup>.

Sugere-se que, em futuros estudos, seja avaliado o sistema neuromuscular em conjunto com o sistema cardiorrespiratório verificando-se o grau de ativação neuromuscular e a produção de força em pacientes cirróticos por vírus C. Existem poucos dados sobre a capacidade de geração de força em cirróticos, os estudos existentes avaliam a força através da mensuração do torque isocinético e isométrico. Sabe-se que a força muscular nesses doentes apresenta-se reduzida em diferentes grupos musculares em relação a indivíduos saudáveis<sup>22</sup>.

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que existem alterações no consumo máximo de oxigênio, na produção de dióxido de carbono, na ventilação e nos limiares ventilatórios de cirróticos em relação a indivíduos saudáveis e que há uma associação entre a força do aperto de mão e o consumo máximo de oxigênio em pacientes com cirrose hepática pelo vírus da hepatite C.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Schuppan D, Afdhal NH. Liver Cirrhosis. *Lancet*. 2008; 371(9615): 838–51.
- 2- Peng S, Plank LD, McCall JL, Gillanders LK, McIlroy K, Gane EJ. Body composition, muscle function, and energy expenditure in patients with liver cirrhosis: a comprehensive study. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85(5):1257-66.
- 3- Tsiaousi ET, Hatzitolios AI, Trygonis SK, Savopoulos CG. Malnutrition in end stage liver disease: recommendations and nutritional support. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23(4):527-33.
- 4- Ritter L, Gazzola J. Avaliação nutricional no paciente cirrótico: uma abordagem objetiva, subjetiva ou multicompartmental? *Arq Gastroenterol*. 2006; 43(1): 66-70.
- 5- Ross WD, Kerr DA. Fraccionamiento de la masa corporal: un nuevo método para utilizar en nutrición clínica y medicina deportiva. *Apunts Med Esport*. 1993; 18:175-87.
- 6- Marroni NP, Morgan-Martins MI, Porawski M. Radicais Livres No Processo Saúde-Doença: da bancada à clínica. Curitiba:CRV; 2012.
- 7- Rodriguez-Roisin R, Augusti A, Roca J, The Hepatopulmonary Syndrome: new name, old complexities. *Thorax*. 1992; 47(11): 897-902.
- 8- Maio R, Dichi JB, Burini SC. Conseqüências nutricionais das alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. *Arq Gastroenterol*. 2000; 37(1):52-7.
- 9- Galant L H, Ferrari R, Forgiarini Junior L A, Monteiro MB, Marroni CA, Dias AS. Relationship between meld severity score and the distance walked and

respiratory muscle strength in candidates for liver transplantation. *Transplant Proc.* 2010; 42(5): 1729-30.

- 10- Mafell-Jones M, Olds T, Stewart A, Carter L. International standards for anthropometric assessment. Potchefstroom (South Africa): ISAK, 2006.
- 11- Álvares-da-silva MR, Silveira TR. Comparison between handgrip strength, subjective global assessment and prognostic nutritional index in assessing malnutrition and predicting clinical outcome in cirrhotic outpatients. *Nutrition.* 2005; 21(2): 113–17.
- 12- American College of Sports Medicine. Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 7nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
- 13- Wasserman K, Mcilroy MB. Detecting the Threshold of Anaerobic Metabolism in Cardiac Patients during Exercise. *Am J Cardiol.* 1964;14: 844-52.
- 14- Dekerle J, Baron B, Dupont L, Vanvelcenaher J, Pelayo P. Maximal lactate steady state, respiratory compensation threshold and critical power. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 89(3-4):281-8.
- 15- Jones JC, Coombes JS, Macdonal G. A., Exercise Capacity and Muscle Strength in Patients With Cirrhosis. *Liver Transpl.* 2012; 18(2): 146-51.
- 16- Nunes FF, Fernandes SA, Bertolini CM, Rabito EI, Gottschall CBA. Avaliação nutricional do paciente cirrótico: comparação entre diversos métodos. *Sci Med.* 2012; 22(1):12-17.



- 17- Tajika M, Kato M, Mohri H, Miwa Y, Kato T, Ohnishi H, Moriwaki H. Prognostic value of energy metabolism in patients with viral liver cirrhosis. *Nutrition*. 2002; 18(3): 229-34.
- 18- Epstein SK, Ciubotaru RL, Zilberberg MD, Kaplan LM, Jacoby C, Freeman R, Kaplan MM. Analysis of impaired exercise capacity in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 1998; 43(8):1701-07.
- 19- Lemyze M, Dharancy S, Nevière R, Pruvot FR, Declerck N, Wallaert B. Aerobic capacity in patients with chronic liver disease: Very modest effect of liver transplantation. *Presse Med*. 2010; 39(7-8): e174-81.
- 20- Arena R, Myers J, Guazzi M. The clinical importance of cardiopulmonary exercise testing and aerobic training in patients with heart failure. *Braz J Phys Ther*. 2008; 12(2):75-87.
- 21- Braga AMFW, Rondon MUPB, Negrão CE, Wajngarten M. Predictive value of ventilatory and metabolic variables for risk of death in patients with cardiac failure. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 86 (6): 451-8.
- 22- Periyalwar P, Dasarathy S. Malnutrition in cirrhosis: contribution and consequences of sarcopenia on metabolic and clinical responses. *Clin Liver Dis*. 2012;16(1):95-131.

