

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E DANÇA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO
HUMANO
TESE DE DOUTORADO

ALINE FELICIO BUENO INGRASSIA

**ANÁLISE DA PROTEÍNA QUINASE FOSFORILADA (P-AKT) E DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF- κ B) NO QUADRICEPS DE RATOS
COM CIRROSE INDUZIDA PELO MODELO DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR
SUBMETIDOS A UM TREINAMENTO DE EXERCÍCIO FÍSICO**

Porto Alegre

2023

Aline Felicio Bueno Ingrassia

Análise da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar submetidos a um treinamento de exercício físico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências do Movimento Humano.

Orientador: Alexandre Simões Dias

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Centro de Pesquisa Experimental
Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação
Rua Ramiro Barcelos, 2350– Porto Alegre – RS
CEP: 90035-903.
Contato: alinefeliciobueno@gmail.com

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Felicio Bueno Ingrassia, Aline
Análise da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar submetidos a um treinamento de exercício físico / Aline Felicio Bueno Ingrassia. -- 2023.
38 f.
Orientador: Alexandre Simões Dias.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Cirrose hepática. 2. Modelo experimental animal. 3. Marcadores inflamatórios. 4. Tecido muscular. 5. Exercício físico . I. Simões Dias, Alexandre, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aline Felicio Bueno Ingrassia

Análise da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar submetidos a um treinamento de exercício físico

Conceito final:

Aprovado em dede.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Cangeri Di Naso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luiz Alberto Forgiarini Júnior – Universidade La Salle

Prof. Dr. Daniel Pfeifer Campani – Centro Universitário Metodista

Orientador – Prof. Dr. Alexandre Simões Dias – UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao final de quatro anos, gostaria de mencionar aqui as pessoas que tornaram este trabalho possível. Cada qual com sua contribuição, me ajudaram a transformar um objetivo em realidade.

Aos meus pais, José e Helena, pela rede de apoio e pelos momentos em que substituíram a minha presença para minha filha pequena poder se sentir apreciada, mesmo na minha ausência, e ao meu irmão, Jocemar Bueno. Obrigada por sempre me mostrarem o valor do estudo e do trabalho.

Ao meu esposo, Bruno, pela paciência, pelo apoio incondicional e pelas inúmeras palavras de sabedoria que já me dedicou, tudo isso tornou possível que eu não desistisse, mesmo quando eu não estava mais me encontrando na vida profissional. Obrigada por sempre estar ao meu lado, pelo amor e pela confiança que deposita em mim.

À minha filha, pela doçura e amor, sempre alegre e risonha. Obrigada por me incentivar e inspirar diariamente a ser um ser humano melhor.

Às minhas colegas de trabalho, Sandielly Benitez e Elizangela Schemitt, sem vocês este trabalho não teria nascido, se desenvolvido e se concluído com tanto suporte. Obrigada por todas as mensagens trocadas, pelas horas de áudio no WhatsApp, pelos encontros marcados para me ensinarem as metodologias e discutirmos meus dados. Vocês são exemplo de profissionais que sempre me guiei, e eu admiro muito vocês como as pessoas maravilhosas que são.

À Professora Norma Marroni, pela orientação em diversos momentos dentro destes 4 anos, uma pessoa que admirei desde o dia que conheci, que transborda brilho e energia e ensina com amor aquilo que sabe e faz. Obrigada por ser um exemplo de dedicação e pelo teu constante incentivo à pesquisa e à ciência.

Por fim, mas não menos importante, ao meu orientador, por me estender a mão, há 9 anos atrás, desde a iniciação científica, passando pelo TCC e pelo mestrado, por sempre ter confiado em mim, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos abraços e por todas as vezes em que disse que iria ficar tudo bem. Mesmo sendo tua aluna sempre me senti colocada ao teu lado, para aprender a trilhar passos como os teus, por todo o respeito com que sempre me tratou.

Aos meus amigos, familiares e tantos outros colegas, mesmo que não traga o nome de vocês aqui, trago em meu coração. Obrigada por todo o apoio de sempre!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, Bruno, pelo apoio incondicional e por nunca ter me deixado desistir dos meus objetivos.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

Análise da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar submetidos a um treinamento de exercício físico

RESUMO

Introdução: As doenças hepáticas representam um problema de saúde pública, e podem causar alterações no tecido muscular. Entender o mecanismo pode fornecer uma base para intervenções terapêuticas, como o exercício físico. O modelo experimental de cirrose biliar secundária em ratos consiste na ligadura do ducto biliar (LDB), que estabelece as características da doença em 28 dias. Objetivo: analisar os marcadores Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida por LDB que realizaram exercício. Métodos: estudo de análise de material biológico armazenado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram utilizadas lâminas do quadriceps de ratos Wistar, que realizaram natação três vezes por semana por análise de imunohistoquímica, divididos em quatro grupos de seis animais cada um: grupo controle (CO), grupo controle + exercício (CO+EX), grupo ligadura do ducto biliar (LDB) e grupo ligadura do ducto biliar + exercício (LDB+EX). A média dos grupos foi obtida através da contagem de pixels de três fotos (lâminas), pelo software Adobe Photoshop®, e comparadas por meio do teste de Student-Newman. Resultados: Para o marcador P-AKT foi encontrada diferença significativa entre os grupos LDB x LDB+EX respectivamente ($46,817 \pm 5481$ e 183340 ± 5280 , $p < 0,001$). Já para o NF-κB foi encontrada diferença entre os grupos respectivamente, LDB x LDB+EX (71997 ± 5869 e 62570 ± 2749 , $p < 0,05$). Conclusão: O NF-κB, marcador pró-inflamatório, foi encontrado em maior quantidade nos animais cirróticos em comparação aos que realizaram exercício. A P-AKT, fator responsável pelo crescimento celular, síntese de proteína e metabolismo da glicose, foi maior no grupo LDB+EX em comparação com o grupo LDB. Assim, o exercício pode ser um fator protetor contra os danos da doença hepática no tecido muscular.

Palavras-chave: Fígado, exercício, inflamação; NF-Kappa B; proteína quinase.

Analysis of Phosphorylated Protein Kinase (P-AKT) and Nuclear Transcription Factor kappa B (NF-κB) in the quadriceps of rats with cirrhosis induced by the model of bile duct ligation submitted to physical exercise training

ABSTRACT

Introduction: Liver diseases represent a public health problem, and can cause changes in muscle tissue. Understanding the mechanism can provide a basis for therapeutic interventions, such as physical exercise. The experimental model of secondary biliary cirrhosis in rats consists of ligation of the bile duct (LDB), which establishes the characteristics of the disease in 28 days. Objective: to analyze the Protein Phosphorylated Kinase (P-AKT) and Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) markers in the quadriceps of rats with cirrhosis induced by LDB that performed exercise. Methods: biological material analysis study stored at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Slides from the quadriceps of Wistar rats were used, which performed swimming three times a week by immunohistochemical analysis, divided into four groups of six animals each: control group (CO), control + exercise group (CO+EX), group bile duct ligation (LDB) and bile duct ligation + exercise group (LDB+EX). The average of the groups was obtained by counting the pixels of three photos (slides), using Adobe Photoshop® software, and compared using the Student-Newman test. Results: For the P-AKT marker, a significant difference was found between the groups LDB x LDB+EX respectively (46.817 ± 5481 and 183340 ± 5280 , $p < 0.001$). As for NF-κB, a difference was found between the groups, respectively, LDB x LDB+EX (71997 ± 5869 and 62570 ± 2749 , $p < 0.05$). Conclusion: NF-κB, a pro-inflammatory marker, was found in greater amounts in cirrhotic animals compared to those that performed exercise. P-AKT, a factor responsible for cell growth, protein synthesis and glucose metabolism, was higher in the LDB+EX group compared to the LDB group. Thus, exercise may be a protective factor against liver disease damage to muscle tissue.

