

DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO NO JEJUNO PROXIMAL DE RATOS PORTADORES DE CÂNCER E ADMINISTRADOS COM MELATONINA 10 MG/KG

Pamella Oliveira Fardin¹ (PIC/UEM), Fabiana Galvão da Motta Lima¹ (Coorientadora)
Jacqueline Nelisis Zanoni¹ (Orientador). E-mail: jnzanoni@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá–PR¹

Área e subárea do conhecimento: Bioquímica; Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: método de griess; inflamação; antioxidante.

RESUMO

A carcinogênese está associada à inflamação crônica e ao estresse oxidativo, processos nos quais o óxido nítrico atua como um importante mediador. A melatonina, uma molécula com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, é muito estudada por seu potencial protetor. Esse estudo teve como objetivo dosar os níveis de óxido nítrico no jejuno proximal de ratos em um modelo experimental de câncer e avaliar a influência da administração de melatonina nesse parâmetro. Para isso, 28 ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: controle (C), controle administrado com melatonina 10 mg/kg (CM), câncer (A), câncer administrados com melatonina 10 mg/kg (AM). O modelo tumoral foi induzido pela inoculação subcutânea de células de carcinoma pulmonar (linhagem A549) e a melatonina (10 mg/kg) foi administrada diariamente por gavagem. Os níveis de óxido nítrico no jejuno foram quantificados indiretamente pelo método de Griess. Os resultados não demonstraram alterações significativas nos níveis de óxido nítrico (NO) entre os grupos. Conclui-se que o método de Griess não possuiu especificidade suficiente para detectar possíveis variações na concentração de óxido nítrico, sendo necessária a utilização de técnicas complementares para melhor elucidação do metabolismo do óxido nítrico nesse modelo experimental.

INTRODUÇÃO

O câncer é causado por alterações na estrutura genética das células, conhecidas como mutações, podendo resultar em crescimento descontrolado e transformação maligna (INCA, 2022). A carcinogênese é associada a inflamação crônica e estresse oxidativo sistêmico, condições que favorecem a progressão tumoral (Ginovyan et al., 2024). Um mediador inflamatório importante é o óxido nítrico, o qual é produzido pela via enzimática (isoformas iNOS, eNOS e nNOS), podendo ser detectadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Western Blotting, entre outros métodos. Além disso, pode ser formado a partir da via dos nitratos orgânicos, em condições neutras ou pouco ácidas mantém-se em

estabilidade, mas em condições muito básicas podem sofrer hidrólise, formando nitrato, ou então sofrer β -eliminação formando o nitrito.

O uso de antioxidantes tem destaque na literatura em estudos com modelos de câncer. A melatonina, um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, desempenha diversos papéis biológicos, incluindo a regulação dos ritmos circadianos e a modulação do sistema imunológico. Estudos indicam que a melatonina possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, que podem ajudar a reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, fatores que contribuem para a progressão do câncer (Reiter, et al., 2017; Zhang et al., 2019). Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da melatonina sobre os níveis de óxido nítrico no jejuno proximal de ratos em modelo experimental de câncer, contribuindo para o entendimento de seu potencial protetor frente às alterações associadas ao câncer.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos com animais seguiram as normas do CONCEA e CEUA/UEM (protocolo 6607180723). Foram usados 28 ratos machos Wistar (200–230 g), alojados em caixas de polipropileno com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo água e ração *ad libitum* por 14 dias.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

C	Animais controle
CM	Animais controle administrados com melatonina 10 mg/kg
A	Animais inoculados com carcinoma pulmonar de células não-pequenas (CPCNP)
AM	Animais inoculados com CPCNP administrados com melatonina 10mg/kg

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais.

O modelo de carcinoma foi induzido por inoculação subcutânea de 1×10^7 células A549 em PBS (0,5 mL) no flanco direito. A melatonina foi administrada por gavagem diariamente (10 mg/kg) em solução com 0,5% etanol em NaCl 0,9%; controles receberam somente o veículo. Ao final do experimento, os animais foram pesados, anestesiados (quetamina 80 mg/kg + xilazina 10 mg/kg, i.p.), submetidos a punção cardíaca, e em seguida coleta do jejuno proximal. O tecido foi lavado em PBS + inibidor de protease, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C .

