

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA**

**AÇÃO DA MELATONINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O FÍGADO DE**  
**RATOS CIRRÓTICOS: ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO**  
**PROCESSO INFLAMATÓRIO**

**GABRIELA DOS SANTOS MARTINS**

Porto Alegre

2023

GABRIELA DOS SANTOS MARTINS

**AÇÃO DA MELATONINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O FÍGADO DE  
RATOS CIRRÓTICOS: ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO  
PROCESSO INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Norma Possa Marroni

Porto Alegre

2023

#### CIP - Catalogação na Publicação

Martins, Gabriela  
AÇÃO DA MELATONINA E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O  
FÍGADO DE RATOS CIRRÓTICOS: ESTUDO DO ESTRESSE  
OXIDATIVO E DO PROCESSO INFLAMATÓRIO / Gabriela  
Martins. -- 2023.  
90 f.  
Orientador: Norma Anair Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Estresse oxidativo. 2. Processo inflamatório. 3.  
Cirrose. 4. Melatonina. 5. Exercício físico. I. Anair  
Possa Marroni, Norma, orient. II. Título.

*“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.”*

**Carl Sagan**

## **Dedicatória**

*Com carinho dedico este trabalho a minha família, por sempre acreditarem em mim, em especial a minha mãe, Valéria, que foi o pilar que me deu apoio para que esta conquista se tornasse possível.*

## AGRADECIMENTOS

O estudo é algo libertador e incrível. Quando achamos aquilo de que gostamos, sempre optamos por estudar e aprender mais. Este trajeto de aprendizagem e novas descobertas se desenvolveu com o apoio de minha família, que sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos, em especial agradeço minha mãe, **Valéria dos Santos Martins**, que nos momentos mais difíceis de minha jornada, em fases que pensei que não seria capaz de prosseguir foi meu pilar para permanecer firme.

Ao meu querido amigo **Rafael Vernetti** que compartilhou muitos momentos deste estudo ao meu lado meus agradecimentos por todo suporte, incentivo e principalmente pela paciência nos meus momentos de estresse.

O desenvolvimento desta pesquisa se tornou possível devido aos ensinamentos de minha orientadora, **Dra. Norma Possa Marroni**, que durante anos, deste a fase da iniciação científica vem compartilhando seus conhecimentos acadêmicos e de vida. Agradeço-lhe pelo tempo e confiança que deste a mim, e a todos ensinamentos que me tornaram uma pesquisadora mais comprometida, paciente e competente. Meus mais sinceros agradecimentos a **Dra. Elizângela Gonçalves Schemitt**, que além de excelente profissional, sempre ética e muito profissional em todo trabalho que faz me coorientou durante todo desenvolvimento da pesquisa, me ensinando novas técnicas e metodologias, com seu auxílio os resultados deste estudo se tornaram possíveis.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação – HCPA, **Sandielly Benitez** agradeço a paciência e o acolhimento que me deste no meu retorno ao laboratório, **Gabriela Adami**, **Millena Engeroff**, **Taila de Sá** quero que saibam que vocês foram partes fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa, agradeço por todo apoio. E em especial agradeço minha colega e mestra, **Marilda Brasil**, que juntas passamos noites acordadas, em meio a ligações e mensagens de trocas de conhecimento, se ajudando para juntas obtermos bons resultados em nossos estudos.

Por fim agradeço as agências financiadoras, CAPES e FINEP/HCPA que fomentaram esta dissertação, sendo possível realizar todas as análises previstas. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e equipe do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia meus agradecimentos pela oportunidade de realizar os estudos nesta instituição e por contribuírem nesta minha jornada de formação acadêmica.

## RESUMO

A cirrose hepática caracteriza-se pelo surgimento de septos e nódulos fibróticos, bem como alterações estruturais e funcionais do fígado. A obstrução prolongada do ducto biliar é um modelo experimental eficaz para indução de cirrose biliar secundária. O exercício físico (EX) pode reverter a perda de força muscular, melhorar a qualidade de vida e o prognóstico em pacientes cirróticos. A Melatonina (MLT) vem sendo estudada devido suas propriedades, incluído seu potencial antioxidante. O objetivo foi avaliar a ação EX e da MLT no fígado de ratos cirróticos, submetidos ao modelo experimental de ligadura de ducto biliar (LDB). Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, divididos em oito grupos: Controle (CO), CO+MLT, CO+EX, CO+MLT+EX) LDB, LDB+MLT, LDB+EX e LDB+MLT+EX. Os tratamentos ocorreram do 15° ao 28° dia. A dose da MLT foi de 20 mg/kg via i.p (1x/dia), e para a realização do EX, os animais foram colocados para nadar em pares por 10min/dia. Amostras de sangue foram coletadas para as análises de AST, ALT e FA, o fígado foi coletado para as análises histológicas realizadas por meio de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e picrosírius, lipoperoxidação (LPO) e atividade das enzimas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Glutathione peroxidase (GPx). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*, seguida do teste *Student-Newman-Keuls*, considerado significativo quando ( $p < 0,05$ ). As enzimas de integridade hepática AST, ALT e FA tiveram uma redução significativa nos grupos LDB+MLT, LDB+EX e LDB+MLT+EX quando comparados ao grupo LDB. Na análise histológica, desorganização tecidual, infiltrado inflamatório e fibrose foram observados no grupo BDL, e nos grupos BDL+MLT, BDL+EX e BDL+MLT+EX, evidenciamos uma reorganização do parênquima hepático, diminuição do infiltrado inflamatório e dos nódulos fibróticos. Na avaliação da LPO observou-se um aumento significativo no grupo LDB quando comparado aos grupos controles e uma redução nos grupos LDB+MLT, LDB+EX e LDB+MLT+EX quando comparado ao grupo LDB. Na avaliação das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx foi observado um aumento significativo no grupo LDB em relação aos grupos controles e uma diminuição significativa no grupo LDB+MLT, LDB+EX e LDB+MLT+EX. Os níveis de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  demonstraram um aumento significativo no grupo LDB em comparação aos grupos CO, CO+MLT, CO+EX e CO+MLT+EX. Os grupos tratados com MLT e/ou EX demonstraram uma redução significativa quando

comparados ao grupo LDB. Na imunohistoquímica (TNF- $\alpha$  e NF-kB), ocorreu uma intensa marcação positiva da coloração no grupo LDB, e uma diminuição significativa nos grupos LDB+MLT, LDB+EX e LDB+MLT+EX. A julgar pelos parâmetros avaliados a melatonina e o exercício físico parecem ser eficazes na restauração dos diferentes danos ocasionados neste modelo experimental. Sugerimos que a melatonina e o exercício físico podem contribuir na redução das alterações hepáticas observadas em ratos cirróticos, e quando associados os tratamentos mostraram resultados mais significativos, podendo ser considerados no futuro como uma possível estratégia terapêutica.

**Palavras-chave:** Cirrose hepática, estresse oxidativo, melatonina, exercício físico.

## ABSTRACT

Liver cirrhosis is characterized by the appearance of septa and fibrotic nodules, as well as structural and functional changes in the liver. Prolonged bile duct obstruction is an effective experimental model for inducing secondary biliary cirrhosis. Physical exercise (EX) can reverse the loss of muscle strength, improve quality of life and prognosis in cirrhotic patients. Melatonin (MLT) has been studied due to its properties, including its antioxidant potential. The objective was to evaluate the action of EX and MLT in the liver of cirrhotic rats, submitted to the experimental model of bile duct ligation (BDL). Forty-eight male Wistar rats were divided into eight groups: Control (CO), CO+MLT, CO+EX, CO+MLT+EX, BDL, BDL+MLT, BDL+EX and BDL+MLT+EX. The treatments occurred from the 15th to the 28th day. The dose of MLT was 20 mg/kg via i.p (1x/day), and to perform the EX, the animals were placed to swim in pairs for 10min/day. Blood samples were collected for AST, ALT and ALP analyses, the liver was collected for histological analyzes performed by staining with hematoxylin and eosin (HE) and picosirius, lipoperoxidation (LPO) and enzyme activity, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and Glutathione peroxidase (GPx). The statistical analysis used was ANOVA One-Way, followed by the Student-Newman-Keuls test, considered significant when ( $p < 0.05$ ). The liver integrity enzymes AST, ALT, and ALP had a significant reduction in the BDL+MLT, BDL+EX, and BDL+MLT+EX groups when compared to the BDL group. In the histological analysis, tissue disorganization, inflammatory infiltrate, and fibrosis were observed in the BDL group, and in the BDL+MLT, BDL+EX, and BDL+MLT+EX groups, we evidenced a reorganization of the hepatic parenchyma, a decrease in the inflammatory infiltrate and in the nodules fibrotic. In the evaluation of LPO, a significant increase was observed in the BDL group when compared to the control groups and a reduction in the BDL+MLT, BDL+EX, and BDL+MLT+EX groups when compared to the BDL group. In the evaluation of CAT, SOD, and GPx antioxidant enzymes, it was observed a significant increase in the BDL group in relation to the control groups and a significant decrease in the BDL+MLT, BDL+EX, and BDL+MLT+EX groups. NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> levels showed a significant increase in the BDL group compared to the CO, CO+MLT, CO+EX and CO+MLT+EX groups. The groups treated with MLT and/or EX showed a significant reduction when compared to the BDL group. In immunohistochemistry (TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B), there was an

intense positive staining in the BDL group, and a significant decrease in the BDL+MLT, BDL+EX, and BDL+MLT+EX groups. Judging by the evaluated parameters, melatonin and physical exercise seem to be effective in restoring the different damages caused in this experimental model. We suggest that melatonin and physical exercise can contribute to the reduction of liver alterations observed in cirrhotic rats, and when associated treatments showed more significant results, which may be considered in the future as a possible therapeutic strategy.

**Keywords:** Liver cirrhosis, oxidative stress, melatonin, physical exercise.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALT – Alanina aminotransferase**

**AST – Aspartato aminotransferase**

**ATP – Adenosina trifosfato**

**Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> – Cálcio**

**CAT – Catalase**

**CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais**

**CEHs – Células estreladas hepáticas**

**CO – Controle**

**CO+EX – Controle + exercício**

**CO+MLT – Controle + melatonina**

**CO+MLT+EX – Controle + melatonina + exercício**

**DEN – Dietilnitrosamina**

**E-NOS – Óxido nítrico sintase endotelial**

**ERN – Espécies reativas de nitrogênio**

**ERO – Espécies reativas de oxigênio**

**EX – Exercício**

**FA – Fosfatase alcalina**

**GPx – Glutathiona peroxidase**

**GR – Glutathiona redutase**

**GSH – Glutathiona reduzida**

**GSSG – Glutathiona oxidada**

**GST – Glutathiona S-transferase**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio**

**HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

**HE – Hematoxilina e eosina**

**IL – Interleucina**

**iNOS – Óxido nítrico sintase induzível**

**I.p. – Intraperitoneal**

**LDB – Ligadura de ducto biliar**

**LDB+EX – Ligadura de ducto biliar + exercício**

**LDB+MLT – Ligadura de ducto biliar + melatonina**

**LDB+MLT+EX – Ligadura de ducto biliar + melatonina + exercício**

**LPO – Lipoperoxidação**

**MEC – Matriz extracelular**

**MLT - Melatonina**

**NaCl - Cloreto de sódio**

**NADPH – Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo**

**NF $\kappa$ B – Fator de transcrição nuclear kappa B**

**N-NOS – Óxido nítrico sintase neuronal**

**NO – Óxido nítrico**

**NO<sub>2</sub>- – Nitrito**

**NO<sub>3</sub>- – Nitrito**

**NOS - Óxido nítrico sintase**

**NR – Nitrito redutase**

**O<sub>2</sub> – Oxigênio**

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical ânion superóxido**

**OH<sup>•</sup> – Radical hidroxila**

**ONOO<sup>•</sup> – Peroxinitrito**

**RL – Radicais livres**

**SOD – Superóxido dismutase**

**TBA – Ácido tiobarbitúrico**

**TCA – Ácido tricloroacético**

**TBARS – Substância que reagem ao ácido tiobarbitúrico**

**TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformante**

**TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa**

**UFRGS – Universidade federal do Rio Grande do Sul**

**ULBRA – Universidade Luterana do Brasil**

**UPP – Ubiquitina-proteossoma**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do fígado.....	20
Figura 2 - Esquema tridimensional da arquitetura normal do fígado. ....	21
Figura 3 - Estrutura microscópica do fígado.....	22
Figura 4 - Célula estrelada hepática, forma quiescente e ativada.....	23
Figura 5 - Arquitetura hepática com injúria crônica. ....	24
Figura 6 - Modelo experimental de LDB.....	26
Figura 7 - Desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes e possíveis danos ao organismo. ....	28
Figura 8 - Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres .....	29
Figura 9 - Representação esquemática da reação da lipoperoxidação.....	30
Figura 10 - Metabolismo do NO. ....	31
Figura 11 - Ação das enzimas antioxidantes.....	32
Figura 12 - Via clássica de ativação do NF-κB.....	36
Figura 13 - Esquema das reações para produção da melatonina .....	37
Figura 14 - Cirurgia de ligadura de ducto biliar.....	45
Figura 15 - Delineamento experimental. ....	46
Figura 16 - Ilustração do programa de treinamento aeróbio de natação.....	47
Figura 17 - Análise histológica do tecido hepático (HE). ....	53
Figura 18 - Score de lesão da histologia hepática por HE. ....	54
Figura 19 - Análise histológica do tecido hepático (Picrosirius).....	55
Figura 20 - Score da histologia hepática por picrosírius.....	56
Figura 21 - Avaliação da lipoperoxidação por TBARS. ....	57
Figura 22 - Valores médios da atividade da enzima SOD.....	58
Figura 23 - Valores médios da atividade da enzima CAT .....	59
Figura 24 - Valores médios da atividade da enzima GPx.....	60
Figura 25 - Valores médios dos níveis de nitritos e nitratos. ....	61
Figura 26 - Expressão do TNF-α.....	62
Figura 27 - Quantificação dos níveis da imuno-histoquímica do TNFα .....	63
Figura 28 - Expressão Fator Nuclear Kappa B (NFκB). ....	64
Figura 29 - Quantificação dos níveis da imuno-histoquímica do NFκB.....	65