Keywords: Liver, exercise, inflammation; NF-kappa B; protein kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista anterior do fígado Fonte: Netter, 2015.	15
Figura 2. Arquitetura dos sinusoides hepáticos. Fonte: Adaptado de Friedman, 2003.....	16
Figura 3. Cirurgia de Ligadura de Ducto Biliar	25
Figura 4: Ilustração do programa de treinamento aeróbio de natação	26
Figura 5. Marcação do anticorpo p-AKT no grupo LDB+EX.....	27
Figura 6. Marcação do anticorpo NF-kB no grupo LDB.....	28

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação das médias de P-AKT entre os grupos.....	29
Gráfico 2. Comparação das médias de NF-kB entre os grupos.....	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCAAs – Aminoácidos de cadeia ramificadas;

CAAs - Células apresentadoras de antígenos;

CEH - Células estreladas hepáticas;

cm - centímetros;

CO - Grupo Controle;

CO + EX - Grupo Controle + Exercício;

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

DBCA - DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS;

DEP- Desnutrição Energético-Proteica;

DHGNA - Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica;

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2;

DNA - Ácido desoxiribonucleico;

DRP1 - Proteína Relacionada à Dinamina 1;

GSK-3 β - Glicogênio Sintase Quinase-3;

Grupo LDB - Grupo ligadura do ducto biliar;

h - hora;

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio;

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1;

IL-1 β - Interleucina 1 β ;

IL-6 - Interleucina 6;

IL10 - Interleucina 10;

INF- α - Interferon alfa;

i.p - intraperitoneal;

IRS-1 - Receptor de Insulina 1;

JNK - Quinases N-terminais c-Jun;

kg - Kilograma;

LDB - Ligadura do Ducto Biliar;

LDB + EX - Grupo ligadura do ducto biliar + exercício;

LPS - Lipopolissacarídeos;

mg - miligrama;

MEC - Matriz Extra Celular;

mTOR - Alvo Mamífero da Rapamicina;

MuRF1 - Ubiquitina Ligase E3;

NEFA - Ácidos Graxos Livres Não Esterificados;

NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B;

NO - Óxido Nítrico;

P-AKT - Proteína Quinase Fosforilada;

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase;

PBS - Tampão fosfato-salino;

RNA - Ácido ribonucleico;

RHD - Homologia Rel N-terminal;

rpm - rotações por minuto;

STAT3 - Sinal e Ativador de Transcrição 3;

TGF-β - Fator de Transformação do Crescimento Beta;

TLR4 - Receptor Toll-like 4;

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa;

ULBRA - Universidade Luterana do Brasil;

°C - graus celsius;

% - porcentagem;

μm - micrometros.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
3 ARTIGO ORIGINAL	21
Análise da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB) no quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar submetidos a um treinamento de exercício físico.	
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
5 ANEXO 1 Carta de Aprovação da CEUA-HCPA	37
6 ANEXO 2 - Carta de Aprovação da CEUA-ULBRA.....	38

1 INTRODUÇÃO

O fígado é o maior órgão do interior do corpo humano e pode pesar em média até 1.400 gramas e medir de 2 a 15 cm no plano coronal e 15 a 20 cm no plano transversal. A principal função do fígado é atuar na digestão através da síntese e secreção de sais biliares, porém este órgão desempenha as funções metabólicas mais importantes do organismo como síntese de proteínas e de outras moléculas, metabolismo de carboidratos e lipídios, armazenamento de ferro e vitaminas, degradação de hormônios, além de atuar na inativação e excreção de drogas e toxinas^{1,2}.

O fígado é um órgão lobar, dividido em 4 partes, dois lobos maiores e dois lobos menores. Os lobos direito e esquerdo, sendo o primeiro maior que o segundo, são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. (Figura 1). Na face inferior do lobo direito, a fissura transversa ou hilar, região onde penetram no parênquima hepático, os ramos da veia porta, da artéria hepática e os ductos biliares, delimita dois pequenos lobos, um anterior, conhecido como lobo quadrado e outro posterior, o lobo caudado ou de Spiegel³.

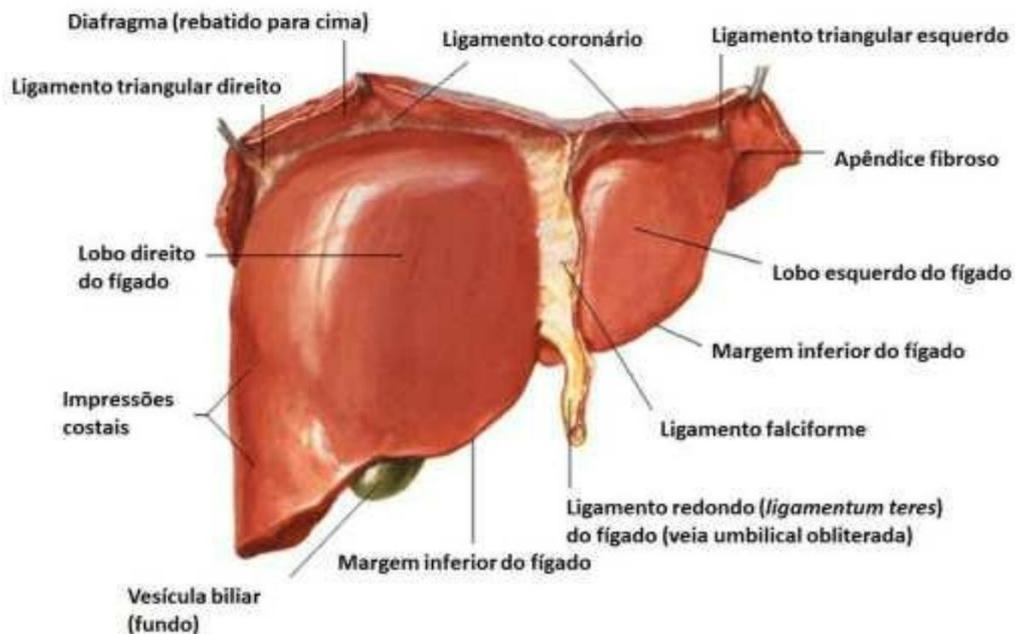


Figura 1. Vista anterior do fígado. Fonte: Netter, 2015⁴.

Microscopicamente é possível observar os lóbulos hepáticos como parte do parênquima hepático. Nesta região, encontram-se os sinusóides, que correspondem a pequenos vasos sanguíneos (5 a 10 μm) que controlam a passagem de componentes do plasma para o espaço sinusoidal, onde se encontram os hepatócitos. Essas

estrutura são formadas por capilares compostos de dois tipos celulares: células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e os macrófagos que no fígado são denominados como células de Kupffer⁵. Na região conhecida como espaço de Disse, encontram-se as células estreladas hepáticas (CEHs) que atuam no armazenamento da vitamina A e desempenham funções imunológicas como a apresentação de antígenos^{6,7} (figura 2).

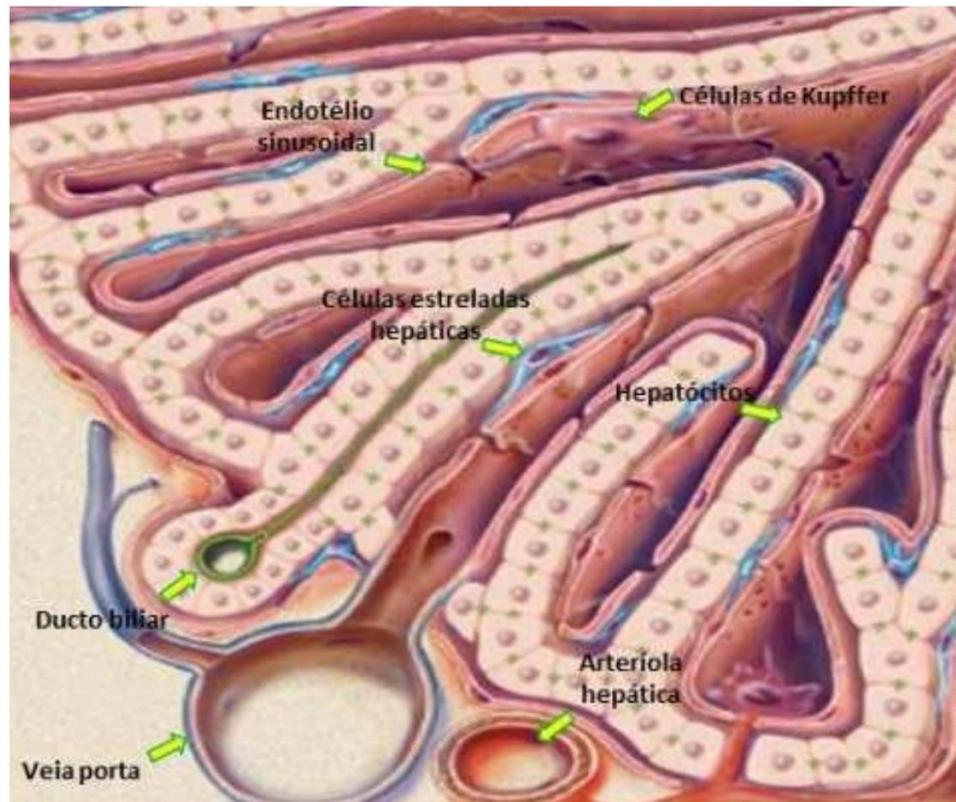


Figura 2. Arquitetura dos sinusoides hepáticos. Fonte: Adaptado de Friedman, 2003⁸.

A cirrose é uma doença responsável por causar a desestruturação do parênquima hepático, independente do agente etiológico que cause a lesão inicial, ela é considerada o estágio mais avançado de fibrose^{8,9}. Após uma agressão tecidual, células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos, são recrutadas para o local de lesão e passam a secretar citocinas pró-inflamatórias. Na sua evolução a cirrose compromete outros órgãos e sistemas determinando complicações graves, que ocasionam a sua grande morbimortalidade, o que a torna um problema de saúde pública.

A cirrose biliar é uma enfermidade crônica e difusa do fígado com alterações na sua estrutura e função, considerada uma possível complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas. Essa doença é acompanhada pela

dificuldade de eliminação da bile, pela destruição do parênquima hepático e pela fibrose progressiva¹⁰⁻¹². Muitas pesquisas são realizadas buscando compreender os mecanismos da cirrose hepática. Entretanto, um conjunto de considerações éticas limita que estes estudos sejam realizados em humanos, tornando-se necessário, o desenvolvimento e utilização de modelos animais que reproduzam a doença.

O modelo experimental de cirrose biliar secundária em ratos consiste na indução da doença através da obstrução prolongada do ducto biliar, realizando uma ligadura deste ducto, mecanismo este que estabelece as características próprias da doença em torno de 28 dias, bem como o mecanismo de sarcopenia, objeto de interesse de estudo deste estudo¹³. A obstrução prolongada provoca uma dilatação do ducto biliar, edema, além de reações inflamatórias agudas em função do refluxo biliar e surgimento de fibrose periportal devido a alterações de síntese e degradação de proteínas como o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, causando uma desorganização da arquitetura natural do parênquima durante este período^{13,14}. Em animais submetidos à ligadura de ducto biliar (LDB) é possível observar características como icterícia, com cauda e orelhas amareladas, próprias da cirrose.

Em doentes com cirrose hepática, uma deficiência nutricional relacionada à ingestão inadequada de alimentos, metabolismo anormal de nutrientes, digestão e absorção alteradas, aumento do catabolismo protéico e um aumento nos requisitos de proteína-energia pode causar uma diminuição da massa muscular esquelética, levando à sarcopenia^{15,16}. A sarcopenia, é uma das características mais comuns da cirrose estimando-se uma prevalência de 40-70% nos pacientes cirróticos, contribuindo significativamente para a morbidade e mortalidade nesta população. A perda de massa muscular é um forte indicador de mortalidade entre estes pacientes, sendo que a taxa de sobrevivência é significativamente maior entre os pacientes não-sarcopênicos em comparação aos sarcopênicos¹⁷⁻¹⁹.

Existem vários fatores que podem contribuir para a sarcopenia na cirrose, como um desequilíbrio entre a formação e degradação do tecido muscular. Além disso, entre as possíveis causas estão a ingestão inadequada de proteínas, náusea e anorexia induzidas por níveis elevados de fatores inflamatórios e má absorção alimentar (Dasarathy et al., 2011)²⁰

As alterações metabólicas na cirrose são muito complexas, além dos fatores nutricionais mencionados anteriormente existe uma forte ligação entre a inflamação e a sarcopenia^{21,22}. Os marcadores pró-inflamatórios aparecem elevados nesta doença e a compreensão destes mecanismos pode fornecer uma base para o desenvolvimento de

estratégias terapêuticas com a finalidade de prevenir e tratar a perda de massa muscular em pacientes com cirrose e minimizar seu impacto na qualidade de vida e na mortalidade. O exercício pode ser considerado para o estudo das respostas do organismo aos eventos estressantes, devido sua capacidade de adaptação à inflamação.

Devido à lacuna na literatura sobre os efeitos do exercício físico no tecido muscular de doentes cirróticos, novos estudos podem fornecer evidências que permitam compreender o mecanismo de progressão da doença e assim contribuir com formas de tratamento para esses pacientes.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guyton AC, Hall JE. Text Book of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2006. p.1116.
2. Mishra N, Yadav NP, Rai VK, Sinha P, Yadav KS, Jain S, Arora S. Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. Biomed Res Int.; 2013: 382184. <https://doi.org/10.1155/2013/382184>.
3. Coelho JCU. Aparelho Digestivo – Clínica e Cirurgia. 4 a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2012.
4. Netter FH. Atlas of Human Anatomy: A systems approach. Elsevier. 2005.
5. Gaboardi M. Anatomia e Fisiologia do Fígado. Sociedade Brasileira de Hepatologia; 2011. p.3.
6. Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. Int J Mol Sci. 2014;15(5):7711-30. <https://doi.org/10.3390/ijms15057711>.
7. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. Hepatobiliary Surg Nutr. 2014; 3(6): 344-63. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03>.
8. Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. J Hepatol. 2003; 38 Suppl 1:S38-53. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(02)00429-4).
9. López-Sánchez GN, Domínguez-Pérez M, Uribe M, Nuño-Lámbarri N. The fibrogenic process and the unleashing of acute-on-chronic liver failure. Clin Mol Hepatol. 2020; 26(1):7-15. <https://doi.org/10.3350/cmh.2019.0011>.
10. 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. <https://doi.org/10.3945/jn.109.105353>.
11. 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(4):370-6. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00181>.
12. Malik A, Kardashian AA, Zakharia K, Bowlus CL, Tabibian JH. Preventative care in cholestatic liver disease: pearls for the specialist and subspecialist. Liver Res. 2019; 3(2): 118-27. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.04.001>.
13. 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. PMID: 6743531; PMCID: PMC2040968.
14. Vieira EK, Bona S, Di Naso FC, Porawski M, Tieppo J, Marroni NP. Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. ISRN Gastroenterol. 2011; 2011: 604071. <https://doi.org/10.5402/2011/604071>.

15. Onuma T, Kamishima T, Shimamura T, Kawamura N, Yamashita K, Sutherland K, Takeda H. Longitudinal CT study of sarcopenia due to hepatic failure after living donor liver transplantation. *Quant Imaging Med Surg*. 2018; 8(1): 25-31. <https://doi.org/10.21037/qims.2018.01.07>.
16. Dhaliwal A, Towey J, Lord JM, Armstrong M, Elsharkawy AM. Nutrition in liver cirrhosis: a case-based overview. *Frontline Gastroenterol*. 2020; 11:155–61. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2018-101121>.
17. Montano-Loza AJ. Clinical relevance of sarcopenia in patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(25): 8061-71. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8061>.
18. Hanai T, Shiraki M, Nishimura K, Ohnishi S, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Shimizu M, Moriwaki H. Sarcopenia impairs prognosis of patients with liver cirrhosis. *Nutrition*. 2015; 31(1):193-9. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.07.005>.
19. Ebadi M, Bhanji RA, Mazurak VC, Montano-Loza AJ. Sarcopenia in cirrhosis: from pathogenesis to interventions. *J Gastroenterol*. 2019; 54(10): 845-59. <https://doi.org/10.1007/s00535-019-01605-6>.
20. Dasarathy S, McCullough AJ, Muc S, Schneyer A, Bennett CD, Dodig M, Kalhan SC. Sarcopenia associated with portosystemic shunting is reversed by follistatin. *J Hepatol*. 2011;54(5):915-21.
21. Malafarina V, Uriz-Otano F, Iniesta R, Gil-Guerrero L. Sarcopenia in the elderly: diagnosis, physiopathology and treatment. *Maturitas*. 2012;71(2):109-14. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.11.012>.
22. Bojko M. Causes of sarcopenia in liver cirrhosis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2019;14(5):167-70. <https://doi.org/10.3390/life11040349>.

3 ARTIGO ORIGINAL

INTRODUÇÃO

Em torno de 25 a 65% dos pacientes com cirrose comumente desenvolvem desnutrição energético-proteica (DEP), esta condição está associada à baixa taxa de sobrevivência desses pacientes. A DEP associada a cirrose ocorre em combinação com a ingestão alimentar inadequada, má absorção dos nutrientes, aumento da perda intestinal de proteínas, diminuição da síntese hepática de proteínas, utilização anormal de substratos e hipermetabolismo¹. Além disso, os pacientes que desenvolvem a DEP podem sofrer com perda de massa muscular e fraqueza, condição conhecida como sarcopenia. Estudos recentes demonstraram que a sarcopenia é um preditor independente de baixa sobrevivência em pacientes com cirrose hepática¹.

Em um estudo de pacientes com cirrose hepática compensada, com níveis de alanina aminotransferase > 50 UI/L, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de albumina sérica e o volume do músculo esquelético¹. A DEP associada a cirrose acelera o catabolismo protéico, com a degradação geral das proteínas celulares, principalmente nos músculos esqueléticos, e que fornece aminoácidos, especialmente aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), para síntese protéica e fornecimento de energia. Além disso, os BCAAs são consumidos para desintoxicação de amônia em pacientes com cirrose nos quais a desintoxicação hepática para uréia é prejudicada. Os músculos esqueléticos e, em menor grau, o cérebro limpam a amônia do sangue incorporando-a no processo de produção de glutamina a partir do glutamato. Durante este processo, os BCAAs são necessários para a síntese de glutamato. Assim, há uma falta frequente de BCAAs em pacientes com cirrose, resultando em diminuição da síntese de albumina¹.

Conforme descrito acima, a quebra de proteínas dos músculos esqueléticos é um mecanismo patológico importante para o desenvolvimento de sarcopenia em pacientes com cirrose. Recentemente, algumas análises indicaram que a hiperamonemia pode causar sarcopenia. Os resultados de um experimento animal demonstraram que a autofagia do músculo esquelético é induzida por hiperamonemia e pode contribuir para a sarcopenia na cirrose. Outro estudo mostrou que o músculo esquelético de pacientes com cirrose tinha expressão aumentada de miostatina, um conhecido inibidor de crescimento do músculo esquelético. Esse estudo descobriu que a expressão de miostatina é induzida por hiperamonemia em miotubos murinos, sugerindo um mecanismo pelo qual a sarcopenia se desenvolve em pacientes com cirrose¹.

Diversos estudos tem demonstrado níveis mais baixos de atividade física em pacientes cirróticos quando comparados com sujeitos não doentes. Ainda, estes estudos sugerem uma correlação inversa entre nível de atividade física e resistência à insulina, além de níveis baixos de exercício e ingesta calórica estarem correlacionados com a presença de sarcopenia¹.

Nos estudos mais recentes, muitos mediadores inflamatórios demonstraram contribuir para a progressão da doença hepática crônica, muitos dos quais são alvos ou ativadores do fator nuclear- κ B (NF- κ B). NF- κ B é um regulador transcricional chave da resposta inflamatória, e desempenha um papel essencial na regulação das vias de sinalização inflamatória no fígado. Primeiramente, o NF- κ B é ativado em praticamente todas as doenças crônicas do fígado, incluindo doença hepática alcoólica, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hepatite viral e doença hepática biliar. Em segundo lugar, o NF- κ B regula múltiplas funções essenciais em hepatócitos, células de Kupffer e células estreladas hepáticas (CEHs), conforme descrito abaixo. Em terceiro lugar, a inativação genética de diferentes componentes de sinalização do NF κ B resulta em fenótipos hepáticos que incluem lesão espontânea, fibrose e carcinogênese, sugerindo que o NF- κ B faz uma contribuição essencial para a homeostase hepática e processos de cicatrização de feridas².

A via de sinalização do NF- κ B é uma via evolutiva altamente conservada, com funções chave na regulação de respostas imunes e inflamatórias, como demonstrado pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* e posteriormente em mamíferos. O NF- κ B é um composto heterodímero ou homodímero de vários membros da família Rel de proteínas de ligação ao DNA e regula a transcrição de genes que contêm sítios de ligação de κ B. A família NF- κ B humana consiste em cinco subunidades de ligação ao DNA celular: p50, p52, cRel, p65 (também chamada de RelA) e RelB, codificadas por NFKB1, NFKB2, REL, RELA e RELB, respectivamente. As subunidades de ligação ao DNA do NF- κ B compartilham um domínio de homologia Rel N-terminal (RHD), que medeia a dimerização, a interação com o inibidor das proteínas κ B (I κ B), a translocação nuclear e a ligação ao DNA. Além disso, p65, RelB e cRel contêm domínios de transativação C-terminal que desencadeiam a transcrição do gene. p65 contém dois domínios de transativação potentes dentro de seu terminal C e é provavelmente o ativador mais forte da maioria dos genes com sítios κ B. Os dois outros membros da família NF- κ B humana, p52 e p50, tornam-se proteínas ativas de ligação ao DNA após a clivagem de precursores maiores (p105 inativo é clivado em p50 e p100 em p52). Eles ativam a transcrição quando formam heterodímeros com subunidades que contêm domínios de transativação (p65, RelB ou cRel), mas também

podem reprimir a transcrição gênica ao formar dímeros sem um domínio de transativação (por exemplo, homodímeros p50–p50)².

Vários estudos apontaram as associações próximas das vias fosfatidilinositol 3-quinase/AKT/alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/AKT/mTOR) com muitas doenças hepáticas. Estudos pré-clínicos mostraram que as intervenções destinadas a manter a atividade AKT em um fígado disfuncional atendem à maioria dos critérios. Embora a função central da AKT seja a sobrevivência celular, outros aspectos celulares, como captação de glicose, síntese de glicogênio, progressão do ciclo celular e metabolismo lipídico, demonstraram ser funções proeminentes da Akt no contexto da fisiologia hepática³.

Evidências atuais demonstram que a atividade física regular aumenta as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias e as capacidades funcionais de vários tecidos e órgãos. Ao passo que foi demonstrado que exercícios extenuantes, prolongados ou intensos são fortes estressores com consequências. Em alguns estudos, lesões e disfunções do fígado, foram relatadas em modelos animais e em humanos após exercício excessivo vigoroso. Dessa forma, permanece uma compreensão incompleta da relação dose-resposta entre exercício e saúde⁴.

O objetivo desse estudo foi analisar os marcadores Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) e Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) no quadríceps de ratos com cirrose induzida por LDB que realizaram exercício.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa no uso de animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo 1) e trata-se de uma análise de material biológico proveniente de uma pesquisa anteriormente realizada no Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), intitulado “Avaliação da sarcopenia, estresse oxidativo e processo inflamatório em músculo de ratos cirróticos tratados com melatonina e exercício físico”, sob o protocolo nº 2018/516 (Anexo 2). Este estudo foi publicado por Rosa et al., 2020⁵.

Animais

Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA – Resolução Normativa 30, 2016, CONCEA). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. O projeto de pesquisa original obedeceu às diretrizes

mínimas para o uso de animais como a definição de objetivos legítimos; a imposição de limites à dor e ao sofrimento; a fiscalização de instalações e procedimentos; a garantia de tratamento humanitário, e a responsabilização pública⁵.

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar, adultos jovens (em torno de 60 dias de idade), com peso entre 200 e 300g, mantidos no Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas (47cmx34cmx18cm) forradas com maravalha, com um ciclo diário de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18° e 22°C, com água e ração administradas ad libitum. Para manter os animais em condições adequadas foram adotadas estratégias de enriquecimento ambiental, sendo utilizados papel toalha e túneis metálicos para recreação, sementes de girassol e amendoim para diversificação alimentar entre outros; conforme indicação da unidade de experimentação animal⁵.

Grupos

Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais, provenientes do projeto original, cada um com 6 animais⁵:

- **Grupo CO** (Controle): grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e simulação do exercício físico de natação.
- **Grupo CO+EX** (Controle + Exercício): grupo submetido à simulação da cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e realização de exercício físico de natação.
- **Grupo LDB** (Ligadura de Ducto Biliar): grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar e simulação do exercício físico de natação.
- **Grupo LDB+EX** (Ligadura de Ducto Biliar + Exercício): grupo submetido à cirurgia de ligadura de ducto biliar comum e realização de exercício físico através de natação.

Cirurgia de Ligadura de Ducto Biliar Comum

Originalmente, os animais foram pesados e anestesiados mediante a administração de fármacos e posicionados para a cirurgia. Para sedação foi utilizada uma mistura de Cloridrato de Xilazina a 2% (8 mg/Kg de peso corporal) e Cloridrato de Cetamina a 10% (95 mg/Kg de peso corporal) via intraperitoneal (i.p.)⁵.

A intervenção cirúrgica inicia com a tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de laparotomia ventral média com posterior localização e dissecação do ducto biliar na altura da desembocadura dos ductos pancreáticos, ligando-se estes por meio de dois nós (utilizando-se fio seda 3-0) e posterior secção

entre eles. Para a sutura do tecido muscular utilizou-se pontos isolados, com fio absorvível 4-0 do tipo poliglactina, e para a pele fio não-absorvível 5-0, do tipo nylon monofilamentar (Figura 3). Os animais dos grupos controles não foram submetidos à ligadura de ducto biliar comum, sendo realizada somente manipulação do ducto gerando o estresse cirúrgico⁵.

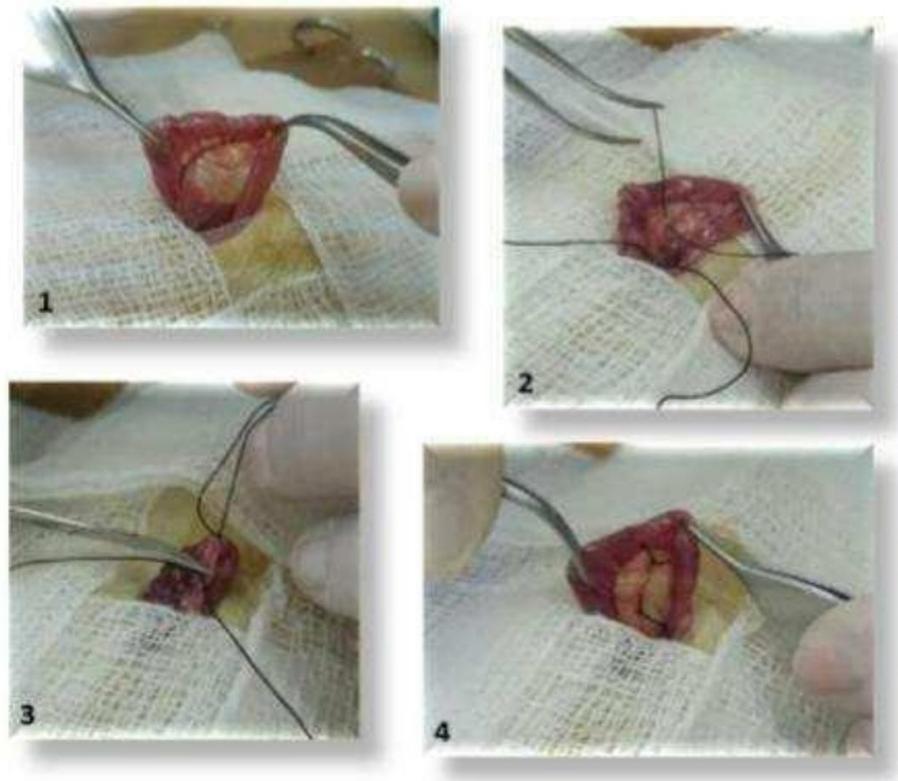


Figura 3. Cirurgia de Ligadura de Ducto Biliar. Em 1 observa-se a localização do ducto biliar, em 2 a passagem do fio de seda, em 3 a amarração e a secção entre eles, e em 4 o procedimento concluído. (Fonte: Colares, 2016)⁶.

Foi administrado 20mg/kg de tramadol (i.p.) no pós-operatório imediato e 20mg/kg de tramadol (i.p.) a cada 12 horas (12h/12h) por 3 a 5 dias, conforme necessidade e avaliação veterinária, minimizando desta forma o desconforto animal. Quando necessária a antecipação de morte, por sinais de sofrimento não manejado com analgésicos os animais receberam sobredose anestésica utilizando Cloridrato de Xilazina a 2% (24 mg/Kg de peso corporal) e Cloridrato de Cetamina a 10% (285 mg/Kg de peso corporal) via i.p. com a confirmação da morte feita pelo veterinário da unidade^{5,6}.

Programa de exercício físico

O tratamento com exercício físico ou simulação iniciaram a partir do 15º dia após

o procedimento cirúrgico de LDB ou simulação, e ocorreu diariamente até o 28º dia⁵.

A realização do exercício físico foi feita nos grupos CO+EX e LDB+EX. A modalidade escolhida foi a natação. Os animais foram inicialmente colocados para nadarem em pares, numa piscina de 60 x 40 cm e 50 cm de profundidade com temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 10 minutos, 3 vezes por semana. Durante este período, eram fornecidos estímulos táteis para os animais se manterem ativos no interior do tanque. Após a natação, os ratos eram secados individualmente com toalha e secador para evitar qualquer outra complicação^{5,7}.

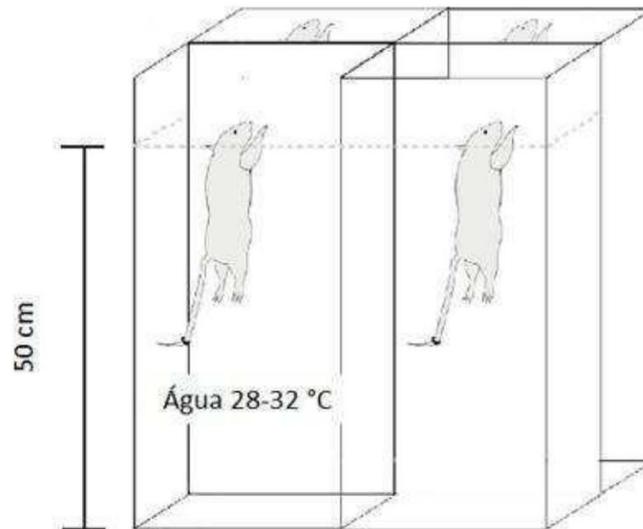


Figura 4: Ilustração do programa de treinamento aeróbio de natação. (Fonte: Adaptada Júnior, 2015)⁷.

Já a simulação do exercício, ocorreu nos grupos CO e LDB. Os animais foram colocados num tanque com água com 5cm de profundidade em $30^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C de temperatura durante 5 minutos de maneira livre⁵.

Obtenção das amostras de tecidos

Transcorridos 28 dias de desenvolvimento do modelo experimental, os animais sofreram eutanásia por exanguinação sob anestesia profunda. Após a morte dos animais, confirmada por veterinário, um pequeno fragmento do músculo quadríceps da pata esquerda foi retirado, embebido em formol 10% e incluído em blocos de parafina⁵.

As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos de cor branca, próprios para descarte e armazenadas em freezer. A prefeitura do campus da ULBRA Canoas coletou o descarte do material de acordo com as normas estipuladas pela instituição, seguindo os preceitos de saúde pública e higiene⁵.

Imunohistoquímica

Para confecção das lâminas, os blocos de parafina foram fixados ao Micrótomo (Leitz®1512) onde foram realizados os cortes. As lâminas de tecido muscular foram incubadas com anticorpos monoclonais para NF-kB (SC-8008) e P-AKT (SC-135650), (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), diluição 1:200, durante a noite, a 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas com tampão e incubadas com anticorpo secundário Biotinilado anti-coelho IgG, por trinta minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão com reagente EnVision e submetidas a três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS). Os núcleos serão contracolorados com hematoxilina, o anticorpo primário será diluído em PBS, contendo albumina bovina como controle negativo. Já como controle positivo para os anticorpos serão utilizados para NF-kB placenta e para P-AKT carcinoma ou pâncreas.

Os resultados foram avaliados por patologista cegado, sem conhecimento prévio dos grupos através de microscópio equipado com câmera digital para captura de imagens por meio do software (Image-Plus Media Cybernetics, Bethesda, USA). Após a obtenção das fotos, foi analisado em Adobe Photoshop® a expressão positiva de pixels em % para a marcação do anticorpo. As figuras a seguir ilustram a marcação do anticorpo para P-AKT e NF-kB no grupo LDB+EX e LDB, respectivamente, é possível observar os pixels em tom de marrom utilizados para quantificação da marcação.

Figura 5. Marcação do anticorpo P-AKT no grupo LDB+EX.



Figura 6. Marcação do anticorpo NF-kB no grupo LDB.



Análise estatística

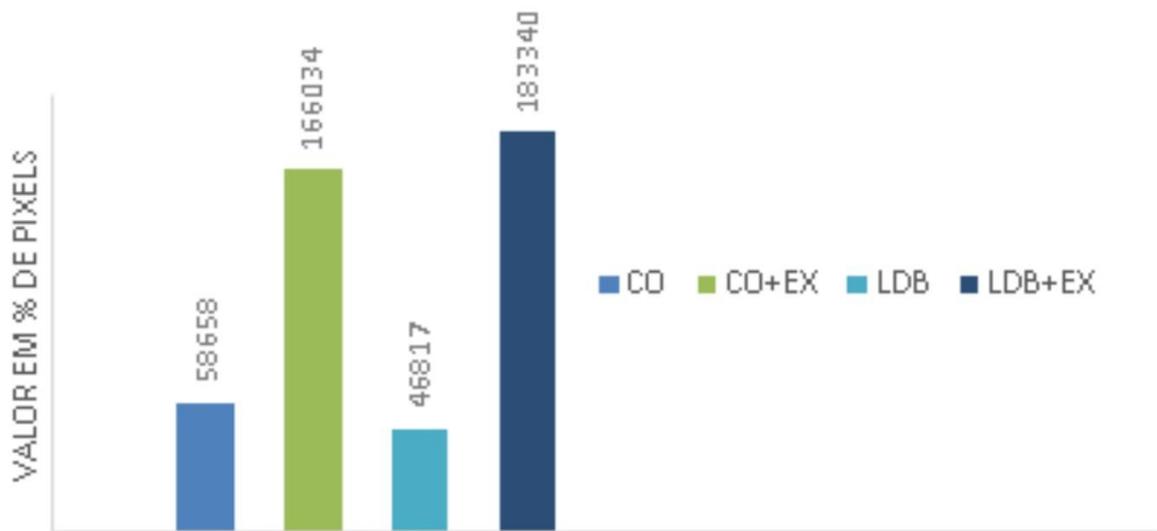
Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e desvio padrão. A análise de variáveis de medidas repetidas foi pelo teste ANOVA oneway seguida do pós-teste Student Newman Keuls. Foi utilizado o programa InStat 3 para Windows para análise dos dados.

RESULTADOS

Proteína Quinase Fosforilada

Os níveis de P-AKT demonstraram uma redução do grupo LDB ($46,817 \pm 5481$ pixels) de maneira significativa quando comparado com os grupos CO+EX (166034 ± 13853 pixels) e LDB+ EX (183340 ± 5280 pixels) ($p < 0,001$). Houve também redução do grupo LDB ($46,817 \pm 5481$ pixels) quando comparado ao grupo CO (58658 ± 15351 pixels), mas esta não foi significativa ($p > 0,05$). Conforme pode ser observado no gráfico 1 a seguir.

Gráfico 1. Comparação das médias de P-AKT entre os grupos.

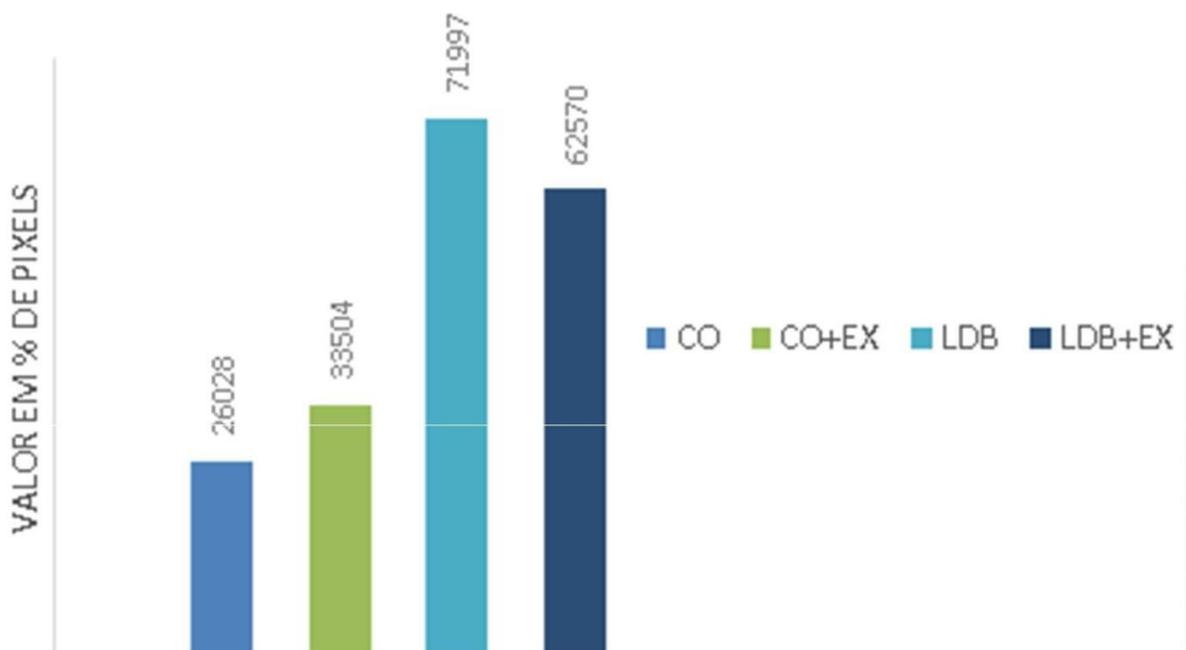


Legenda: CO: Grupo Controle; CO+EX: Grupo Controle + Exercício; LDB:Grupo Ligaduta do Ducto Biliar; LDB+EX: Grupo Ligaduta do Ducto Biliar+Exercício.

Fator de transcrição nuclear kappa B

Já os níveis de NF-kB demonstraram uma diferença significativa entre os grupos grupo LDB (71997 ± 5869 pixels) quando comparado ao grupo CO (26028 ± 4621 pixels) e CO+EX (33504 ± 17911 pixels) e uma diferença não significativa com o grupo LDB+EX (62570 ± 2749 pixels) ($p < 0,05$). Conforme pode ser observado no gráfico 2 a seguir.

Gráfico 2. Comparação das médias de NF-kB entre os grupos.



Legenda: CO: Grupo Controle; CO+EX: Grupo Controle + Exercício; LDB:Grupo Ligadura do Ducto Biliar; LDB+EX: Grupo Ligadura do Ducto Biliar+Exercício.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do exercício físico sobre o músculo quadríceps em ratos com cirrose biliar secundária induzida pela ligadura do ducto biliar. Foram encontrados maiores níveis da Proteína Quinase Fosforilada (P-AKT) nos animais com cirrose que realizaram exercício quando comparados com os animais doentes. Já os níveis do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-kB) foram maiores nos animais doentes quando comparados com os animais cirróticos que realizaram exercício.

Este estudo foi o primeiro a analisar a expressão da P-AKT e do NF-KB em quadriceps de ratos com cirrose induzida pelo modelo de ligadura do ducto biliar que realizaram um programa de exercício físico de natação. Na literatura, diferentes estudos com protocolos de exercícios avaliaram a expressão dessas proteínas e demonstrando os efeitos do exercício em diferentes desfechos.

O fígado está continuamente exposto a diversas agressões, que podem culminar em processos patológicos causadores de doenças hepáticas. Uma estratégia terapêutica eficaz para a doença hepática crônica deve controlar os fatores causais da doença e estimular a regeneração funcional do tecido. Alguns estudos buscam investigar intervenções destinadas a manter a atividade AKT em um fígado disfuncional. Embora a função central da AKT seja a sobrevivência celular, outros aspectos celulares, como captação de glicose, síntese de glicogênio, progressão do ciclo celular e metabolismo lipídico, demonstraram ser funções proeminentes da AKT no contexto da fisiologia hepática³. A proteína quinase B (AKT) é um membro de uma classe de serina ou treonina proteína quinase, e é um importante efetor na via de sinalização da fosfoinositídeo 3 quinase (PI3K). A AKT tem um papel significativo em vários processos celulares, incluindo sobrevivência celular, metabolismo, crescimento, proliferação e mobilidade, ela também regula a homeostase vascular e a angiogênese⁸.

A Akt fosforilada (P-AKT) é capaz de interferir na apoptose celular e na promoção de habilidades de proliferação e motilidade por meio do mecanismo de ativação do alvo mamífero da rapamicina (mTOR). Não há uma correlação estabelecida na literatura sobre os níveis de expressão da P-AKT e desfechos positivos ou negativos. Em alguns casos, quando está superexpressa ela pode ser considerada um indicador de mau prognóstico em muitas malignidades. Uma meta-análise recente relatou que a alta expressão de P-AKT foi significativamente associada a pior sobrevida global em pacientes com câncer de mama. Este valor prognóstico também foi demonstrado em outras duas meta-análises que

resumiram a mesma conclusão de que a expressão elevada de P-AKT estava relacionada à baixa sobrevida em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. No câncer gástrico, muitos estudos também mostraram uma relação negativa entre a expressão de p-Akt e a sobrevida³.

Em doenças metabólicas como a diabetes mellitus tipo 2 a resistência à insulina é parcialmente derivada da inflamação sistêmica, pode ser um fator chave para sinalização de atrofia muscular. Em um estudo realizado com pacientes com DM2, a atividade específica da AKT quinase em resposta à insulina foi reduzida em 34% quando comparados com controles saudáveis. No entanto, alguns estudos falharam em detectar uma relação negativa significativa e alguns até obtiveram uma relação positiva. Em particular, vários ensaios obtiveram resultados contraditórios por meio de análises univariadas e multivariadas⁹.

No músculo esquelético, o comprometimento da via PI3K-AKT tem sido implicado na diminuição da captação de glicose mediada por insulina e na síntese de proteínas em roedores e pacientes com DM2. O principal regulador da síntese proteica no músculo esquelético é a ativação do alvo mamífero da rapamicina (mTOR), que é ativado por AKT via insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) e estímulos mecânicos¹⁰. Foram encontrados poucos estudos na literatura que pesquisaram os efeitos do exercício sobre a expressão da P-AKT e sua relação com algumas patologias.

O estudo de Peng et al, (2022)¹¹ investigou se um programa de exercício de corrida de 8 semanas seria capaz de reduzir a apoptose neuronal e melhorar a função dos neurônios do hipocampo de camundongos com Doença de Alzheimer. Como resultado, foi encontrado, além de melhor desempenho em diversas funções motoras, aumento da expressão das proteínas Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase B fosforilada (P-AKT). Estima-se que essa via seja um regulador da proliferação celular, regulando o crescimento e a sobrevivência das células, inibindo muitas neurotoxinas e reduzindo a apoptose neuronal¹¹.

O estudo de Zhao et al, (2021)¹² investigou se o exercício poderia regular a ocorrência e o desenvolvimento de hepatocarcinoma através da mitose. Foi realizado um protocolo de exercício na esteira em um modelo de tumor subcutâneo de fígado humano em camundongos. Foram analisadas a expressão da proteína relacionada à dinamina 1 (do inglês, DRP1), uma proteína chave na divisão mitocondrial e a expressão da via PI3K/AKT. Como resultado, foi encontrado que a expressão de DRP1 em tecidos de câncer de fígado foi significativamente aumentada em comparação com tecidos hepáticos normais ($p < 0,001$). Nesse estudo, foi demonstrado que a DRP1 ativou a expressão de

sinais PI3K/AKT. Além disso, a fosforilação de PI3K e AKT foi demonstrada estar intimamente relacionado com a metástase e proliferação tumoral. O exercício mostrou ter um papel protetor no hepatocarcinoma regulação negativa de DRP1 através da via PI3K/AKT, além de ser encontrado uma diminuição da expressão de P-PI3K e P-AKT ao exame do tecido após o exercício aeróbico¹².

O estudo de Wang et al, (2018)⁸ avaliou os efeitos do exercício de esteira na depressão induzida por isolamento social em ratos. A hipótese foi de que o efeito antidepressivo do exercício em esteira pode ser mediada pela inativação de Glicogênio Sintase Quinase-3 (GSK-3 β) através da ativação da via de sinalização PI3K/Akt. GSK-3 β é uma serina/treonina quinase que medeiam a sinalização celular e a morte celular. A AKT é uma das quinases que inativa a GSK-3 β por meio de sua fosforilação. Como resultado foi encontrado que a relação P-AKT/AKT no hipocampo foi diminuída pelo isolamento social, no entanto, o exercício em esteira aumentou a expressão de P-AKT, exercendo efeito de melhora na depressão dos animais⁸.

No fígado, as células de Kupffer, macrófagos especializados que revestem os sinusoides, podem ser ativadas por muitos agentes, incluindo ácido araquidônico, endotoxinas e interferon gama (INF- α). Como resultado dessa ativação ocorre a produção de: citocinas, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (ILs) (IL-1, IL-6 e IL-10), interferon alfa e beta (INF- α e INF- β), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e vários prostanoides².

O NF- κ B é ativado por vários estímulos que apresentam um perigo potencial para o hospedeiro, resultando no início de respostas inflamatórias, imunes e de cicatrização de feridas e na eliminação de patógenos. A ativação do NF- κ B leva à transcrição de centenas de genes com sítios de ligação de κ B, a maioria dos quais está envolvida na regulação da inflamação, respostas imunes e sobrevivência celular. O NF- κ B tem uma ampla gama de funções em diferentes compartimentos celulares, influenciando a sobrevivência dos hepatócitos, a inflamação nas células de Kupffer e a sobrevivência, inflamação e ativação nas células estreladas hepáticas (CEHs). Essa ampla funcionalidade significa que o NF- κ B assume o papel central na regulação dos aspectos centrais da doença hepática crônica e nas respostas de cicatrização de feridas resultantes que, em última análise, determinam o resultado, ou seja, resolução da doença e fibrose do órgão².

Curiosamente, o NF- κ B media respostas pró-inflamatórias e antiapoptóticas a esses mediadores, garantindo que os hepatócitos sejam protegidos da morte celular enquanto respostas inflamatórias e imunes apropriadas são iniciadas. A dupla função da via do NF- κ B requer um equilíbrio delicado, uma vez que pouca ou muita ativação do NF- κ B pode ter

um impacto negativo no fígado devido ao aumento da inflamação ou proteção insuficiente contra a morte celular².

O NF-κB modula a fibrogênese hepática predominantemente em três diferentes compartimentos celulares: (A) regulando a lesão dos hepatócitos, o principal desencadeador das respostas fibrogênicas no fígado; (B) regulando sinais inflamatórios induzidos em macrófagos e outras células inflamatórias no fígado; e (C) regulando as respostas fibrogênicas em CEHs. Baixos níveis de NF-κB exacerbam lesões induzidas por vírus da hepatite, álcool, gordura, lipolissacarídeos (LPS) ou carcinógenos. No entanto, a ausência completa de NF-κB é suficiente para iniciar a apoptose dos hepatócitos mesmo sem esses gatilhos, provavelmente porque baixos níveis de LPS ainda atingem o fígado. O aumento da lesão hepática leva à estimulação de respostas regenerativas em células progenitoras e ativação de células Kupffer por IL-1α liberada de hepatócitos moribundos. Por sua vez, esses processos estimulam a ativação do NF-κB nas células de Kupffer e a liberação de mediadores como IL-1β e TNF. Esses mediadores podem induzir mais danos aos hepatócitos, liberação de IL-1α e respostas regenerativas, levando a um círculo vicioso de lesão, inflamação e regeneração. Ao mesmo tempo, LPS da microbiota intestinal e TNF e IL-1β das células de Kupffer atuam nas CEHs para promover sua ativação e sobrevivência. HSCs ativadas e/ou miofibroblastos hepáticos produzem matriz extracelular, que altera o microambiente hepático². Em resumo, a ativação de NF-κB em HSCs e/ou miofibroblastos hepáticos parece promover fibrose hepática por meio de múltiplos mecanismos, incluindo efeitos fibrogênicos diretos, efeitos antiapoptóticos e secreção de quimiocinas recrutadoras de macrófagos (Luedde & Schwable, 2010)².