**Tabela 1.** Características antropométricas dos pacientes cirróticos e dos indivíduos hígidos.

<b>Características</b>	<b>Cirróticos (n=18)</b>	<b>Controles (n=18)</b>	<b>p</b>
Idade (anos)	55,61 ± 8,31	55,22 ± 8,85	0,893
Genêro (M/F)	8 (44,4%) / 10 (55,6%)	8 (44,4%) / 10 (55,6%)	1,000
Peso (Kg)	66,50 (57,62 - 73,10)	70,90 (63,85 - 75,62)	0,229
Altura (cm)	157,45 (153,75 - 166,68)	163,30(154,75 - 169,63)	0,261
IMC (Kg\cm <sup>2</sup> )	26,04 (21,98 - 28,77)	25,32 (24,13 - 26,70)	0,975

M/F - masculino/feminino. Kg – quilograma. cm – centímetros. Kg\cm<sup>2</sup> – quilograma por centímetro quadrado. Dados descritos em média e desvio padrão, proporção e porcentagem e mediana e intervalo interquartil (P<sub>25</sub> – P<sub>75</sub>). p – nível de significância (≤ 0,05).

**Tabela 2.** Diferença entre os grupos (cirrótico e controle) para os dados ergoespirométricos.

<b>Variáveis</b>	<b>Cirróticos (n=18)</b>	<b>Controles (n=18)</b>	<b>p</b>
VO <sub>2max</sub> (ml/Kg <sup>-1</sup> /min <sup>-1</sup> )	16,20 (11,60 - 18,55)	19,90(16,27 - 26,85)	0,007*
VE (L/min)	45,40 (36,45- 54,20)	63,40 (50,40- 78,00)	0,004*
VCO <sub>2</sub> (ml/min)	785,88 (655,81 - 963,14)	988,04 (826,93 - 1546,21)	0,010*
L1 absoluto (ml/Kg <sup>-1</sup> /min <sup>-1</sup> )	10,70 ± 3,19	14,91 ± 4,45	0,004*
L2 absoluto (ml/Kg <sup>-1</sup> /min <sup>-1</sup> )	14,16 ± 4,48	18,25 ± 5,54	0,024*
FC <sub>Max</sub> (bpm)	127,66 ± 23,26	146,29 ± 23,31	0,031*

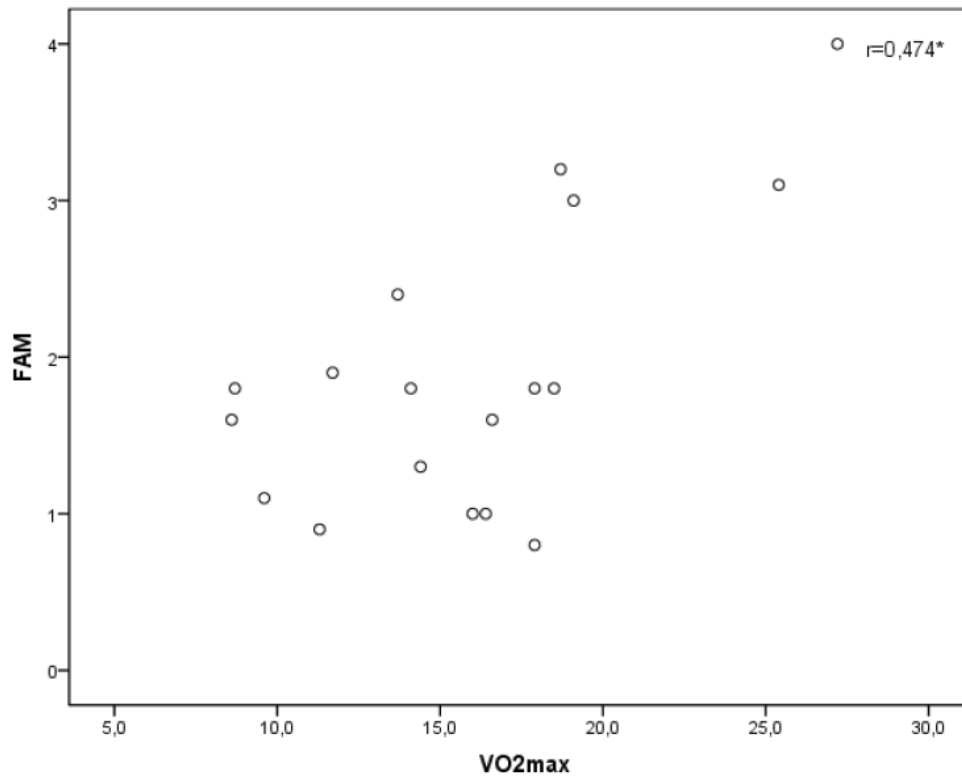
consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2max</sub>), produção de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), limiares ventilatórios 1 e 2 (LV1absoluto – LV2 absoluto), ventilação (VE), frequência cardíaca máxima (FC<sub>max</sub>). ml/Kg/min – mililitro por quilograma por minuto. L/min – litro por minuto. bpm – batimentos por minuto. Dados descritos em mediana e intervalo interquartil (P<sub>25</sub> – P<sub>75</sub>) e em média e desvio padrão. p – nível de significância (≤ 0,05). \* - diferença estatística entre os grupos.