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1 REFERENCIAL TEORICO</b> .....	<b>20</b>
1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO FÍGADO .....	20
1.2 CIRROSE HEPÁTICA .....	23
1.3 CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA .....	25
1.3.1 Modelo experimental de cirrose biliar secundária .....	25
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO .....	27
1.4.1 Estresse Oxidativo .....	27
1.4.2 Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio .....	28
1.4.3 Espécies Reativas de Nitrogênio.....	30
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	32
1.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	34
1.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	35
1.6.2 Fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) .....	35
1.7 MELATONINA.....	36
1.8 EXERCÍCIO FÍSICO.....	38
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	43
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	43
4.3 TAMANHO DA AMOSTRA E ANIMAIS.....	43
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAIS .....	44
4.5.1 Ligadura do ducto biliar .....	44
4.5.2 Administração da Melatonina e do veículo.....	45
4.5.3 Realização do exercício físico .....	46
4.5.4 Obtenção das amostras de sangue e tecidos .....	47
4.5.5 Descarte das carcaças.....	47
4.6 ANÁLISES.....	48
4.6.1 Avaliação da integridade hepática.....	48

4.6.2 Análise histológica.....	48
4.6.3 Preparação do homogeneizado e dosagem de proteína.....	48
4.6.4 Avaliação da lipoperoxidação.....	49
4.6.5 Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido Dismutase (SOD).....	49
4.6.6 Atividade da Enzima Antioxidante Catalase (CAT).....	49
4.6.7 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx).....	50
4.6.8 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico.....	50
4.6.9 Avaliação imunohistoquímica.....	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1 ENZIMAS DE INTEGRIDADE HEPÁTICA.....	52
5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO.....	52
5.2.1 Histologia por Hematoxilina e Eosina (HE).....	52
5.2.2 Picosírius.....	54
5.4 ATIVIDADE DA ENZIMA ANTIOXIDANTE SOD.....	57
5.5 ATIVIDADE DA ENZIMA ANTIOXIDANTE CAT.....	58
5.6 ATIVIDADE DA GPx.....	59
5.7 METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO.....	60
5.8 EXPRESSÃO DE TNF- $\alpha$ .....	61
5.9 EXPRESSÃO DO NF- $\kappa$ B.....	63
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>75</b>
<b>9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

As doenças que acometem o fígado são conhecidas por representarem um dos maiores problemas de saúde pública. Neste contexto, sabe-se que a cirrose hepática está entre as doenças mais comuns e é citada por seus altos índices de mortalidade (SCHUPPAN, 2008; BONA *et al.*, 2010).

A cirrose é uma doença hepática crônica. É considerada o estágio mais avançado da fibrose levando à desestruturação do parênquima hepático com consequente desorganização da arquitetura lobular e vascular do órgão e à alteração das funções do fígado (FRIEDMAN, 2003; BONA *et al.*, 2010; LÓPEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2020).

O estresse oxidativo (EO) desempenha papel central na patogênese e na progressão de doenças crônicas como a cirrose. Os antioxidantes têm sido usados no tratamento para os danos sistêmicos e hepáticos provocados pela doença. O aumento da ativação de enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas pró-inflamatórias e vasodilatadores estão associadas com fisiopatologia da cirrose e o modelo de ligadura de ducto biliar comum (LDB) (COLARES *et al.*, 2016).

Para indução de cirrose biliar secundária e fibrose, a obstrução prolongada do ducto biliar em ratos tem se mostrado-se um modelo experimental eficaz, visto que neste modelo são estabelecidas as características próprias da doença em um período de 28 dias. Durante este tempo, a obstrução provoca uma dilatação do ducto biliar, edema e 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, causando uma desorganização do parênquima hepático (KOUNTOURAS *et al.*, 1984; VIEIRA *et al.*, 2011; COLARES *et al.*, 2022).

Os pacientes com fígado afetado pela cirrose podem apresentar metabolismo anormal de nutrientes, digestão e absorção alteradas, juntamente com um aumento do catabolismo proteico e um aumento nos requisitos de proteína-energia. Esta deficiência nutricional pode levar à uma diminuição da massa muscular esquelética, desencadeando uma sarcopenia (DHALI WAL *et al.*, 2020).

O exercício físico parece ser uma terapia útil para melhorar a capacidade funcional em indivíduos com doença hepática, mas não está claro se o exercício pode restaurar a saúde hepática e nem qual seria a quantidade e o tipo de exercício necessários. A atividade física pode ter alguma influência positiva direta na patologia hepática, além da simples modificação dos níveis de gordura no fígado. E parece que a intensidade da atividade física é importante para prevenir a progressão da doença (KEATING *et al*, 2015).

A desnutrição ocorre na cirrose e agrava-se pelo gasto energético baseado no metabolismo proteico, tendo como consequência a sarcopenia. A atividade física estimula o gasto energético baseado no metabolismo lipídico preservando as proteínas musculares, pois utiliza as reservas lipídicas sistêmicas e hepáticas. O exercício físico preserva e recupera os músculos, aumenta seu desempenho funcional, capacidade física e melhora a qualidade de vida e de maneira indireta a atividade hepática (ROSA *et al*, 2021).

A melatonina (MLT), N-acetil-5-metoxitriptamina, vem sendo muito estudada e citada em diferentes pesquisas como potente antioxidante (AOX), atuando na diminuição de radicais livres (hidroxila e peroxila), além de sua ação associada com as vitaminas C e E (MAGANHIN *et al*, 2008; ROSA *et al*, 2010). Estudos indicam que a combinação de suplementação com propriedades antioxidantes (vitaminas e enzimas) e exercício físico desempenham uma função importante na modulação de alguns parâmetros fisiológicos (DUARTE-ROJO *et al*, 2018).

Dessa forma, este trabalho procura investigar as alterações hepáticas decorrentes da cirrose bem como a possível intervenção de um tratamento antioxidante com MLT e do exercício físico nesta doença.

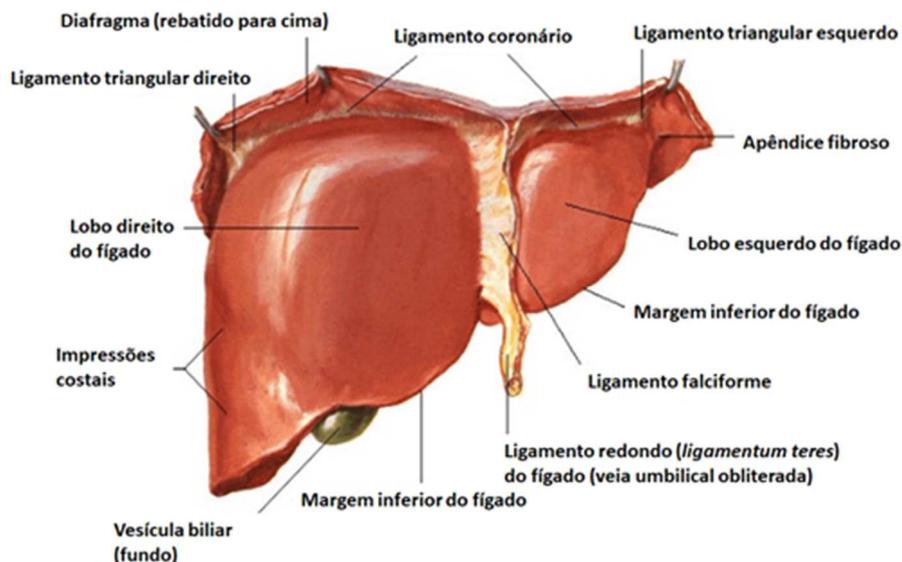
# 1 REFERENCIAL TEORICO

## 1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão interno do organismo, pesando em média 1,5 Kg e medindo cerca de 15cm em seu plano coronal e 20cm no plano transversal, e representando cerca de 3% do peso corporal de um indivíduo adulto localizado no quadrante superior direito do abdômen onde se encontra protegido pelas costelas inferiores (TRIVIÑO e ABIB, 2003; COELHO, 2012; NETTER, 2015).

Em sua morfologia, o fígado apresenta 4 lobos, sendo dois maiores e dois menores. Os dois lobos maiores, direito e esquerdo, são separados pela fissura umbilical na face inferior e pelo ligamento falciforme na face ântero-superior. Entre eles há uma nítida diferença de volume com acentuado predomínio do direito sobre o esquerdo (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura do fígado.

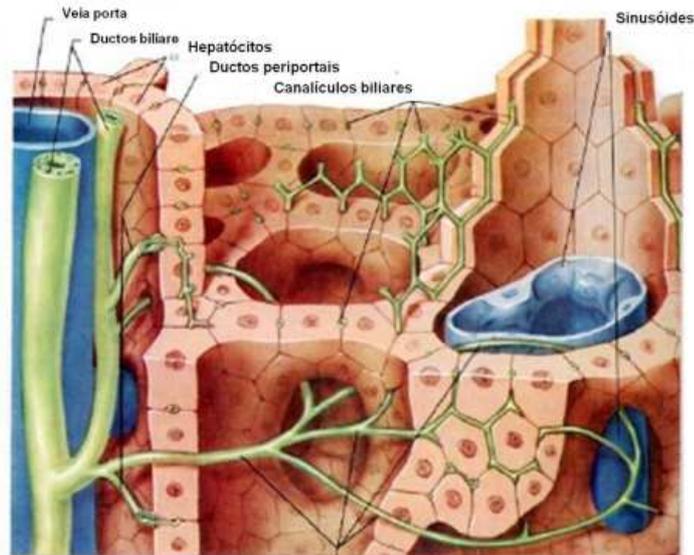


Fonte: (Netter, 2015).

O fígado é um órgão que desempenha um papel muito importante para o funcionamento e manutenção de diferentes funções vitais à saúde do organismo atuando diretamente na síntese e metabolismo de inúmeras substâncias. Para realizar suas funções este órgão apresenta uma complexa estrutura (figura 2). O

fígado é constituído principalmente por células hepáticas (hepatócitos), que se anastomosam, ou seja, ligam-se umas às outras constituindo os lóbulos hepáticos (COELHO, 2012).

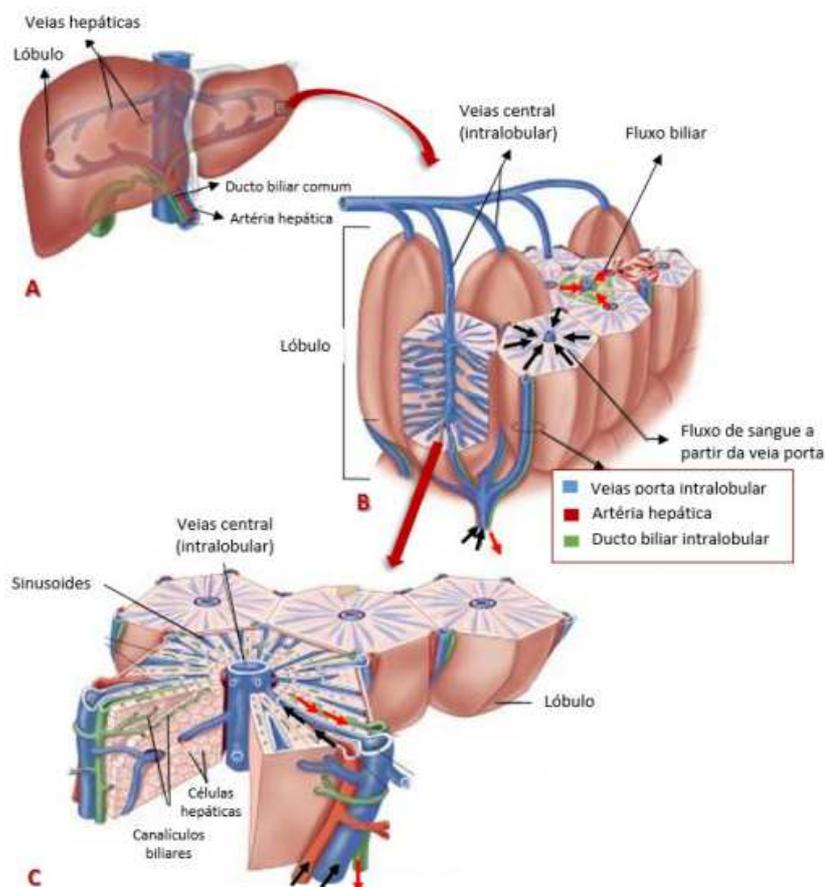
**Figura 2 - Esquema tridimensional da arquitetura normal do fígado.**



Fonte: Modificado (Gaboard M, 2011)

Cada lóbulo hepático é uma unidade funcional básica do fígado, que apresenta uma veia central onde é drenado o sangue aportado pela artéria hepática e pela veia porta (GABOARD, 2011). Nos lobos hepáticos, os hepatócitos, ou células hepáticas, dispõem-se de maneira uniforme formando placas ordenadas radialmente a partir de uma veia centrolobular e entrelaçadas de maneira ordenada por sinusóides hepáticos (Figura 3). Estes são basicamente condutos de sangue sem parede estruturada que se apresentam revestidos por células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, são conhecidos como células de Kupffer (TRIVIÑO e ABIB, 2003; TREFTS *et al.*, 2017).

**Figura 3 - Estrutura microscópica do fígado.**



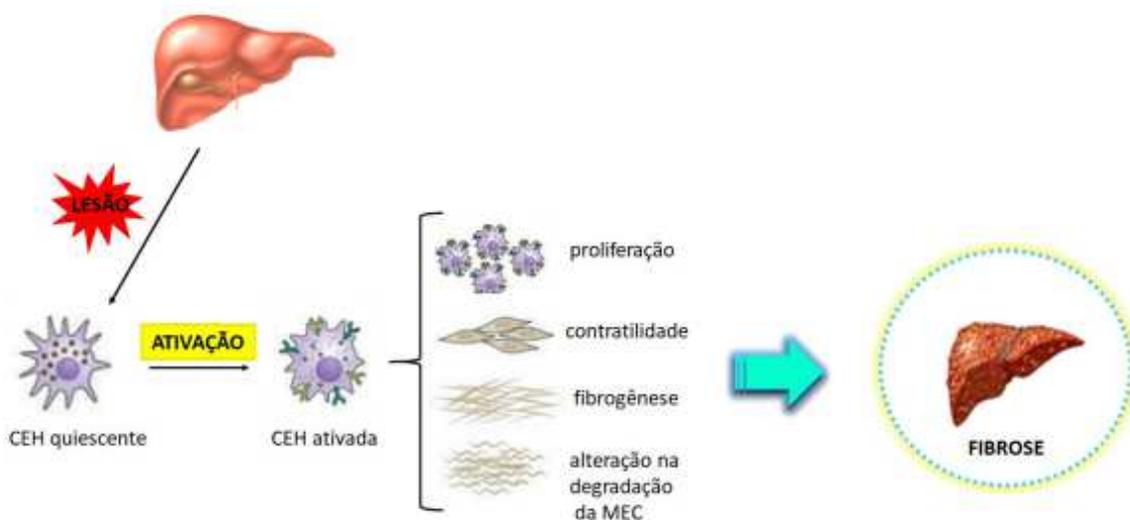
(A)Localização dos lóbulos e circulação hepática. (B) e (C) Transporte do sangue das veias porta e artérias hepáticas através dos sinusóides e distribuição de células hepáticas na direção de uma veia central em cada lóbulo (setas pretas). Formação da bile nos hepatócitos e transporte através de canaliculos biliares (setas vermelhas). Fonte: Adaptado (Patton e Thibodeau, 2013).

As células de Kupffer são macrófagos especializados que revestem os sinusóides. Estas células são conhecidas por sua função fagocitária e podem ser ativadas por diferentes fatores. Dentre estes, pode-se citar as endotoxinas, sepsis, ácido araquidônico e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre outros. Como resultado desta ativação ocorre a produção de citocinas, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), interleucinas (IL), interferon (IFN) alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e vários prostanóides (TRIVIÑO e ABIB, 2003; COELHO, 2012; BOGDANOS *et al.*, 2013; KUBES E JENNE, 2018).

Limitando o sinusóide hepático temos uma estrutura denominada espaço subendotelial de Disse. Neste são encontradas as células estreladas hepáticas (CEH). As CEHs correspondem a 15% do total de células do fígado e 30% das

células não parenquimatosas. Possuem forma estrelada e são constituídas por longas extensões citoplasmáticas responsáveis pelo controle da síntese de matriz extracelular (MEC) e pela regulação do fluxo sanguíneo (BITENCOURT *et al.*, 2012). Fisiologicamente, são conhecidas por suas propriedades contráteis e fibrogênica, além de serem o principal local de síntese de matriz extracelular (MEC) (COELHO, 2012; FRIEDMAN E ARTHUR, 2002; DEWIDAR *et al.*, 2019). As CEHs constituem uma população celular heterogênea que difere na capacidade de armazenamento de lipídeos, na expressão e organização de filamentos do citoesqueleto e no potencial para produção de MEC. Este aspecto reflete a capacidade de apresentar dois fenótipos: quiescente e ativado (figura 4) (FRIEDMAN, 2008; TREFTS *et al.*, 2017).

**Figura 4 - Célula estrelada hepática, forma quiescente e ativada.**



Fonte: Adaptado (Friedman, 2008).

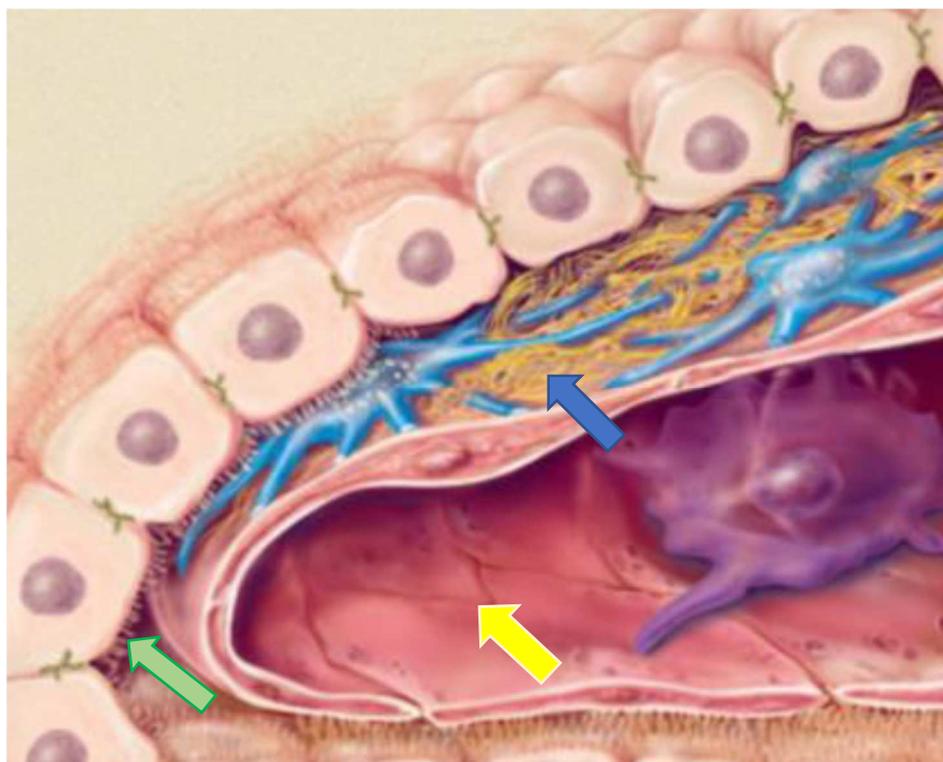
## 1.2 CIRROSE HEPÁTICA

A cirrose hepática é considerada o estágio mais avançado da fibrose levando à desestruturação do parênquima hepático independentemente do agente etiológico que produza a lesão, estando diretamente associada ao surgimento de septos e nódulos fibróticos, alterações do fluxo sanguíneo hepático, ao risco de falência hepática e alterações significativas a nível sistêmico (FRIEDMAN, 2008; LÓPEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2020).

A cirrose provoca dificuldade do sangue em transitar pelo fígado devido à resistência aumentada ao fluxo portal e à compressão das veias hepáticas terminais pela fibrose perivascular e nódulos parenquimatosos expansivos (COELHO, 2012).

Em casos de lesão hepática mais agravada, a matriz fibrilar formada a partir da ativação das CEH passa a ser acumulada no espaço subendotelial de Disse. Esta formação e depósito fibrilar nos hepatócitos resultam na perda das microvilosidades e reduzem o tamanho e número de fenestrações presentes neste espaço. Como consequência, tem-se um comprometimento da passagem de substâncias através do hepatócito, reduz o tamanho e o número das fenestrações. A colagenização do espaço de Disse resulta em menor acesso de substâncias ligadas às proteínas, ao hepatócito. Estas alterações podem ser acompanhadas pela ativação das células de Kupffer dentro dos sinusóides (figura 5) (FRIEDMAN e ARTHUR, 2002, WEISKIRCHEN e TACKE, 2014; TSUCHIDA e FRIEDMAN, 2017; DEWIDAR *et al.*, 2019).

**Figura 5 - Arquitetura hepática com injúria crônica.**



Espaço subendotelial com presença de fibrose (seta azul), perda de fenestrações (seta amarela) e microvilosidades (seta verde). Fonte: Adaptado (Friedman e Arthur, 2002)

### 1.3 CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA

A cirrose biliar secundária é uma complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas que leva a alterações estruturais e funcionais do fígado em resposta ao desequilíbrio entre os processos oxidantes e antioxidantes. A causa pode estar, após determinado período, associada a qualquer processo de obstrução do ducto biliar, sendo acompanhada pela dificuldade de eliminação da bile, pela destruição do parênquima hepático e pela fibrose progressiva (TIEPPO *et al.*, 2009).

O dano hepático colestático é característica da cirrose biliar secundária e é determinado através de parâmetros histopatológicos e bioquímicos bem definidos. Em casos em que a colestase de longa duração representa a principal causa de dano hepático, o acúmulo de ácidos biliares tóxicos exerce um papel fundamental na determinação da necrose e, com isso, da fibrose hepática (PAROLA *et al.*, 1996; PASTOR *et al.* ORELLANA *et al.*, 2000).

Os ácidos biliares são bem descritos e têm sua toxicidade atribuída a diversos mecanismos, tais como suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase  $Ca^{++}$  intracelular, a depleção de ATP e do dano mitocondrial. Trabalhos recentes sugerem que o aumento da geração de radicais livres e de citocinas pró-inflamatórias podem estar relacionados na patogênese do dano colestático hepático (COLARES *et al.*, 2016).

#### 1.3.1 Modelo experimental de cirrose biliar secundária

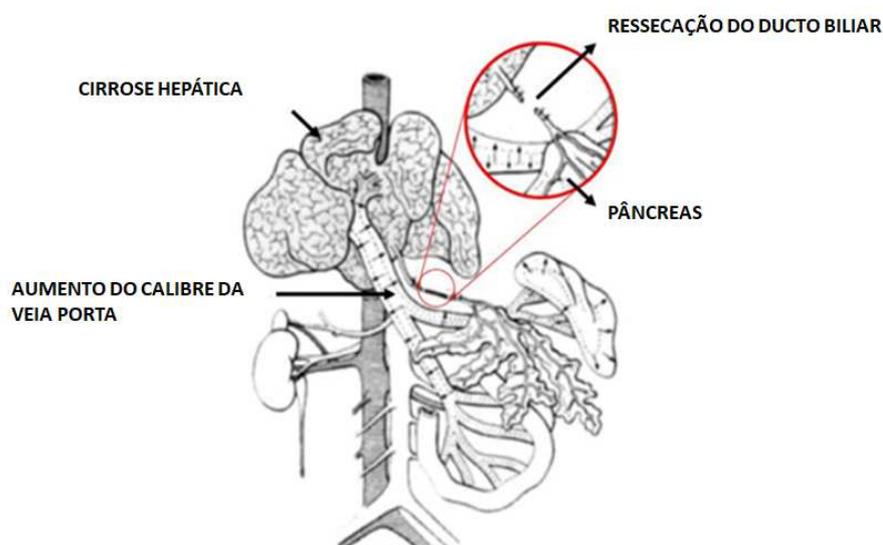
O modelo experimental de cirrose biliar secundária em ratos consiste na indução através da obstrução prolongada do ducto biliar (ligadura de ducto biliar comum). Em torno de 14 dias é possível estabelecer as características próprias da doença (KOUNTOURAS *et al.*, 1984; PERES *et al.*, 2000; TIEPPO *et al.*, 2009).

A obstrução 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 (KOUNTOURAS *et al.*, 1984; VIEIRA *et al.*, 2011).

Os ratos que são submetidos ao modelo ligadura de ducto biliar (LDB) (Figura 6) apresentam icterícia, orelhas e caudas amareladas no momento de sua morte. Além destas alterações, neste modelo é possível observar hepatomegalia e esplenomegalia, que ocorre, principalmente, em função do aumento do tecido conjuntivo, assim como do epitélio biliar e, paralelamente, também pode ocorrer o surgimento de um quadro de hipertensão portal em consequência da dilatação de veias esplênicas (TIEPPO *et al.*, 2009; BALDO *et al.*, 2011; COLARES *et al.*, 2016).

Figura 6 - Modelo experimental de LDB.



Fonte: Adaptado (Kountouras *et al.*, 1984).

Estudos realizados por Vercelino (2008) e Bosco (2019) demonstraram que os animais com cirrose induzida por LDB apresentavam hipoxemia, aumento da LPO e alteração de enzimas antioxidantes em homogeneizado de fígado e pulmão. O estudo também apresentou perda de peso em apenas duas semanas e, no final de seis semanas, uma significativa sarcopenia em relação ao grupo controle. A pesquisa relatou também que há uma redução importante na produção de síntese de proteínas.

Segundo Rosa (2021), utilizando um modelo de cirrose biliar secundária induzida por LDB, concluíram que a administração do antioxidante melatonina e exercício físico mostrou-se eficaz na redução da sarcopenia e dano oxidativo no

músculo de ratos. Colares et al. (2016), utilizando também o modelo de LDB para induzir cirrose, concluíram que a administração do antioxidante melatonina mostrou-se eficaz na redução da fibrose e dano oxidativo em fígado de ratos.

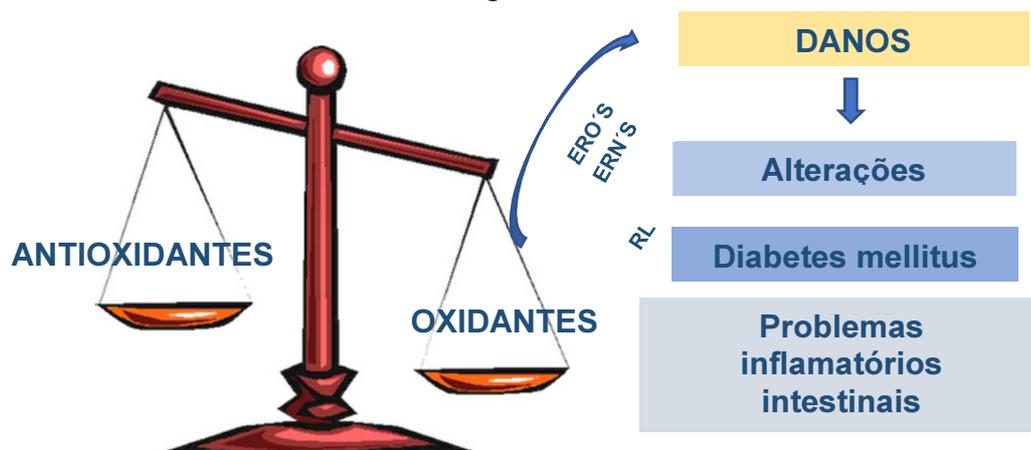
Com base nesses estudos, observa-se que o dano oxidativo pode apresentar um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da cirrose biliar secundária. Diversos estudos demonstraram que diferentes antioxidantes podem atuar de forma eficaz na redução do dano oxidativo e prevenir o desenvolvimento e a progressão da fibrose hepática, podendo ser possíveis tratamentos para pacientes no futuro (VERCELINO *et al.*, 2008; TIEPPO *et al.*, 2009; COLARES *et al.*, 2016, ROSA, 2021).

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

### 1.4.1 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é definido como um estado de desequilíbrio no qual as substâncias oxidantes estão aumentadas, excedendo o sistema de proteção antioxidante (Figura 7). Esse desequilíbrio proporciona a formação das espécies reativas de oxigênio (EROS), incluindo radicais livres e espécies reativas de nitrogênio (DRÖGE, 2002; TRACHOOTHAN *et al.*, 2008).

**Figura 7 - Desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes e possíveis danos ao organismo.**



Fonte: autora.

A oxidação causada no organismo vivo leva a uma série de alterações, dentre elas danos a biomoléculas e ao DNA, mutagênicos e citotóxicos, podendo causar instabilidade genética, que levam a doenças e até a carcinogênese, se não reparados. Os antioxidantes atuam nesse sistema de reparo prevenindo essas alterações genéticas (DIZDAROGLU, 2015). A gravidade do dano basicamente vai depender do balanço entre a geração de ERO formadas e as defesas antioxidantes.

#### 1.4.2 Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio

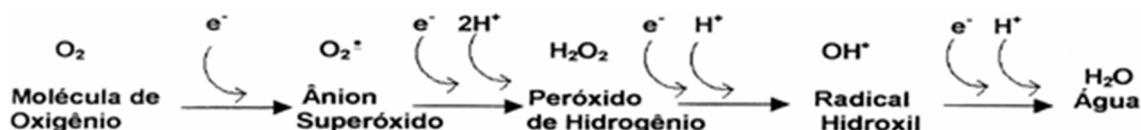
Os radicais livres (RL) são definidos como “qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que possui um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no mais externo. Quando produzidos em grandes quantidades podem agir de forma danosa nas células e organismo (HALLIWELL, 2006).

Os produtos intermediários da redução do oxigênio são o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). Tais substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) que incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 8) (BARP, *et al*, 2002).

Os danos ocasionados pelas EROS podem apresentar-se sobre os organismos aeróbicos podendo variar consideravelmente, dependendo da espécie

e estado fisiológico. Os danos também podem diferenciar-se dependendo do tipo de tecido em que atuarão (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2009). Tanto as ERO como os RL causam efeitos deletérios para a célula, tais como a lipoperoxidação (LPO), agressão às proteínas e dano ao DNA.

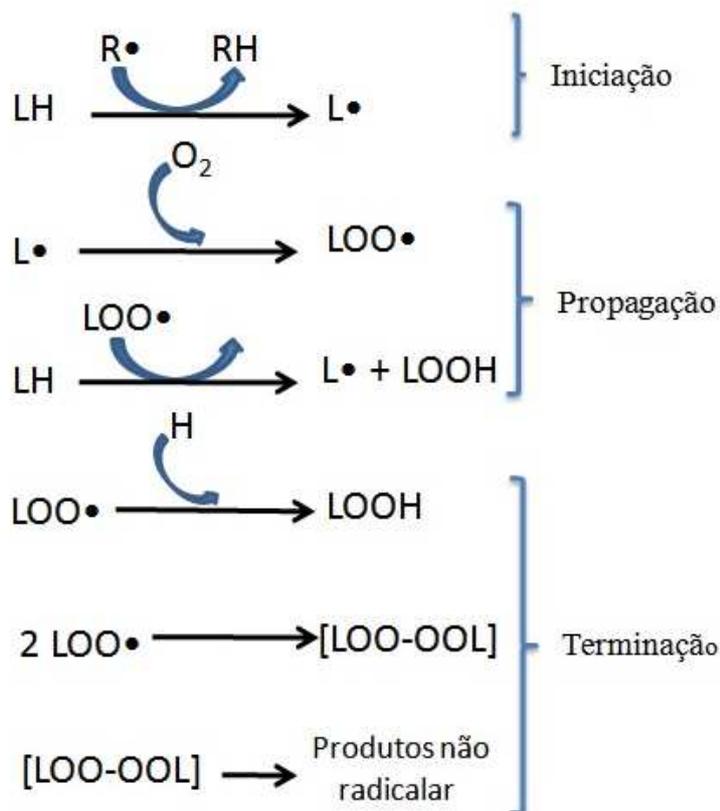
**Figura 8 - Formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres**



Fonte: Adaptada (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A LPO é a oxidação das membranas celulares pela ação dos radicais livres de oxigênio, que destrutura a integridade celular. Essa reação ocorre em cadeia com as etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é o primeiro passo dessa reação. O radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido poli-insaturado. Na fase de propagação, ocorrem duas reações: 1) o carbono radical do lipídio tende a estabilizar-se por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados que rapidamente reagem com o oxigênio formando um radical peroxil; 2) o radical peroxil capta um próton de outra molécula de lipídio, formando um hidroperóxido. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet e a carbonilas excitadas (Figura 9) (BUEGE e AUST, 1978; FARBER *et al*, 1990).

Figura 9 - Representação esquemática da reação da lipoperoxidação.



Fonte: Adaptada (Halliwell B; Gutteridge J, 2009)

### 1.4.3 Espécies Reativas de Nitrogênio

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa derivada do Nitrogênio. Esta molécula inorgânica, gasosa, é capaz de difundir-se rapidamente pelas membranas celulares e regular uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos de natureza cardiovascular, inflamatório e neuronal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2009; RANG, *et al.*, 2012).

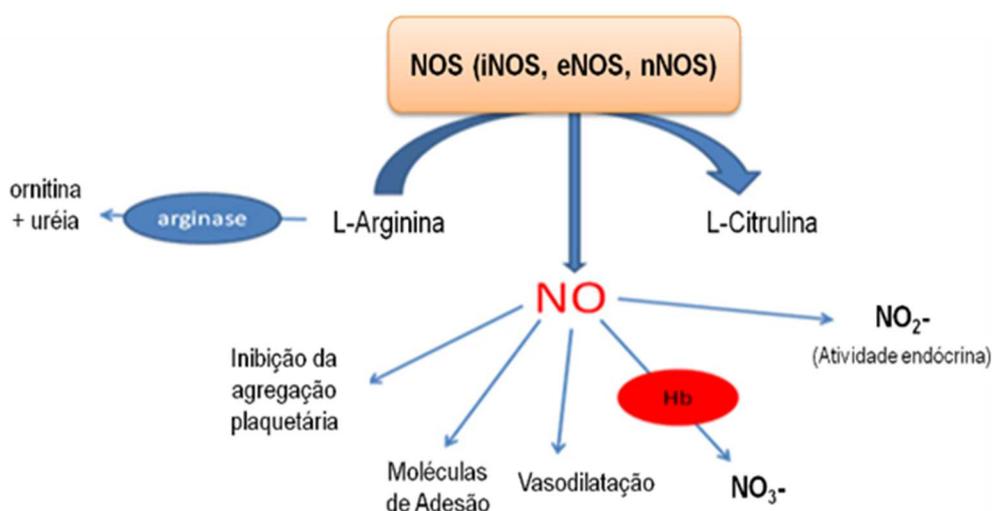
Os mecanismos de ação desta molécula podem ser divididos de acordo com a ação da molécula com sua célula alvo. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas: quando interage diretamente com a molécula do sistema alvo e quando existem intermediários que podem reagir com o NO, podendo levar à formação de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (LIAUDET *et al.*, 2000; KATZUNG, 2014).

O NO reage muito rapidamente com o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para produzir  $ONOO^{\bullet-}$ , um forte agente oxidativo e nitrosativo, e é responsável por alguns de seus efeitos tóxicos, como morte celular apoptótica e necrótica através da peroxidação lipídica (ALLAIN *et al*, 2011; IWAKIRI e KIM, 2015).

O NO é sintetizado em diferentes tecidos por meio da conversão da L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Muitas isoformas de NOS já foram identificadas em diferentes tecidos. Essas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Dessa forma, são agrupadas em duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS) e NOS induzível (i-NOS), diferindo em relação ao peso molecular, forma de ativação e capacidade de síntese de NO (FANG, 1997).

As formas constitutivas (c-NOS) são responsáveis pela produção de óxido nítrico sintase neuronal (n-NOS) e endotelial (e-NOS), essenciais para a integridade vascular, neurotransmissão nos processos de defesa do organismo, na manutenção de tecidos. No caso da iNOS ela pode ser induzida por citocinas inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo (figura 10) (LIAUDET *et al*, 2000; RIGAMONTI *et al*, 2003).

Figura 10 - Metabolismo do NO.



Fonte Adaptado (Diesen DL e Kuo PC, 2010).

A principal via metabólica do NO envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores: nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ). Estes metabólitos do óxido

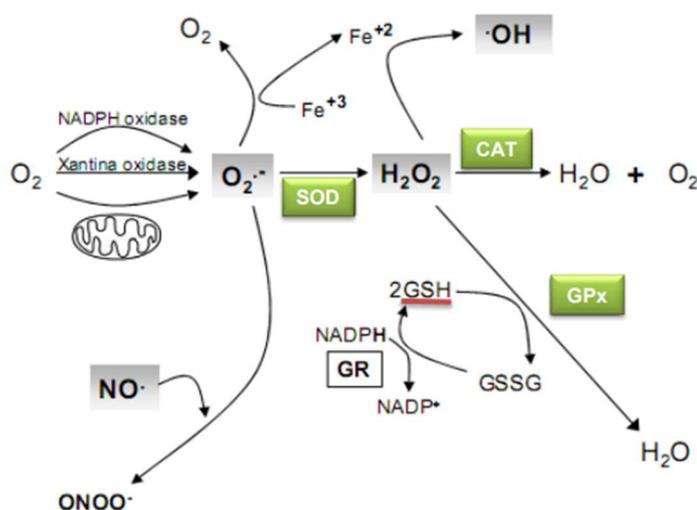
nítrico são moléculas homeostáticas centrais na biologia do NO. A detecção e quantificação precisa do nitrito em amostras biológicas tornou-se método confiável para avaliação da atividade da NOS, além da aquisição de informações sobre a origem do estímulo da síntese da NOS e com isso compreender os efeitos do NO, usando para isso o nitrito como marcador indireto dos níveis de NO em sangue e em tecidos (YAO *et al*, 2004; BRYAN e GRISHAM, 2007; BELLAVIA *et al*, 2015).

## 1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES

O sistema de defesa antioxidante tem função de prevenir a formação de radicais livres e de neutralizar os danos oxidativos. Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável (macromoléculas como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA), atrasa ou impede a oxidação daquele substrato (Figura 11).

Dentre esses sistemas de defesa, encontramos o enzimático, formado por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona s-transferase (GST); e/ou não enzimático, como o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), flavonóides e  $\beta$ -carotenos (HALLIWELL, 2007).

Figura 11 - Ação das enzimas antioxidantes.

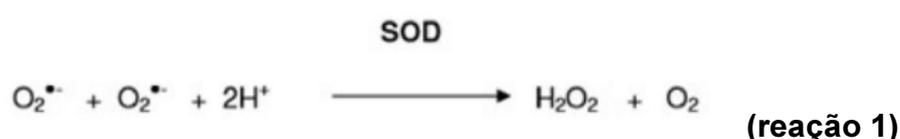


Fonte: Adaptada (Bona *et al*, 2012).

### 1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

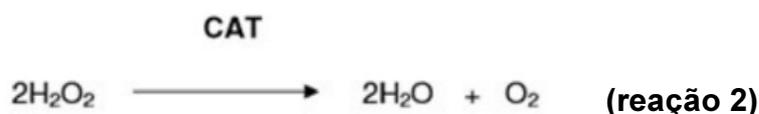
As defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se espalhadas por todo organismo, tanto no meio intracelular como no extracelular. Este sistema de defesa é encarregado da detoxificação de ERO, este formado por muitas enzimas e dentre elas estão: SOD, CAT e GPx (HALLIWELL, 2007).

A enzima SOD é responsável pela dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo o primeiro menos reativo e assim facilmente degradado por outras enzimas (Reação 1).



O  $H_2O_2$  formado pela ação da enzima SOD, apesar de não ser um RL, reage originando o radical hidroxila  $OH^{\bullet}$ . Assim, a remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL, 2006).

A remoção dos peróxidos é realizada pelas enzimas CAT e GPx. A CAT é uma enzima que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Reação 2).



Dentre as peroxidases, destaca-se a enzima glutathiona peroxidase (GPx), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathiona redutase (GR) com consumo de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) (HALLIWELL, 2007).

### 1.5.2 Antioxidantes Não Enzimáticos

O sistema de defesa antioxidante não enzimático, como as defesas antioxidantes enzimáticas, atua removendo as ERO, impedindo danos às membranas celulares. Existem substâncias exógenas que atuam desta mesma forma impedindo que ocorra uma reação em cadeia com consequente LPO (HALLIWELL, 1994).

Algumas substâncias antioxidantes não enzimáticas destacam-se. Dentre essas estão a vitamina C e E, os carotenoides, os flavonoides e a glutathione. A glutathione é um tripeptídeo de ácido  $\alpha$ -glutâmico, cisteína e glicina cuja ação deve-se à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons. Esta participa de reações enzimáticas tal como a glutathione peroxidase e a transferase. Deste modo, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de espécies reativas de oxigênio através de uma via não enzimática (HALLIWELL, 2006).

O uso de substâncias antioxidantes na prevenção ou tratamento de diferentes doenças relacionadas ao estresse oxidativo parece ser uma alternativa viável na tentativa de minimizar ou reverter os danos. Uma das substâncias com tais propriedades, que vem sendo muito citada e utilizada em diversos estudos, é a melatonina.

## 1.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório hepático é ativado para proteger os hepatócitos, pois favorece a reparação dos danos nos tecidos e promove o restabelecimento da homeostase. Pode ser ocasionado por indutores exógenos, tais como: microrganismos, alérgenos e agentes tóxicos; e por indutores endógenos liberados por células necrosadas ou a partir da ruptura da membrana plasmática (MEDZHITOV, 2008; HERNAEZ *et al.*, 2017).

Respostas inflamatórias crônicas, ou seja, por longo período e mais intensas estão invariavelmente acompanhadas por perda maciça de hepatócitos, o que causa grave dano ao parênquima hepático, frequentemente irreversível. A resposta inflamatória está envolvida na vasodilatação, no estresse oxidativo e nitrosativo

potencializando os efeitos citotóxicos, agravando o quadro geral de diferentes doenças.

As reações inflamatórias são mediadas por peptídeos hidrossolúveis denominados citocinas. Elas constituem uma complexa rede de comunicação entre as células efectoras do sistema imune (ZHANG e AN, 2007).

### **1.6.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  está entre as principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios. Possui efeitos biológicos como a ativação de macrófagos e neutrófilos e aumento das moléculas de adesão envolvidas com o rolamento dos leucócitos, diferenciação celular e apoptose (AGGARWAL, 2003; JIANG *et al.*, 2013; KOYAMA e BRENNER, 2017).

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por monócitos, macrófagos, CEH e células de Kupffer, apresentando atividades pró-inflamatórias e efeitos citotóxicos nessas células (YANG e SEKI, 2015). No processo de fibrose hepática, o TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na ativação das CEH e na síntese de MEC (BONA *et al.*, 2012; COLARES *et al.*, 2016).

Em um fígado normal a expressão de mediadores inflamatórios é baixa, estando aumentada nos hepatócitos e células inflamatórias em várias doenças agudas e crônicas hepáticas, incluindo a cirrose. O TNF- $\alpha$  parece ser um mediador importante por levar à ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (BORGES, 2010; CERRETANI *et al.*, 2011).

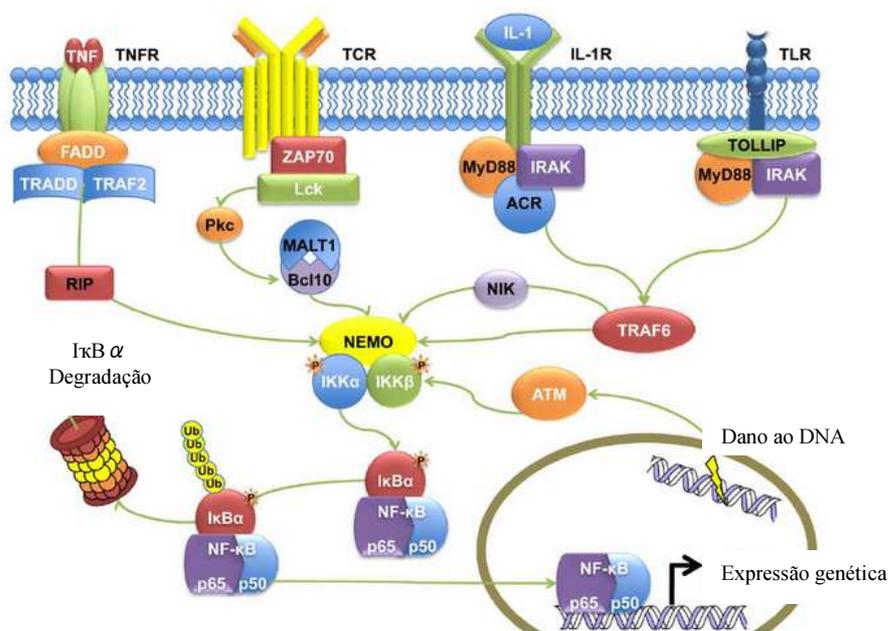
### **1.6.2 Fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B)**

O NF- $\kappa$ B corresponde à uma família de proteínas que atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma grande variedade de genes. Atualmente, são cinco as proteínas que constituem a família NF- $\kappa$ B em mamíferos, identificadas por compartilharem entre si um domínio amino-terminal de homologia REL (RHD–REL homology domain), compreendendo cinco subunidades chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB. Geralmente o NF- $\kappa$ B consiste em dois polipeptídeos: um

de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65) (ZINGARELLI *et al*, 2003; ESPINOSA-DIEZ *et al*, 2015).

O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por uma variedade de sinais resultantes de fisiopatologia inflamatória. Esse fator regula a expressão de agentes envolvidos em muitos processos celulares, aumentando a taxa de transcrição de genes. A ativação do complexo NF- $\kappa$ B contribui com maior expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios (citocinas, enzimas, receptores imunológicos e moléculas de adesão) além de iniciar a transcrição de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-2 e IL-6 (Figura 12) (ZINGARELLI *et al*, 2003; KWAK *et al*, 2011).

Figura 12 - Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B.



Fonte: adaptado de Hayden MS e Ghosh S, 2008.

## 1.7 MELATONINA

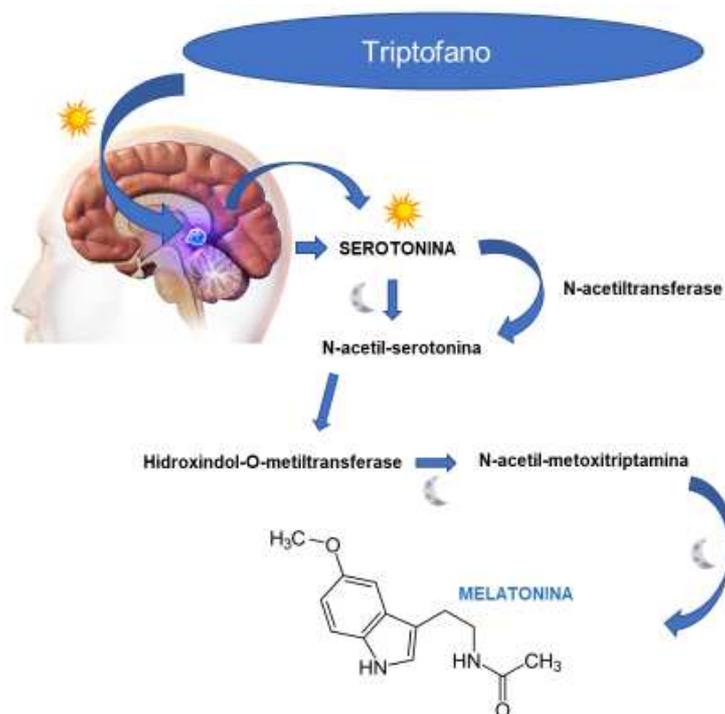
A Melatonina (MLT - N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio descoberto em 1958 pelo dermatologista Aaron Lerner e recebeu este nome devido à sua capacidade de contração dos melanóforos de melanócitos de sapos, resultando no

clareamento da pele desses animais (NOWAK e ZAWILSKA, 1998; ACUÑA-CASTROVIEJO *et al*, 2014).

A MLT é uma indolamina lipofílica sintetizada a partir da serotonina, que é proveniente do aminoácido triptofano, produzida na glândula pineal de maneira rítmica, sendo sua produção inibida pela luz, produzida exclusivamente à noite (Figura 13). Quando secretado, este hormônio distribui-se por diversos tecidos do corpo sem ser estocado.

Além da regulação do sono, a MLT exerce efeitos neuroprotetores junto ao sistema nervoso central para a sobrevivência e proliferação de células tronco em doenças neuroinflamatórias (HICKMAN *et al*, 1999; CLAUSTRAT e LESTON, 2015; SONG *et al.*, 2015).

**Figura 13 - Esquema das reações para produção da melatonina**



Fonte: Adaptado (Colares *et al*, 2022)

A MLT pode ser encontrada em diversos alimentos. Nas plantas a produção de deste hormônio ocorre da mesma forma que em humanos, utilizando triptofano

em resposta aos fatores abióticos geradores de estresse, influenciando inclusive nos processos essenciais para a sobrevivência (REITER *et al.*, 2015).

Sua metabolização ocorre primeiramente no fígado (90%) onde o seu principal metabólito formado, a 6-sulfatoximelatonina, excretada na urina humana cujos níveis refletem a atividade da glândula pineal. Uma pequena quantidade de MLT pode ainda ser convertida em N-acetil-5-metoxiquinurenamina no sistema nervoso central, 2 a 3% da concentração inicialmente produzida (BRZEZINSKI, 1997; ZHDANOVA e WURTMAN, 2005).

O efeito antioxidante da MLT vem sendo citado em inúmeros estudos em diferentes modelos experimentais. O efeito antioxidante da MLT está relacionado à sua alta solubilidade em lipídeos, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, atravessando a barreira hematoencefálica (NETO e CASTRO, 2008; BONNEFONT-ROUSSELOT e COLLIN, 2010; TAN *et al.*, 2015). Estudos também sugerem que a MLT possui efeitos anti-inflamatórios, imunomodulador e associados à resistência à insulina (CARRILLO-VICO *et al.*, 2005; BONA *et al.*, 2012).

## 1.8 EXERCÍCIO FÍSICO

Poucos ensaios clínicos publicados foram exclusivamente dedicados ao exercício em pacientes com cirrose. Contudo, pequenos estudos relataram melhoras significativas na saúde muscular (massa, força e capacidade funcional), qualidade de vida, fadiga e reduções no gradiente de pressão venosa hepática. Consistente com a literatura mais ampla sobre doenças crônicas, a evidência do benefício do exercício na cirrose torna-se promissora (TANDON *et al.*, 2018).

As alterações na composição corporal, em particular a sarcopenia, é uma complicação da cirrose hepática associada a desfechos adversos, aumentando o risco de desnutrição e perda de massa muscular. A sarcopenia, por sua vez, é frequentemente inter-relacionada com a desnutrição (LAUBE *et al.*, 2018). Pacientes cirróticos que desenvolvem sarcopenia apresentam sintomas de fadiga muscular, processo este influenciado por vários mecanismos, como a concentração

de substratos metabólicos, alterações no fluxo sanguíneo e aumento nas espécies reativas de oxigênio, que prejudicam a função muscular contrátil. Uma das definições da fadiga muscular é a incapacidade para manter a força da contração muscular por certo tempo (TOMA *et al.*, 2018).

A capacidade física prejudicada tem amplas implicações prognósticas na cirrose, principalmente na mortalidade. Estudos atuais evidenciam a ligação dos vários domínios de comprometimento à mortalidade em pacientes com cirrose. O treinamento físico é conhecido por reduzir a progressão ou reverter a perda muscular e vem demonstrando-se eficaz na melhora da fragilidade na cirrose.

Durante o exercício físico ocorrem diversas adaptações fisiológicas, sendo necessários ajustes cardiovasculares e respiratórios para compensar e manter o esforço realizado (KOURY *et al.*, 2003). O consumo do oxigênio ( $O_2$ ) pode aumentar até 20 vezes mais durante uma atividade física e sua captação pelos músculos ativos pode aumentar em até 100 vezes, favorecendo a formação de EROS, levando ao estresse oxidativo (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2009). Nesse caso, algumas dessas espécies reativas, tais como radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) podem produzir danos como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Os peróxidos lipídicos oxidam colesterol aumentando a produção de LDL oxidada. É possível controlar a formação de radicais livres pela ação de antioxidantes. Diversos estudos examinam o efeito dos exercícios, o poder antioxidante e a peroxidação lipídica. Em geral, há indicações de que exercício agudo e extenuante pode aumentar a peroxidação lipídica e que a participação regular no treinamento físico pode aumentar o poder dos antioxidantes (SCHNEIDER *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2005).

Segundo Kruger (2018), o exercício vem sendo considerado um excelente modelo para o estudo das respostas do organismo aos eventos estressantes, assim como da capacidade de seres humanos adaptarem-se ao estresse oxidativo. Contudo, poucas pesquisas que buscam determinar com precisão as diferentes intensidades de esforço durante os exercícios, como a natação e suas específicas respostas e melhoras aos sistemas neuromusculares, são encontradas (YANG *et al.*, 2017).

Estudos experimentais que utilizam a natação como modalidade de treinamento muscular apresentam uma enorme variedade de protocolos, que vão desde treinamentos intermitentes de 15 segundos nadando e 15 de repouso até os exaustivos treinamentos contínuos de 2 horas de natação. Devido às diversas complicações e importante declínio funcional que a doença hepática apresenta, este estudo seguiu um protocolo de baixa intensidade para evitar óbitos por exaustivos treinamentos, assemelhando-se ao realizado nos estudos de Bertolini (2011).

Este pesquisou o efeito da natação na dor ciática de ratos, e o recente trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa de Rosa (2021), que buscou compreender os efeitos do exercício físico juntamente com o antioxidante melatonina sobre o músculo de ratos cirróticos, avaliando os processos envolvidos na sarcopenia.

De acordo com essas considerações, este estudo analisou a ação da melatonina e do exercício físico no fígado dos animais submetidos ao modelo de ligadura de ducto biliar (LDB), avaliando o estresse oxidativo e processo inflamatório.

## 2 JUSTIFICATIVA

A cirrose é o estágio final da fibrose hepática e representa a 14<sup>a</sup> causa de morte no mundo. A doença modifica a função hepática e afeta, entre outros, o tecido muscular, causando significativa perda de massa muscular, que atinge níveis patológicos caracterizando a sarcopenia. Com os altos índices de pacientes cirróticos e as inúmeras complicações decorrentes da doença, faz-se necessária a utilização de novos tratamentos, mais precoces e eficazes, a fim de controlar ou retardar a doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

A compreensão atual dos mecanismos relacionados à cirrose hepática e à fisiopatologia das complicações associadas é, em grande parte, baseada em modelos experimentais de doença hepática. O modelo de cirrose biliar secundária tem mostrando-se um método versátil, viável e com boa reprodutibilidade devido ao seu baixo custo e mortalidade. Se comparados a outros métodos de indução, tem sido amplamente utilizado para o estudo dos processos patológicos decorrentes da doença, bem como para o estudo de novas alternativas de tratamento.

Esta pesquisa está direcionada à área de fisiologia digestiva com enfoque em modelo experimental relacionado ao estresse oxidativo, os benefícios do exercício físico e a possível proteção de um tratamento antioxidante com uso da melatonina. A utilização deste antioxidante baseia-se em trabalhos já realizados pelo grupo de pesquisa, sendo utilizado devido aos seus efeitos benéficos já observados em diferentes modelos experimentais.

Neste estudo pretendemos avaliar os possíveis marcadores biológicos e mecanismos envolvidos no processo da doença, investigando as alterações no tecido hepático, frente ao uso de melatonina e do exercício físico na tentativa de prevenir e/ou retardar o desenvolvimento da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação da melatonina e do exercício físico no fígado de ratos cirróticos submetidos ao modelo experimental de ligadura de ducto biliar (LDB).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a integridade hepática através da análise das enzimas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) no sangue de ratos tratados e não tratados com melatonina e exercício físico.
- Avaliar as alterações histológicas pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e picrosírius no fígado dos animais submetidos à LDB e à ação da MLT e do exercício físico.
- Determinar a lipoperoxidação no fígado através da técnica de TBARS e a ação da MLT e do exercício físico.
- Avaliar as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado de animais submetidos à LDB e à ação da MLT e do exercício físico.
- Determinar os metabólitos do óxido nítrico (nitritos/nitratos) no fígado e a ação da MLT e do exercício físico.
- Analisar os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B no fígado de animais submetidos à LDB e à ação da MLT e do exercício físico;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo apresenta caráter experimental comparativo caracterizado como indução cirúrgica da cirrose hepática através do modelo de ligadura de ducto biliar desenvolvido no Biotério da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). As análises foram realizadas no Centro de Pesquisa Experimental - Laboratório Experimental de Ciências Pneumológicas e Inflamação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) sob o protocolo nº 2018/516. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. As análises foram realizadas a partir de amostras de sangue e de tecido hepático que já foram coletadas e foram devidamente armazenadas.

### 4.3 TAMANHO DA AMOSTRA E ANIMAIS

O cálculo do tamanho da amostra baseou-se em estudos anteriores do grupo nos quais, para detectar diferenças com magnitude (tamanho de efeito: E/S) igual a 2,0 unidades de desvio-padrão no balanço oxidativo, mantendo-se  $\alpha = 0,05$  e poder de 90%, foram calculados 6 ratos por grupo, escolhidos aleatoriamente (COLARES *et al.*, 2016).

Foram utilizados 48 ratos machos Wistar pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério da ULBRA. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 47x34x18cm forradas com maravalha, em ciclo de doze horas claro/escuro e temperatura de  $22 \pm 2$  °C. A água e a ração foram administradas livremente.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais:

**Grupo CO (Controle):** submetido à simulação da cirurgia de LDB;

**Grupo CO+MLT** (Controle + Melatonina): submetido à simulação da cirurgia de LDB e tratamento com MLT;

**Grupo CO+EX** (Controle + Exercício): submetido à simulação da cirurgia de LDB e realização de exercício físico através de natação;

**Grupo CO+MLT+EX** (Controle + Melatonina + Exercício): submetido à simulação da cirurgia de LDB, tratamento com MLT e realização de exercício físico através de natação;

**Grupo LDB** (Ligadura de Ducto Biliar): submetido à cirurgia de LDB;

**Grupo LDB+MLT** (Ligadura de Ducto Biliar + Melatonina): grupo submetido à cirurgia de LDB e tratamento com MLT;

**Grupo LDB+EX** (Ligadura de Ducto Biliar + Exercício): submetido à cirurgia de LDB e realização de exercício físico através de natação.

**Grupo LDB+MLT+EX** (Ligadura De Ducto Biliar + Melatonina + Exercício): submetido à cirurgia de LDB e ao tratamento com MLT e realização de exercício físico através de natação.

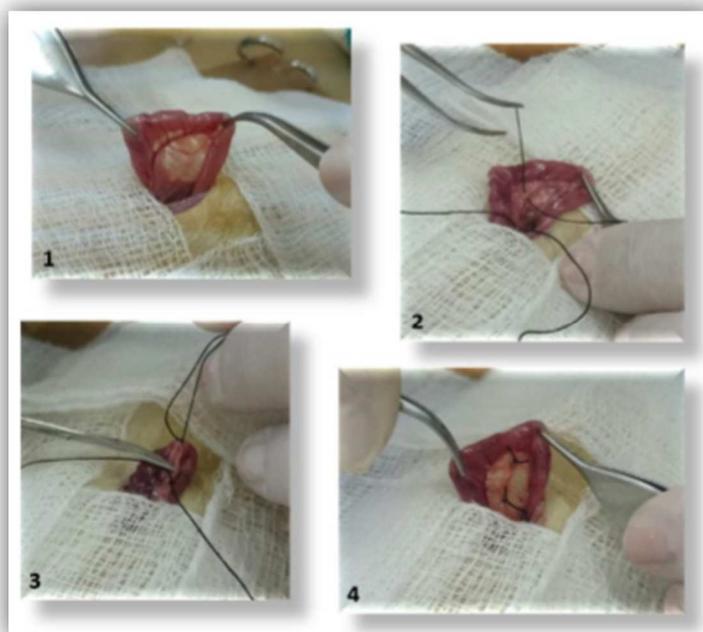
#### 4.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAIS

##### 4.5.1 Ligadura do ducto biliar

Os animais foram pesados e anestesiados mediante a administração de fármacos anestésicos (Xilazina e Cetamina) por via i.p. Em seguida, passaram por tricotomia, desinfecção da região abdominal e pela laparotomia para 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 ele (figura 14). A sutura do tecido muscular foi realizada com pontos

contínuos, com fio absorvível 4.0 do tipo poliglactina. A pele foi suturada com pontos isolados com fio não absorvível 5.0 do tipo nylon monofilamentado. Os animais dos grupos CO, CO+MLT, CO+EX e CO+MLT+EX não foram submetidos à LDB, sendo realizada somente manipulação do ducto mediante o estresse cirúrgico. No 29º dia os animais foram mortos por exsanguinação sob anestesia profunda.

**Figura 14 - Cirurgia de ligadura de ducto biliar.**

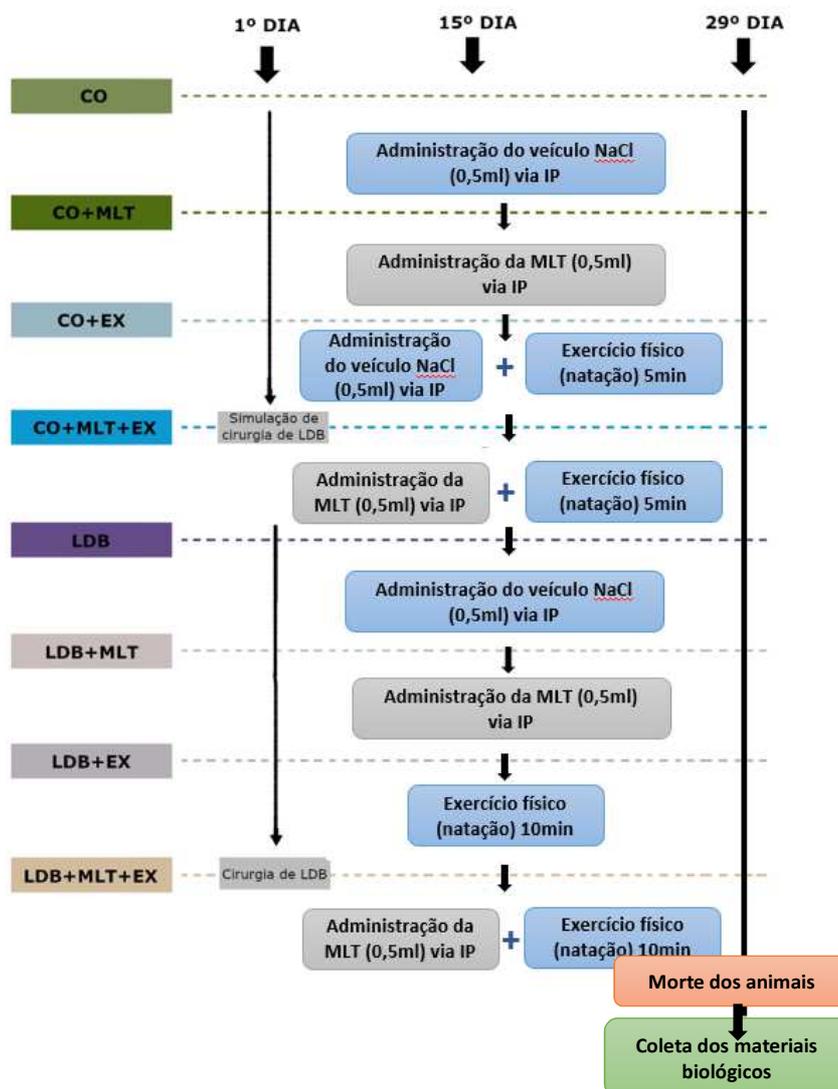


Em 1 observa-se a localização do ducto biliar, em 2 a passagem do fio seda, em 3 a amarração e a secção entre eles, e em 4 o procedimento concluído. Fonte: Colares *et al.*, 2016.

#### **4.5.2 Administração da Melatonina e do veículo**

A MLT e o veículo foram administrados via i.p a partir do 15º dia após a LDB ou simulação, conforme o grupo, diariamente, durante 14 dias. Os animais dos grupos CO e LDB receberam solução fisiológica (NaCl 0,9%) na dose de 0,5 mL. Já os animais do grupo CO+MLT e LDB+MLT receberam a melatonina que foi pesada e preparada diariamente sempre sob proteção da luz na dose de 20 mg/Kg de peso corporal, sendo diluída utilizando-se uma mistura de 5 µL de etanol 1% e 0,5 mL de NaCl 0,9% (Grigorov L, et al, 2014).

Figura 15 - Delineamento experimental.



Fonte: autora.

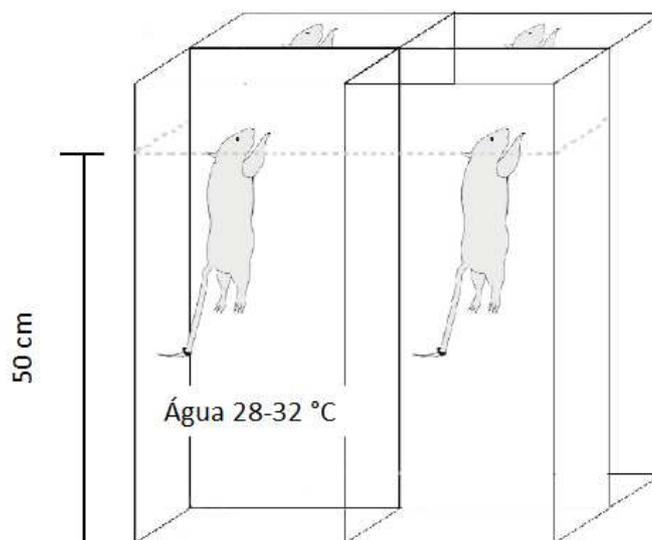
#### 4.5.3 Realização do exercício físico

O exercício físico iniciou a partir do 15º dia após o procedimento cirúrgico de LDB ou simulação dos controles, diariamente até o 28º dia. Os animais foram colocados para nadarem em pares em uma caixa de 60x40 cm com 50 cm de profundidade mantendo a temperatura entre 28-32°C, controlada com termômetro, e lá mantidos por 10 minutos, todos os dias (figura 16).

Após a natação, os ratos foram secados individualmente com toalha e secador para evitar quaisquer outras complicações. Os animais dos grupos CO, CO+MLT, LDB, LDB+MLT realizaram apenas uma simulação da atividade física.

Os ratos foram colocados em tanque com água com apenas 5 cm de profundidade na mesma temperatura de 28-32°C durante 5 minutos (BERTOLINI *et al.* 2011; ROSA *et al.*, 2021).

**Figura 16 - Ilustração do programa de treinamento aeróbio de natação.**



Fonte: Adaptada (Júnior, 2015).

#### **4.5.4 Obtenção das amostras de sangue e tecidos**

Ao final do experimento, no 29º dia, os animais foram novamente anestesiados com Cetamina e Xilazina. O sangue foi coletado pela técnica de punção cardíaca e o fígado foi coletado para as análises estabelecidas. Os animais foram mortos por exsanguinação sob anestesia profunda.

#### **4.5.5 Descarte das carcaças**

As carcaças dos animais foram acondicionadas em embalagens apropriadas e mantidas em freezer para posterior descarte, seguindo as orientações da Instituição.

## 4.6 ANÁLISES

### 4.6.1 Avaliação da integridade hepática

Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas pelo teste cinético ultravioleta. A fosfatase alcalina (FA) foi quantificada pelo teste colorimétrico cinético. Os níveis dessas enzimas foram medidos utilizando métodos laboratoriais de rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através de método enzimático automatizado (Siemens Advia 1800 Chemistry system).

### 4.6.2 Análise histológica

Para o exame histológico, após a dissecação anatômica do fígado de cada animal, cerca de 2cm foram removidos para avaliação histológica. Os tecidos coletados foram em seguida imersos em formol 10% para sua fixação, mantidos tamponados por 24h, seguido de processamento histológico (desidratação em uma série graduada de álcool de seis concentrações, compensando em xilol em duas concentrações, e incorporação em parafina a 64°C).

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo na espessura de 6µm. Posteriormente foram realizadas as técnicas de coloração por Hematoxilina-Eosina, o qual evidencia dano no tecido hepático e coloração por Picrosírius. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular Nikon Labophot em diferentes aumentos no Serviço de Patologia do HCPA - Porto Alegre.

### 4.6.3 Preparação do homogeneizado e dosagem de proteína

Foram utilizados solução tampão fosfato (KCl1,15%) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) na concentração de 100mM em isopropanol. O tecido foi homogeneizado em ULTRA-TURRAX e centrifugado em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi utilizado para posteriores análises bioquímicas. A concentração de proteínas nos homogeneizados foi determinada através do método de Bradford (1976).

#### **4.6.4 Avaliação da lipoperoxidação**

A lipoperoxidação foi determinada por meio da técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com conseqüente formação de um produto de coloração rósea medido em espectrofotômetro a 535nm (MIRSA E FRIDOVICH, 1972). A quantidade de aldeídos gerados pela peroxidação lipídica (LPO) foi determinada por um método que mede a quantidade de reatividade do ácido tiobarbitúrico. O ácido tiobarbitúrico (TBA) foi adicionado às amostras a 0,37% enquanto o ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado a 15% usado para desnaturar as proteínas presentes e acidificar a reação.

As amostras foram incubadas a 100°C por 15min e, após, resfriadas em gelo por cerca de 5min. Após resfriar as amostras, 1,5mL de álcool n-butílico foi adicionado para extrair o pigmento formado. As amostras foram agitadas por 45 segundos e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A absorvância foi determinada por espectrofotometria a 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa como nmol/mg de proteína (BUEGE e AUST 1978).

#### **4.6.5 Atividade da Enzima Antioxidante Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade enzimática da SOD foi medida avaliando a capacidade da enzima em inibir a reação do radical superóxido com adrenalina. A leitura foi realizada a 480 nm. Os dados são expressos em unidades de SOD /min/mg prot (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

#### **4.6.6 Atividade da Enzima Antioxidante Catalase (CAT)**

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada medindo a diminuição da absorção em meio de ação contendo 50 mmol/L de solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2) e 0,3 mol/ L de peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática foi analisada espectrofotometricamente a 240nm e expressa como pmol/mg de proteína (BOVERIS e CHANCE, 1973)

#### **4.6.7 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi avaliada pela taxa de oxidação do NADPH na presença de glutathione reduzida e de glutathione redutase. A medida foi realizada em espectrofotômetro à 340nm e, e sua atividade expressa em mmol/min/mg prot (GRANGER *et al*, 1999).

#### **4.6.8 Avaliação dos Metabólitos do Óxido Nítrico**

A produção de óxido nítrico foi medida indiretamente através de um teste quantitativo colorimétrico baseado na redução enzimática dos nitratos a nitritos. A leitura foi realizada a 540nm e os resultados expressos em mmol de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> (TICE *et al*, 2000).

#### **4.6.9 Avaliação imunohistoquímica**

As amostras de tecido hepático foram fixadas em formol a 10% e colocadas em um processador histológico de tecidos (ANCAP) através de uma série graduada de etanol e dois cubas de xileno para desidratação e reidratadas com diferentes graus etanólicos. Os espécimes foram então embutidos e os blocos foram resfriados, modelados e ligados a um micrótomo (Leitz® 1512) para obter fatias de 4 µm de espessura. Foram incubados com anticorpos (NF-κB e TNF-α) (Santa Cruz Biotechnology®).

Os resultados foram avaliados por patologista através de microscópio equipado com câmera digital para captura de imagens (NIKON LABOPHO), microscópio binocular com ampliação de 200×. O nível foi determinado multiplicando a densidade média da imagem pela porcentagem área corada positivamente pelos anticorpos (áreas de cor marrom obtidas pela reação peroxidase + diaminobenzidina).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média e calculados através do *software Graphpad Instat*, versão 3.0 para Windows®. Realizada análise de variância (ANOVA *One-Way*) seguida do teste de *Student-Newman-Keuls*, sendo o nível de significância adotado de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Ainda há poucos estudos publicados em modelos de animais cirróticos que utilizam o exercício como um possível tratamento para diminuir os efeitos deletérios da cirrose. Neste estudo buscamos compreender os mecanismos intrínsecos envolvidos na fisiopatogênica da doença, bem como os processos de mediação à regeneração do fígado.

Em estudos futuros pretendemos ampliar a compreensão destes mecanismos buscando compreender o eixo-fígado-intestino. A patogênese de uma série de doenças intestinais envolve um desequilíbrio na regulação da permeabilidade da barreira intestinal. Esse desequilíbrio promove também a progressão de várias doenças hepáticas. Neste sentido, buscamos avaliar os mecanismos envolvidos no eixo fígado-intestino analisando as alterações frente ao uso da melatonina e do exercício físico na tentativa de prevenir e/ou retardar as consequências da cirrose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD RL; DIDIO LJA. Radicais livres e oxidação na atividade física. In: Ghorayeb N, Barros Neto TL. O exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos especiais e preventivos. São Paulo: **Atheneu**; 1999. p.87-95

ACUÑA-CASTROVIEJO D *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2014;71(16):2997-3025.

AGGARWAL BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**. 2003;3(9):745-56.

ALLAIN, AV. *et al.* Role of nitric oxide in developmental biology in plants, bacteria, and man. **Current topics in pharmacology**, v. 15, n. 2, p. 25, 2011.

AMÁLIA PM. *et al.* A quercetina previne o estresse oxidativo em ratos cirróticos. **Digestive Diseases and Sciences**, 2007; 52: 2616-2621 [PMID: 17431769 DOI: 10.1007/s10620-007-9748-x]

ANTUNES BMM. *et al.*, Arterial Thickness and Immunometabolism: The Mediating role of Chronic Exercise. **Current Cardiology Reviews**. 2016;12(1):47-51.

BALDO G. *et al.* Ligação. **Journal of Cell Science & Therapy**. 2011;2:112.

BARP J. *et al.* Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2002;35(9): 1075-81.

BELLAVIA, L. *et al.* Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo. **Future science OA**, v. 1, n. 1, 2015

BERTOLINI GRF. *et al.* Treinamento com natação sobre a avaliação funcional da nocicepção ciática em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 2011;51(3):249-59.

BHANJI RA *et al.* A longa estrada sinuosa para o transplante: como a sarcopenia e a debilidade afetam a morbidade e a mortalidade na lista de espera. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. 2017; 15 :1492–1497. doi: 10.1016/j.cgh.2017.04.004.

BLOOMER, RJ. Efeito do exercício em biomarcadores de estresse oxidativo. **Avanços em Química Clínica**, v. 46, p. 1-50, 2008.

BOGDANOS DP; Gao B; Gershwin ME. Imunologia hepática. **Comprehensive Physiology**. 2013;3(2):567-98.

BONA S. *et al.* Efeito do tratamento antioxidante na fibrogênese em ratos com cirrose induzida por tetracloreto de carbono. **ISRN Gastroenterology** 2012; 2012: 762920 [PMID: 22577570 DOI: 10.5402/2012/762920]

BONA S. *et al.* Antifibrogenic effect of melatonin in rats with experimental liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **JGH Open**, v. 2, n. 4, p. 117-123, 2018.

BONNEFONT-ROUSSELOT D; COLLIN F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology**. 2010;278(1):55-67

BORGES TPS. **Insuficiência Hepática Aguda**. [dissertação de mestrado]. Cidade do Porto, PT: Universidade do Porto; 2010.

BOSCO AD. *et al.* Melatonin effects on pulmonary tissue in the experimental model of Hepatopulmonary Syndrome. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2019;45(3):e20170164.

BOVERIS A; CHANCE B. A geração mitocondrial de peróxido de hidrogênio. Propriedades gerais e efeito do oxigênio hiperbárico. **Biochemical Journal** 1973; 134: 707-716 [PMID: 4749271]

BRAAKMAN I; HEBERT DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2013;5(5):a013201.

BRYAN, N. S; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

BRZEZINSKI MD. Melatonin in humans. **The New England Journal of Medicine**. 1997;336(3):186-95.

BUEGE JA e AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**. 1978;52:302-10.

CANNATARO R. *et al.* Sarcopenia: Etiology, Nutritional Approaches, and Mirnas. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021;22:9724. doi: 10.3390/ijms22189724

CARRILLO-VICO A. *et al.* A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**. 2005;27(2): 189-200.

CARRILLO-VICO A. *et al.* Uma revisão das múltiplas ações da melatonina no sistema imunológico. **Endocrine** 2005; 27: 189-200 [PMID: 16217132 DOI: 10.1385/ENDO:27:2:189]

CERQUEIRA NF; HUSSNI CA; YOSHIDA WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2005;20(4):336-43.

CERRETANI D. *et al.* A administração aguda de 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) induz estresse oxidativo, lipoperoxidação e apoptose mediada por TNFalfa no fígado de ratos. **Pharmacological Research**. 2011 nov 64(5):517-27

CHEUNG K; LEE SS; Raman M. Prevalência e mecanismos de desnutrição em pacientes com doença hepática avançada e estratégias de manejo nutricional. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. 2012; DOI: 10.1016/j.cgh.2011.08.016.

CLAUSTRAT B; LESTON J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neurochirurgie**. 2015;61(2-3):77-84.

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

COLARES JR. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. **World Journal of Gastroenterology**; 2016.

COLARES JR. **Efeito da melatonina sobre a cirrose biliar secundaria induzida por ligadura de ducto biliar**. 2016. 93 p. [Dissertação de mestrado]. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde) – Universidade Luterana do Brasil, Brasil.

COLARES, JR. *et al.* Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats. **World Journal of Gastroenterology**, v.28, n. 3, p. 348-364, 21 jan. 2022.

DA LUZ, G. *et al.* Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 9, p. 2015-23, Sep 2011.

DEWIDAR B. *et al.* TGF- $\gamma$  na ativação de células estreladas hepáticas e fibrogênese hepática atualizada em 2019. **Células**. 2019;8(11):1419.

DHALIWAL A. *et al.* Nutrition in liver cirrhosis: a case-based overview. **Frontline Gastroenterology** 2020;11:155–61.

DIESEN DL; KUO PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. **Journal of Surgical Research**. 2010;162(1): 95- 109.

DILLARD, CJ. *et al.* Efeitos do exercício, vitamina E e ozônio na função pulmonar e peroxidação lipídica. **Journal of Applied Physiology**; 45, 927–932, 1978

DIRK J. *et al.* The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. Gene Expression **The Journal of Liver Research** 2018 May 18 DOI: 103727/105221617X15124844266408

DIZDAROGLU M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. Mutation research. **Reviews in mutation researchs**. 2015; 763:212-45.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**. 2002;82(1):47-95.

DUARTE-ROJO A. *et al.* Exercise and physical activity for patients with end-stage liver disease: improving functional status and sarcopenia while on the transplant waiting list. **Transplantation Reviews**. 2018;24(1):122-39

EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K.; CNOP, M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 42-61, Feb 2008.

ERSHLER WB e KELLER ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annual Review of Medicine**. 2000; 51:245-70.

ESPINOSA-DIEZ C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**. 2015; 6:183-97.

FANG FC. Perspective series, host/pathogen interactions. Mechanism of nitric oxide-related antimicrobial activity. **Journal of Clinical Investigation**. 1997;99(12):2818-25.

FARBER JL; KYLE ME; COLEMAN JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**. 1990;62(6): 670.

FERNANDES; A & MIES, S. (1998) Portal hypertension. IN ROBE (Ed.) **Experimental research models in surgery**. São Paulo, Silva, OC; Zucoloto S.

FILLMANN H. *et al.* Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**. 2007;236(3):217-26

FLOHÉ L; GÜNZLER WA. Ensaio de glutationa peroxidase. **Métodos Enzymol** 1984; 105:114-121 [PMID: 6727659]

FRIEDMAN SL. Mecanismos da fibrogênese hepática. **Gastroenterologia** 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003].

FRIEDMAN SL; Arthur MJ. Reversão da fibrose hepática. **Scientia Medica**. 2002;8(4):194-205.

GABOARDI M. Anatomia e Fisiologia do Fígado. **Sociedade Brasileira de Hepatologia**; 2011. p.3.

GRANGER DL. *et al.* Medindo a produção de óxido nítrico em estudos clínicos humanos. **Métodos Enzymol** 1999; 301:49-61.

GRIGOROV I. *et al.* Efeitos hepatoprotetores da melatonina contra eventos celulares propensoróticos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. **Journal of Physiology and Biochemistry**., 2014; 70: 441-450 [PMID: 24604251 DOI: 10.1007/s13105-014-0322-7]

GROOTJANS J. *et al.* Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. Am **The Journal of Pathology**. 2010;176(5):2283-91.

HALLIWELL B e GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. **New York: Oxford University Press Inc**; 2009.

HALLIWELL B e GUTTERIDGE JM. Free radicals in biology and medicine. **Oxford: Oxford university press**. 1999;3: 1-543.

HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**. 1994;344(8924): 721-4.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. 2006;141(2): 312-22.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**., v. 35, n. 5, p. 1147-50, 2007.

HARDELAND R. Aging, melatonin, and the pro- and anti-inflammatory networks. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019;20(5). pii: E1223

HARTMANN RM. *et al*. Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. **Protoplasma**. 2017;254(6):2155-2168.

HAYDEN MS; GHOSH S (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, 132:344-62

HAZE K. *et al*. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Biology of the Cell**. 1999;10(11): 3787-99.

HENDERSHOT LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. **Mount Sinai Journal of Medicine**. 2004;71(5): 289-97

HENKEL AS. *et al*. Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and cholinedeficient diet. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**. 2012;303(1): 54-9.

HERNAEZ R. *et al*. Acute-on-chronic liver failure: an update. **Gut**. 2017;66(3):541-53.

HICKMAN AB; KLEIN DC; DYDA F. Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. **Molecular Cell**. 1999;3(1):23-32.

HU S. *et al*. Translational inhibition of colonic epithelial heat shock proteins by IFN-gamma and TNF-alpha in intestinal inflammation. **Gastroenterology**. 2007;133(6):1893-904.

IWAKIRI, Y.; KIM, M.Y. Nitric oxide in liver diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**., v. 36, n. 8, p. 524-36, 2015.

JÚNIOR IJV. **Respostas morfológicas e moleculares do músculo esquelético de ratos idosos submetidos ao treinamento físico após estímulo atrofico**. 2015. 92p. [Tese] (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada: Biologia Celular, Estrutural e Funcional) - Universidade Estadual Paulista, Brasil.

KEATING SE. *et al*. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. **Jornal of Hepatology**., 2015

KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 12. ed. Porto Alegre: **AMGH**, 2014.

KERKWEG U; SCHMITZ D; DE GROOT H. Screening for the formation of reactive oxygen species and of NO in muscle tissue and remote organs upon mechanical trauma to the mouse hind limb. **European Surgical Research**. 2006;38(2):83-9.

KIM, M. K. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and insulin biosynthesis: **a review**. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 509437, 2012.

KOUNTOURAS J; Billing BH; Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **Archive of British Journal of Experimental Pathology**. 1984;65(3):305-11

KOURY JC e DONANGELO CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**. 2003;6(4):433-41

KRUGER C. *et al.* Home exercise training improves exercise capacity in cirrhosis patients: role of exercise adherence. **Scientific Reports**. 2018;8(1):99.

KUBES P; JENNE C. Respostas imunes no fígado. **Annual Review of Immunology**. 2018;36:247-77.

KUJAWSKA M. *et al.* Protective effect of yellow tea extract on Nnitrosodiethylamine-induced liver carcinogenesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1891-1900, 3 fev. 2016.

KWAK JH; JUNG JK; LEE H. Nuclear factor-kappa B inhibitors; a patent review (2006- 2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 2011;21(12):1897-910.

LALEMAN, W. *et al.* A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. **European journal of clinical investigation**, 36, 4, p. 242-249, Mar 2006.

LATIEF U. *et al.* Nrf2 protein as a therapeutic target during diethylnitrosamine-induced liver injury ameliorated by  $\beta$ -carotene-reduced graphene oxide ( $\beta$ C-rGO) nanocomposite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 346-357, set. 2019.

LAUBE R. *et al.* Frailty in advanced liver disease. **Liver international**., 2018. <https://doi.org/10.1111/liv.13917>

LI H. *et al.*, Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 2014 Nov;237(1):208-19.

LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**., v. 28, n. 4, p. 37-52, 2000

LICKS, F. *et al.* Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. **Journal of Coloproctology**., v. 36, n. 4, p. 231-9, 2016.

LIN E; CALVANO SE; LOWRY SF - Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, 2000;127:117-126.

LIRA FS. *et al.* Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. *Cell Biochemistry & Function.*, v. 26, n. 6, p. 701-708, 2008.

LÓPEZ-SÁNCHEZ GN. *et al.* The fibrogenic process and the unleashing of acute-on-chronic liver failure. **Clinical and Molecular Hepatology**. 2020;26(1):7-15.

MACDOUGALL JD. *et al.* Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. **Journal of Applied Physiology.**, n. 84, v. 6, p. 2138-2142, 1998.

MARZETTI E. *et al.* Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 2013;45(10):2288-301.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 2008;454:428-35.

MOON AM; SINGAL AG; TAPPER EB. Epidemiologia contemporânea da doença hepática crônica e cirrose. **Clínica Gastroenterol Hepatol**. 2020; 18:2650-66

MOREIRA AJ. *et al.* Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144517, 11 dez. 2015.

NETO JAS; De Castro BF. Melatonina, ritmos biológicos e sono-uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**. 2008;44(1): 5-11.

NETTER FH. **Atlas de anatomia humana**. 6<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2015.

NETTO JR, J. *et al.* Comportamento da produção de espécies reativas de oxigênio em miocárdio de ratos submetidos a treinamento de baixa intensidade em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. Vol.13 n.6 – Nov/dez, 2007.

NISHIKAWA H. *et al.* Pathophysiology and Mechanisms of Primary Sarcopenia (Review) **International Journal of Molecular Medicine**. 2021;48:1–8. doi: 10.3892/ijmm.2021.4989

NOWAK JZ; ZAWILSKA JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacology World Science*. 1998; 20:18-27 of Cirrhosis in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 7, p. 1339-1346, 3 jun. 2009.

OLESHCHUK O. *et al.* Hepatoprotective Effect of Melatonin in Toxic Liver Injury in Rats. **Medicina**, v. 55, n. 6, p. 304, 24 jun. 2019.

OLIVEIRA DC. **Avaliação do controle da expressão gênica de citocinas próinflamatórias mediada pela IL-10. Participação da IL-10 na modulação da**

**resposta inflamatória exercida pela glutamina e na restrição alimentar.** [Tese] (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo; 2017.

ORELLANA M; RODRIGO R; THIELEMANN L. Ligadura do ducto biliar e estresse oxidativo no rato: efeitos no fígado e nos rins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 2000;126(2):105-11.

OZCAN, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 15 2004.

PAROLA M. *et al.* Sobre o papel da peroxidação lipídica na patogênese da lesão hepática induzida por colestase de longa duração. **Free Radical Biology and Medicine**. 1996;20(3):351-9.

PASTOR A. *et al.* Estado da enzima antioxidante em ratos com obstrução biliar: efeitos da N-acetilcisteína. **Journal of Hepatology**. 1997;27(2):363-70.

PATTON KT; THIBODEAU GA. O Corpo Humano na Saúde e na Doença. **Ciências da Saúde**, 2013.

PERES W. *et al.* The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of hepatology**. 2000;33(5): 74250.

RANG, P. H. *et al.* Rang and Dale Farmacologia. 7. ed. **Churchill Livingstone: Elsevier**, 2012.

REITER RJ. *et al.* Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**. 2015;20(4):7396-437

REITER RJ. Melatonin: clinical relevance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2003;17(2): 273-85.

REITER, R J. *et al.* Antioxidant capacity of melatonin. *In*: CADENAS, E; PACKER, L (Edt.). Handbook of antioxidants. 2a ed. **New York: Marcel Dekker**, 2002. p. 565-

REITER, RJ. *et al.* Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 1 set. 2016.

REN K; TORRES R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**. 2009;60(1):57-64.

RIGAMONTI E. *et al.* Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. **The Journal of Immunology**. 2013;190(4):1767-77.

ROCK KL. *et al.* The sterile inflammatory response. **Annual Review of Immunology**. 2010; 28:321-42.

RODRIGUES HG. *et al.* Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**., 2003;16(3):315-20.

RODRIGUES, L O. C. *et al.* Heat storage rate and acute fatigue in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 36(1):131-5; 2003.

RON, D; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007.

RONG YD. *et al.* Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10. **BMC Geriatrics**. 2018;18(1):308.

ROSA DPD. *et al.* Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**. 2010;47(1): 72-8.

ROSA, CGS. *et al.* Sarcopenia, oxidative stress and inflammatory process in muscle of cirrhotic rats—Action of melatonin and physical exercise. **Experimental and Molecular Pathology**, p. 104662, 2021.

ROSSIA D. *et al.* Exercise in the physical rehabilitation of cirrotics: a randomized pilot study. **Scielo Gastroenterology**., 2022.

RUTKOWSKI DT; KAUFMAN RJ. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in Cell Biology**. 2004;14(1): 20-8.

SCHNEIDER CD; OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2004;10(4):308-18.

SCHRODER M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and molecular life sciences**, 2008;65(6):862-94.

SCHUPPAN D; AFDHAL NH. Cirrose hepática. **Lanceta**. 2008;371(9615):838-51.

SHOJAEI-MORADIE F. *et al.* Exercise training reduces liver fat and increases rates of VLDL clearance but not VLDL production in NAFLD. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2016; 101: 4219-4228

SCHNEIDER, CD; OLIVEIRA, AR Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de síntese e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 10, n. 4, pág. 308-313, agosto de 2004

SOMMER C; WHITE F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F *et al.* - **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010;279-302.

SONG J. *et al.* The protective effect of melatonin on neural stem cell against lps-induced inflammation. **BioMed Research International**. 2015; 2015:854359.

SOUZA JR TP; OLIVEIRA PR; PEREIRA B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 2005;11(1):91-6.

STERN, S. E. Using Routine Clinical Measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 3, p. 6, 2005

TAKAHASHI, H.; ASANO, K.; NAKAYAMA, H. Effect of endurance training under hypoxic condition on oxidative enzyme activity in rat skeletal muscle. **Appl. Human sciences**, v. 15, n. 3, p. 111-114, 1996.

TAN DX. *et al.* Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. **Molecules**. 2015;20(10):18886-906.

TANDON P. *et al.* Exercise in cirrhosis: Translating evidence and experience to practice. **Journal of hepatology** vol. 69,5 (2018): 1164-1177. doi:10.1016/j.jhep.2018.06.017

TERZIC J. *et al.* Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. **Biochemical Society Transactions**, 2007 35:942-5

THIRUPATHI A; SOUZA CT "Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 alpha, and AMPK-SIRT1 during exercise." **Journal of physiology and biochemistry** 73.4 (2017): 487-494.

TICE RR. *et al.* Ensaio de gel/cometa de célula única: diretrizes para testes de toxicologia genética in vitro e in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 2000; 35(3):206-21

TIEPPO J. *et al.* Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. **Journal of Nutrition**. 2009;139(7):1339-46.

TOMA RL. *et al.* Photobiomodulation (PBM) therapy at 904 nm mitigates effects of exercise-induced skeletal muscle fatigue in young women. **Lasers in Medical Science**. 2018;33(6):1197-205.

TORRES FF. *et al.* Melatonina: muito além do sono. **Aprendendo Ciência**, 10(1):53-57, 2021.

TRACHOOTHAN D. *et al.* Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2008;10(8):1343-74.

TREFTS E; GANNON M; WASSERMAN DH. O fígado. **Current Biology**. 2017;27(21):1147-51.

TRIVIÑO T; ABIB SCV. Anatomia fisiológica do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2003;18(5):407-14.

TSUCHIDA T; FRIEDMAN SL. Mecanismos de ativação das células estreladas hepáticas. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. 2017;14(7):397-411.

VALKO M. *et al.* Radicais livres, metais e antioxidantes no câncer induzido por estresse oxidativo. **Chemico Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VERCELINO R. *et al.* N-acetylcysteine effects on genotoxic and oxidative stress parameters in cirrhotic rats with hepatopulmonary syndrome. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 2008;102(4):370-6.

VIEIRA EK. *et al.* Quercetin treatment ameliorates systemic oxidative stress in cirrhotic rats. **ISRN Gastroenterology**. 2011;2011:604071.

WEISKIRCHEN R; TACKE F. Funções celulares e moleculares de células estreladas hepáticas em respostas inflamatórias e imunologia hepática. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**. 2014;3(6):344-63.

XU CL. *et al.* Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment. **World Journal of Gastroenterology**. 2014. 20:4662-4674.

YANG Q. *et al.* Swimming training alleviated insulin resistance through Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling in type 2 diabetic rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. 2017;20(11):1220-6.

YAO, D. *et al.* Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchimica Acta**, v. 147, n. 1, p. 1-20, 2004.

ZHANG JJ. *et al.* Efeitos da Melatonina em Lesões e Doenças do Fígado. **International Journal of Molecular Sciences** 2017; 18(4):673. doi: 10.3390/ijms18040673.

ZHANG JM; AN J. Citocinas, inflamação e dor. **International Anesthesiology Clinics**. 2007;45(2):27-37.

ZHANG XQ. *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**. 2014;20(7): 1768-76.

ZHDANOVA IV; WURTMAN RJ. The Pineal Hormone (Melatonin). In: Melmed MD, Conn PM. **Endocrinology Basic and Clinical Principles**. 2 ed. New Jersey: Totowa. 2005:255-65.

ZINGARELLI B; SHEEHAN M; WONG HR; Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. **Critical Care Medicine**. 2003;31(1 Suppl):S105-11.

## ANEXOS

ANEXO A: Carta de aprovação do Projeto pelo Comitê de ética em Pesquisa.



## 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

**ANEXO B:** Artigo enviado para publicação

**ACTION OF MELATONIN AND PHYSICAL EXERCISE ON THE LIVER OF  
CIRRHOTIC RATS: STUDY OF OXIDATIVE STRESS AND THE  
INFLAMMATORY PROCESS**

**GABRIELA S MARTINS <sup>1,2</sup>, CARLOS GUSTAVO S ROSA <sup>3</sup>, ELIZÂNGELA G SCHEMITT <sup>1</sup>,  
SANDIELLY RB FONSECA<sup>1</sup>, MARILDA S BRASIL<sup>1,2</sup>, MILLENA O ENGEROFF <sup>1</sup>, NORMA P  
MARRONI <sup>1,2</sup>**

1 Graduate Program in Biological Sciences: Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Experimental Laboratory of Pulmonology and Inflammation Sciences - Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre-RS, Brazil

3 Cellular and Molecular Biology Program, Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas-RS, Brazil.



ANEXO C: Outras produções bibliográficas durante a vigência do mestrado (2020-2023).

Artigos publicados

- Melissa Rosa de Souza, Ana Letícia Hilário Garcia, Daiana Dalberto, Gabriela dos Santos Martins, Juliana Picinini, Guilherme Maurício Soares de Souza, Paola Chytry, Johnny Ferraz Dias, Larissa Daniele Bobermin, André Quincozes-Santos, Juliana da Silva. Environmental exposure to mineral coal and by-products: Influence on human health and genomic instability. **Environmental Pollution** 287 (2021) 117346. Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Carlos Gustavo Sakuno Rosa, Josieli Raskopf Colares, Sandielly Rebeca Benitez da Fonseca, Gabriela dos Santos Martins, Fabiano Moraes Miguel, Alexandre Simoes Dias, Cláudio Augusto Marroni, Jaqueline Nascimento Picada, Maurício Lehmann, Norma Anair Possa Marroni. Sarcopenia, oxidative stress and inflammatory process in muscle of cirrhotic rats – Action of melatonin and physical exercise. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 121, p. 104662, ago. 2021.

Artigos aceitos para publicação

- Marilda S Brasil, Silvia Bona, Elizângela G Schemitt, Sandielly RB Fonseca, Gabriela S Martins, Jaqueline N Picada, Norma P Marron. Melatonin reverses dna damage and the cirrhofgenic effect of diethylnitrosamine (den) in rats. **Hepatology forum**.