Evidências emergentes sugerem que as vias do Fator Nuclear κ B (NF-κB) e do Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3) sensíveis à inflamação podem contribuir para a atrofia muscular no DM. O estudo de Perry et al, (2016)⁶ discute o papel que a inflamação desempenha na atrofia muscular no DM2 e o papel do treinamento físico em minimizar o efeito de marcadores inflamatórios no músculo esquelético. O aumento dos níveis sistêmicos de TNFα no DM2 reduz o nível do inibidor de NF-κB (IKB), que subsequente regula positivamente as vias de NF-κB e das quinases N-terminais c-Jun (JNK) no músculo, resultando em resistência à insulina através da inibição de substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Os autores concluíram que as vias inflamatórias no músculo, em particular, NF-κB, potencialmente contribuem para a atrofia muscular mediada por T2DM. O NF-κB pode ser ativado através de várias vias que são direcionadas por citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNFα, e pela circulação de Ácidos Graxos Livres Não Esterificados (NEFA) através do receptor toll-like 4 (TLR4). Embora

TNF α elevado por si só não seja suficiente para causar atrofia muscular , a regulação positiva de NF- κ B pode causar atrofia muscular em roedores. É importante ressaltar que o NF- κ B pode aumentar a degradação de proteínas musculares específicas por meio do aumento da expressão da ubiquitina ligase E3 (MuRF1), sugerindo que os efeitos atroficos do aumento da atividade do NF- κ B não são mediados apenas pela resistência à insulina. Enquanto o NF- κ B é aumentado no músculo durante condições atroficas em humanos, incluindo DM2, seu papel direto na atrofia relacionada ao DM2 é relativamente desconhecido. Como tal, a via NF- κ B também pode ser importante nas adaptações de treinamento para o músculo diabéticos, já que a sinalização do NF- κ B é regulada positivamente em humanos com DM2 e diminui com o exercício físico⁹.

Diante das evidências, mais estudos são necessários para verificar os efeitos do exercício físico sobre os marcadores inflamatórios no músculo esquelético de pacientes com doença hepática.

CONCLUSÃO

O exercício físico reduziu os efeitos inflamatórios da cirrose induzido pelo modelo experimental no tecido muscular e promoveu maior possibilidade de renovação celular nos animais tratados com esta terapia.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Toshikuni N, Arisawa T, Tsutsumi M. Nutrition and exercise in the management of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21; 20(23): 7286–7297. Published online 2014 Jun 21. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7286>.
2. Luedde T, Schwabe. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Feb; 8(2): 108–118. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.213>.
3. Morales-Ruiz M, Santel A, Ribera J, Jiménez W. The Role of Akt in Chronic Liver Disease and Liver Regeneration. *Semin Liver Dis*. 2017 Feb; 37(1): 11-16. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1597819>.
4. Tang Y, Juan L, Gao C, Xu Y, Li Y, Yu X, Wang J, Liu L, Yao P. Hepatoprotective Effect of Quercetin on Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammation after Intense Exercise in Mice through Phosphoinositide 3-Kinase and Nuclear Factor-Kappa B. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8696587. <http://doi.org/10.1155/2016/8696587>.
5. Rosa CGS, Colares JR, Fonseca SRB, Martins GS, Miguel FM, Dias AS, Marroni CA, Picada JN, Lehman M, Marroni NAP. Sarcopenia, oxidative stress and inflammatory process in muscle of cirrhotic rats – Action of melatonin and physical exercise. *Exp Mol Pathol*. 2021; Aug; 121:104662. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104662>.
6. Colares JR. Efeito da melatonina sobre a cirrose biliar secundaria induzida por ligadura de ducto biliar. 2016. 93 p. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde) – Universidade Luterana do Brasil, Brasil.
7. Toshikuni N, Arisawa T, Tsutsumi M. Nutrition and exercise in the management of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21; 20(23): 7286–7297. Published online 2014 Jun 21. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7286>.
8. Wang LR, Baek S. Treadmill exercise activates PI3K/Akt signaling pathway leading to GSK-3 β inhibition in the social isolated rat pups. *J Exerc Rehabil*. 2018;14(1):4-9. <https://doi.org/10.12965/jer.1836054.027>.
9. Cao F, Zhang C, Han W, Gao XJ, Ma J, Hu YW, Gu X, Ding HZ, Zhu LX, Liu Q. P-Akt as a potential poor prognostic factor for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Aug 29; 8(35): 59878–59888. Published online 2017 Apr 10. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17001>.
10. Perry BD, Caldow MK, Brennan-Speranza TC, Sbaraglia M, Jerums G, Garnham A, Wong C, Levinger P, Asrar ul Hag M, Hare DL, Price SR, Levinger I. Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2016; 22: 94–109. PMID: 26859514; PMCID: PMC5545118.
11. Peng Y, Chi R, Liu G, Tian W, Zhang J, Zhang R. Aerobic Exercise Regulates Apoptosis through the PI3K/Akt/GSK-3 β Signaling Pathway to Improve Cognitive Impairment in

Alzheimer's Disease Mice. *Neural Plasticity*. 2022; 22: 1500710.
<https://doi.org/10.1155/2022/1500710>.

12. Zhao T, Guo B, Xiao C, Chen J, Lu C, Fang F, Li B. Aerobic exercise suppresses hepatocellular carcinoma by downregulating dynamin-related protein 1 through PI3K/AKT pathway. *Journal of Integrative Medicine*. 2021; 19 (2021) 418–427. *Pharmacotherapy*. Volume 92, August 2017, Pages 544-553. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.037>.

5 ANEXO 1. Carta de Aprovação da CEUA-HCPA



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Comissão Científica

Projeto 2021/0379

Título ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO QUADRICEPS DE RATOS COM CIRROSE SUBMETIDOS A UM TREINAMENTO DE EXERCÍCIO FÍSICO

Pesquisador ALEXANDRE SIMOES DIAS

Equipe de Pesquisa:

SANDIELLY BENITEZ DA
FONSECA

NORMA ANAIR POSSA MARRONI

ALINE FELICIO BUENO

GABRIELA DOS SANTOS
MARTINS

MARILDA DA SILVA BRASIL

ELIZÂNGELA GONÇALVES
SCHEMITT

Data de 23/08/2021

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ASHTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação
29/08/2021 13:41:28

Impresso no sistema AGHUse-Pesquisa por CRISTIAN FIDALGO CABRAL em 23/08/2021 16:56:33

6 ANEXO 2. Carta de Aprovação da CEUA-ULBRA



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

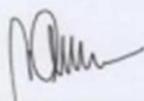
Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da sarcopenia, estresse oxidativo e processo inflamatório em músculo de ratos cirróticos tratados com melatonina e exercício físico.", registrada com o nº2018/516, sob a responsabilidade de Norma Anair Possa Marroni - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL, em reunião de 10/09/2018.

O(a) responsável fica ciente que nenhuma alteração poderá ser feita na condução do projeto, sem a prévia autorização por escrito desta Comissão.

Após dez dias do término das atividades, ou quando esta Comissão julgar necessário, o(a) responsável deverá apresentar relatório.

Finalidade		() Ensino (x) Pesquisa Científica					
Vigência da autorização 10/09/2018 à 20/10/2020							
Espécie animal	Linhagem/Raça	Idade	Peso aproximado	Quantidade			Origem
				M	F	M+F	
Rato heterogênico	Wistar	8 sem.	200 à 300g	48*	***	48**	Biotério ULBRA

Canoas, 12 de setembro de 2018.



Prof. Dr. Paulo Tadeu Campos Lopes
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Portaria nº 1221/14 - 27/08/2014 - ULBRA