Em triplicata e à temperatura ambiente, 50 μL do homogenato foram pipetados em microplacas de 96 poços, aos quais se adicionou o reagente de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água). As leituras foram realizadas em um leitor de placas a 550 nm, e as

concentrações calculadas com base em curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em μM , na forma de média $\pm$ erro padrão, e analisados nos softwares Statistica 8.1 e GraphPad Prism 8.0, aplicando-se pós-teste de Fisher, considerando-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess não detectou mudanças significativas entre os grupos experimentais (fig. 1). Essa reação é consolidada como método de detecção indireto para óxido nítrico, onde é dosada a quantidade de nitrito em uma amostra, produto da oxidação do NO. Esse método permite a quantificação de óxido nítrico na proporção de 1:1. Apesar de muito utilizado como método de avaliação para a via dos nitratos orgânicos, o método de Griess apresenta limitações por não diferenciar o NO que é proveniente da via enzimática daquele proveniente dos nitratos orgânicos, além de relativa baixa sensibilidade devido à natureza instável do radical NO. A literatura demonstra alterações na concentração de óxido nítrico em estudos com modelos experimentais de câncer (Vicentini et al., 2017), o que vai na contramão do resultado apresentado. O trabalho de Vicentini et al. utiliza técnica de quimioluminescência, aumentando a sensibilidade e facilita a avaliação de radicais instáveis em meios fisiológicos. Em nosso trabalho, no entanto, devido à limitação da técnica, a falta de mudanças na concentração de NO entre os grupos estudados não necessariamente reflete o estado do animal, havendo a necessidade de mais técnicas para complementação.

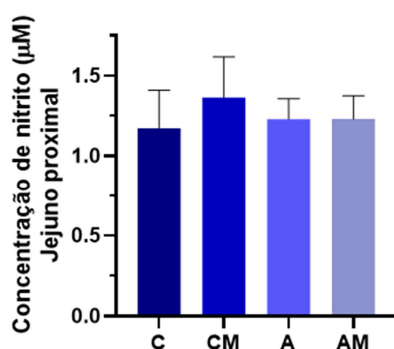


Figura 1 – Dosagem de óxido nítrico pelo método de Griess. Grupos experimentais: ratos controle (C), ratos controle administrados com melatonina 10 mg/kg (CM), ratos inoculados com CPCNP (AM) e ratos inoculados com CPCNP administrados com melatonina 10 mg/kg (AM). $n=7$

CONCLUSÕES

O método de Griess não foi capaz de detectar alterações na concentração de óxido nítrico causadas pelo desenvolvimento do câncer e/ou a administração de melatonina 10 mg/kg pois apresenta limitações de especificidade, sendo necessário a utilização de métodos complementares para melhor elucidação do metabolismo do óxido nítrico nesse modelo experimental.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro concedido ao Projeto Melatonina.

REFERÊNCIAS

GINOVYAN, M.; JAVRUSHYAN, H.; HOVHANNISYAN, S. *et al.* 5-fluorouracil and Rumex obtusifolius extract combination trigger A549 cancer cell apoptosis: uncovering PI3K/Akt inhibition by *in vitro* and *in silico* approaches. *Scientific Reports*, v. 14, p. 14676, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65816-5>. Acesso em: 9 set. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). O que é câncer? Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sobre-o-cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 1 ago. 2025.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; TAN, D. X.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; QIN, L.; YANG, S. F.; XU, K. Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 843, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/843>. Acesso em: 9 set. 2025.

VICENTINI, G. E. *et al.* Does L-glutamine-supplemented diet extenuate NO-mediated damage on myenteric plexus of Walker 256 tumor-bearing rats? *Food Research International*, v. 101, p. 24-34, 1 nov. 2017.

ZHANG, H. M.; ZHANG, Y.; MELATONIN, R. J. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research*, v. 66, n. 1, e12547, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12547>. Acesso em: 9 set. 2025.