**Tabela 3.** Comparação entre os grupos para composição corporal (massa adiposa, massa muscular, massa residual, massa óssea e massa epitelial).

<b>Variáveis</b>	<b>Cirróticos (n=18)</b>	<b>Controles (n=18)</b>	<b>p</b>
massa adiposa (%)	37,75 ±9,52	37,31 ±5,32	0,867
massa muscular (%)	34,14 ±8,94	36,59 ±5,33	0,324
massa residual (%)	10,96 ±2,32	10,75 ±1,21	0,728
massa óssea (%)	9,85 (9,100 - 11,075)	10,700 (9,950 - 11,300)	0,342
massa epitelial (%)	5,00 (4,47 - 5,47)	4,90 (4,70 - 5,12)	0,623

(%) – porcentagem. Dados descritos em média e desvio padrão e mediana e intervalo interquartil (P<sub>25</sub> – P<sub>75</sub>). p – nível de significancia (≤ 0,05).

**Figura 1.** Relação entre a força do aperto de mão (FAM) e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ).



## 10.2 Certificados de Resumos enviados para eventos





Promoção

São Paulo, 30 de setembro a 03 de outubro de 2015



*Edison Roberto Parise*

**Edison Roberto Parise**  
Presidente do Congresso

*Edna Strauss*

**Edna Strauss**  
Presidente da Comissão Científica

Apoio





### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **Adriane Dal Bosco** é autor (a) do capítulo intitulado “**Fisioterapia respiratória na pessoa idosa**” do livro “**Tratado de Fisioterapia Geriátrica**”, que se encontra em processo de estruturação e revisão pela editora Rúbio.

Porto Alegre, 19 de Julho de 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ângelo José Gonçalves Bós'.

**Ângelo José Gonçalves Bós**  
**Professor Adjunto do PPG em Gerontologia Biomédica - IGG PUCRS**  
**Organizador do livro Tratado de Fisioterapia Geriátrica**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Patrícia Morsch'.

**Patrícia Morsch**  
**Fisioterapeuta, doutoranda do PPG em Gerontologia Biomédica - IGG PUCRS**  
**Organizadora do livro Tratado de Fisioterapia Geriátrica**



**35ª Semana Científica do HCPA**  
*Ciência e assistência: conhecimento transformando realidades*  
De 28 de setembro a 2 de outubro de 2015

## Certificado

Certificamos que o trabalho **EFEITO ANTIOXIDANTE DA MELATONINA SOBRE O TECIDO PULMONAR NO MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME HEPATOPULMONAR INDUZIDO PELA LIGADURA DE DUCTO BILIAR** dos autores

***Adriane Dal Bosco, Filipe Boeira Schedler, Mariana do Couto Soares, Josieli Raskopf Colares, Elizângela Gonçalves Schemitt, Renata Minuzzo Hartmann, Francieli Licks, Silvia Bona, Alexandre Simões Dias, Norma Possa Marroni***

foi apresentado na Sessão de Pôsteres da **35ª Semana Científica do HCPA**, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 28 de setembro a 2 de outubro de 2015.

  
Prof. Eduardo Zandovill Passos  
Coordenador de GPPG

  
Prof. Amarillo Vieira de Macedo Neto  
Presidente do Hospital de Clínicas

Promoção

  
HOSPITAL DE CLÍNICAS  
PORTO ALEGRE, RS

  
GPPG  
Grupo de Pesquisa  
e Pós-graduação

  
UFRGS  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL