

MARINA SILVA DE LUCCA

**HISTOLOGIA HEPÁTICA APÓS USO CRÔNICO DE ÁLCOOL E  
TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2016

MARINA SILVA DE LUCCA

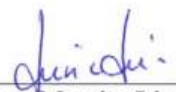
**HISTOLOGIA HEPÁTICA APÓS USO CRÔNICO DE ÁLCOOL E  
TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS Wistar**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de Junho de 2016

  
Márcia Helena Fávero Souza Tostes

  
Eveline Torres Pereira  
(Coorientadora)

  
Prof. Luciana Moreira Lima  
(Orientadora)

*Com carinho e gratidão, dedico  
esse trabalho à minha filha, aos  
meus pais e irmão pelo apoio e  
pela compreensão durante mais  
esse projeto.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pelos sentimentos de força, fé e perseverança que Ele me proporciona.*

*Agradeço à minha filha, Luísa, que me motiva diariamente a realizar meus projetos.*

*Agradeço aos meus pais, Marcio e Neuza, pela compreensão, dedicação e amor incondicionais que oferecem a mim e minha filha.*

*Agradeço ao meu irmão pela amizade e auxílio constantes.*

*Agradeço ao Professor Bruno, chefe do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa, por me oferecer condições para realização desse projeto, assim como motivação e apoio.*

*Agradeço a Eveline Torres Pereira, Lucas Mota Ribeiro, Thamires Rishi, Camilo Amaro de Carvalho, Clayton Israel Nogueira, Daise Nunes Queiroz da Cunha, Antônio José Natali e todos aqueles que fizeram parte do meu mestrado.*

*Agradeço a FAPEMIG pelo financiamento do projeto.*

*Agradeço aos professores que me acompanharam durante minha formação pessoal e profissional, especialmente os (as) professores (as): Mário Sérgio Ribeiro, Marco Antônio Gasparetto, Alexander Moreira-Almeida, André Stroppa, Éder Schimidt, Márcia Helena Fávero, Simone Lopes, Mário Cirino Nogueira.*

*Um agradecimento especial à professora Luciana Moreira Lima, por sua orientação, serenidade e competência. Sua forma de trabalho nos motiva e faz acreditar que nosso projeto é possível.*

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS- Introdução Geral .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>6</b>
<b>ARTIGO 1 - Interações entre exercício físico, álcool e fígado (Em sua formação de publicação).....</b>	<b>7</b>
<b>ARTIGO 2 – Hepatocytesmorphometryafterchronic use ofalcoholandexercise training in rats (Em sua formação de publicação).....</b>	<b>15</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO B – Comprovantes de submissão dos artigos.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO C – Folha de Produtividade .....</b>	<b>48</b>

## ABREVIATURAS

- ❖ ADH = ALDEIDO DESIDROGENASE
- ❖ AE = GRUPO ÁLCOOL EXERCITADO
- ❖ ALD = ALCOHOLIC LIVER DISEASE
- ❖ ANOVA = ANALYSIS OF VARIANCE
- ❖ AS = GRUPO ÁLCOOL SEDENTÁRIO
- ❖ CD14 = CLUSTER OF DIFFERENTIATION 14
- ❖ CE = GRUPO CONTROLE EXERCITADO
- ❖ CEUA = COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
- ❖ CM = CORPÚSCULOS DE MALLORY
- ❖ CNPQ = CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
- ❖ CONCEA = CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- ❖ CS = GRUPO CONTROLE SEDENTÁRIO
- ❖ CYP2E1 = CITOCROMO P450, SUBTIPO 2E1
- ❖ DALY = ANOS DE VIDA PERDIDOS AJUSTADOS POR INCAPACIDADE
- ❖ DHA = DOENÇA HEPÁTICA ALCÓOLICA
- ❖ DNA = ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
- ❖ EA = EXERCISE ALCOHOL GROUP
- ❖ EC = EXERCISE CONTROL GROUP
- ❖ EHA = ESTEATOHEPATITE ALCÓOLICA
- ❖ FAPEMIG = FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DE MINAS GERAIS
- ❖ GGT = GAMA GLUTAMILTRANSFERASE
- ❖ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

- ❖ IL-1 = INTERLEUCINA 1
- ❖ MB = MALLORY BODIES
- ❖ MRS = MAXIMUM RUNNING SPEED
- ❖ NAD = NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE
- ❖ NAD<sup>+</sup> = NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE OXIDADO
- ❖ NADH = NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE REDUZIDO
- ❖ SA = SEDENTARY ALCOHOL GROUP
- ❖ SC = SEDENTARY CONTROL GROUP
- ❖ TNF-ALFA = FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
- ❖ UFV = UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
- ❖ VCM = VELOCIDADE MÁXIMA DE CORRIDA
- ❖ VLDL = LIPOPROTEÍNA DE MUITO BAIXA DENSIDADE
- ❖ WHO = ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

**Tabela 1** - Dose padrão de álcool definida pela Organização Mundial de Saúde (pág. 8 e 9)

### ARTIGO 2

**Table 1** – Average weight of animals during the experimental procedure. (pág.33)

**Table2 e 3**– Mean exhaustion test and maximum speed values at the beginning and end of the experiment. (pág 34 e 35)

**Table 4** -Parameters assessed in the nucleus of hepatocytes.(pág 36)

**Table 5** - Parameters evaluated in the cytoplasm of hepatocytes. (pág 37)



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

**Figura 1** – Principais vias de metabolização do álcool (pág 14)

## RESUMO

LUCCA, Marina de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2016. **Histologia hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar***. Orientadora: Luciana Moreira Lima. Co-orientadora: Eveline Torres Pereira.

A Doença Hepática Alcolólica (DHA) inclui um espectro de doenças, desde uma simples esteatose ao carcinoma hepatocelular, cujos fatores genéticos e ambientais interagem para produzir um fenótipo da doença e sua progressão. Doenças hepáticas contribuem significativamente para a carga global de morbimortalidade. Em princípio, toda a carga global da DHA é evitável, porém difícil de alcançar, pois interfere em hábitos individuais e culturais de longa data. A abordagem para minimizar a carga global de doença da DHA envolve intervenções principalmente nos estágios iniciais da doença. A compreensão dos mecanismos subjacentes à DHA pode auxiliar na descoberta de intervenções que reduzem a progressão da esteatose a formas graves de lesão hepática, como esteatohepatite, fibrose e cirrose. Nesse contexto, o exercício físico tem sido investigado como coadjuvante terapêutico para DHA. O objetivo geral dessa dissertação foi avaliar a histologia hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*. Essa dissertação contempla dois artigos, sendo que o objetivo do artigo de revisão foi realizar revisão de literatura sobre o tema da dissertação e os objetivos do artigo original foram: descrever a morfologia hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*; aferir área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator forma de núcleos e citoplasmas de hepatócitos após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*; correlacionar alterações na morfologia e morfometria hepáticas com o uso de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*; descrever alterações do peso, tempo de exaustão e velocidade máxima de corrida dos animais durante o experimento; verificar possíveis benefícios do treinamento físico na histologia hepática após uso crônico de álcool. O primeiro estudo demonstrou que a ingestão crônica de álcool causa danos tóxicos diretos e indiretos principalmente ao aumentar o estresse oxidativo, reduzir os níveis de antioxidantes não-enzimáticos, reduzir a relação NAD<sup>+</sup>/NADH, alterar a função mitocondrial, aumentar a peroxidação lipídica e aumentar a produção de acetaldéido. Por outro lado, os exercícios podem ser uma terapia útil para melhorar a performance e capacidade funcional em indivíduos com doença hepática, podendo ter alguma influência positiva direta, além da simples modificação dos níveis de gordura no fígado. Parece também que a intensidade da atividade física é importante para prevenir a progressão da doença, porém mais estudos são necessários para definir se o exercício físico

pode restaurar a saúde hepática e qual seria a quantidade e o tipo de exercício necessários. O segundo estudo foi experimental com 24 ratos *Wistar*, com duração de 6 semanas, sendo quatro semanas de administração de álcool e duas de treinamento físico. Os resultados apresentados evidenciaram que o treinamento físico aeróbico realizado por duas semanas não foi suficiente para suprimir as alterações histopatológicas do fígado causadas pelo uso crônico de álcool em ratos *Wistar*. No entanto, esses dados não excluem os benefícios hepáticos da atividade física aeróbica, uma vez que o uso crônico do álcool parece ter minimizado o efeito benéfico do treinamento físico na área do núcleo dos hepatócitos. É possível que uma duração maior do treinamento físico seja necessária para demonstrar benefícios, levando a perspectiva de novo experimento, aperfeiçoando o protocolo de exercício físico e controle das limitações identificadas.

## ABSTRACT

LUCCA, Marina de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **Hepatocytes morphometry after chronic use of alcohol and exercise training in *Wistar* rats.** Adviser: Luciana Moreira Lima. Co-adviser: Eveline Torres Pereira.

Alcoholic liver disease (ALD) includes a spectrum of diseases ranging from simple steatosis to hepatocellular carcinoma, whose genetic and environmental factors interact to produce a phenotype of the disease and its progression. Liver diseases contribute significantly to the global burden of morbidity and mortality. In principle, the entire global burden of ALD is preventable but difficult to achieve because it interferes with longstanding individual and cultural habits. The approach to minimize the global burden of disease ALD involves interventions particularly in the early stages of the disease. Understanding the mechanisms underlying ALD may help in finding interventions that reduce the progression of steatosis to severe forms of liver damage, such as steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. In this context, the exercise has been investigated as a therapeutic adjunct to ALD. The overall objective of this thesis was to evaluate the hepatic histology after chronic use of alcohol and physical training in rats. This dissertation includes two articles, with the aim of the review article was to conduct a literature review on the topic of the dissertation and the goals of the original article were to describe the liver morphology after chronic use of alcohol and physical training in rats; to measure area, perimeter, maximum diameter, minimum diameter and form factor of nuclei and cytoplasm of hepatocytes after chronic use of alcohol and physical training in rats; to correlate changes in liver morphology and morphometry with the use of alcohol and physical training in rats; to describe changes in weight, time to exhaustion and maximal running speed of animals during the experiment; to check possible benefits of physical training in liver histology after chronic use of alcohol. The first study showed that chronic alcohol intake causes direct and indirect toxic damage primarily increasing oxidative stress, reducing the levels of non-enzymatic antioxidants, reducing NAD<sup>+</sup> / NADH ratio, altering mitochondrial function, increasing lipid peroxidation and increasing the production of acetaldehyde. On the other hand, the exercise can be a useful therapy to improve performance and functional capacity in patients with liver disease and may have some direct positive effect, beyond the mere modification of fats in the liver. It also appears that the intensity of physical activity is important to prevent progression of the disease, but more studies are needed to determine whether physical exercise can restore liver health and what

would be the amount and type of exercise needed. The second study was experimental with 24 *Wistar* rats, 6-week duration (four weeks of alcohol administration and two physical training). The results presented showed that aerobic physical training carried out for two weeks was not enough to suppress the histopathological changes in the liver caused by chronic use of alcohol in rats. However, these data do not exclude hepatic benefits of aerobic physical activity, since the chronic use of alcohol seems to have minimized the beneficial effect of physical training in the core area of hepatocytes. It is possible that a longer duration of exercise training is necessary to demonstrate benefits, bringing the prospect of new experiment, improving exercise protocol and control the identified limitations.

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa - UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução geral, objetivos geral e específicos, dois artigos científicos e uma conclusão geral. O primeiro artigo intitulado “**Interações entre exercício físico, álcool e fígado**” foi formatado de acordo com as normas da *Revista Médica de Minas Gerais*, para qual o artigo foi submetido. O segundo artigo intitulado “**Hepatocytes morphometry after chronic alcohol use and exercise training in rats**” foi formatado de acordo com as normas da revista *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, para qual o artigo foi submetido.

## INTRODUÇÃO GERAL

A Doença Hepática Alcólica (DHA) inclui um espectro de doenças, desde uma simples esteatose ao carcinoma hepatocelular, cujos fatores genéticos e ambientais interagem para produzir um fenótipo da doença e sua progressão (Ishak et al., 1991; Lieber, 1993; Harrison e Burt, 1993). Essa particularidade poderia explicar o motivo pelo qual alguns indivíduos que fazem uso pesado do álcool (NIAAA, 2016) não progridem para esteatohepatite, enquanto outros que fazem uso moderado a desenvolvem (Lieber, 2004; Liu, 2014). Porém, a DHA está mais frequentemente associada a níveis altos de consumo de álcool (Bertola et al., 2013; Sheron, 2016).

A ingestão crônica de álcool causa danos tóxicos diretos e indiretos em qualquer idade. O etanol aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogenadas, além de reduzir os níveis de antioxidantes não-enzimáticos particularmente no fígado. Essas alterações são frequentemente associadas com aumento de produtos da peroxidação lipídica que têm papel central no desenvolvimento da doença hepática alcólica (Mallikarjuna, 2009).

A esteatose desenvolve-se em aproximadamente 90% dos indivíduos que ingerem mais de 60g/dia de etanol, mas essa condição é completamente reversível após 4 a 6 semanas de abstinência. A fibrose e a cirrose desenvolvem-se em 5 a 10% dos indivíduos. Mesmo nas formas leves de hepatite alcólica, existe um risco elevado para desenvolver lesão hepática progressiva, com cirrose desenvolvendo-se em mais de 50%. A abstinência alcoólica está associada com normalização histológica em 27% dos pacientes com hepatite alcólica, com progressão para cirrose em 18% e hepatite persistente nos demais (Frederico et al., 2015; French, 2015). Apesar de ser considerada uma anormalidade histológica benigna e reversível, pacientes com esteatose que persistem no uso de álcool podem desenvolver fibrose e, em alguns casos, cirrose, sem desenvolvimento prévio de esteatohepatite (Schwartz e Reinus, 2012).

Doenças hepáticas contribuem significativamente para a carga global de morbimortalidade. Com relação à carga global de doença atribuída à cirrose hepática, 47,9% das mortes por cirrose hepática e 46,9% dos anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade (DALY = disability adjusted life year) foram atribuídos ao consumo de álcool (Rehm, et al.,2013). A medida DALY agrega medidas de mortalidade e morbidade em um único valor, calculado pela soma dos anos de vida perdidos em função de mortes prematuras e dos anos de vida com alguma incapacidade, devido a problemas de saúde não fatais. Os anos de vida com alguma incapacidade são ajustados em função da magnitude da limitação funcional (Vermelho et al., 2006).

Ao contrário da mortalidade que acometeu principalmente idosos, pessoas entre 35 e 64 anos foram responsáveis pelo maior número de DALYs por cirrose hepática atribuível ao consumo de álcool, tanto em homens, quanto em mulheres (495,4 DALYs por 100.000 habitantes). DALYs por cirrose hepática foi mais por mortalidade prematura do que anos vividos com incapacidade (Rehm et al., 2013).

A neoplasia hepática atribuível ao consumo de álcool foi responsável por 0,2% de todas as mortes; 10,7% das mortes por neoplasia hepática; 1,7% das mortes atribuíveis ao álcool e 23,9% de todas as mortes por neoplasias. (Rehm et.al, 2013).

Em princípio, toda a carga global da DHA é evitável, porém difícil de se alcançar, pois interfere em hábitos individuais e culturais de longa data. A abordagem para minimizar a carga global de doença da DHA envolve intervenções principalmente nos estágios iniciais da doença (Rehm et al., 2013; Rocco, 2014).

A compreensão dos mecanismos subjacentes à DHA pode auxiliar na descoberta de intervenções que reduzem a progressão da esteatose a formas graves de lesão hepática, como esteatohepatite, fibrose e cirrose. (Rehm, 2013)

Exercícios podem ser uma terapia útil para melhora da performance e da 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 (Shephard e Johnson, 2015; Larson-Meyer et al 2008; Johnson et al 2009; Eckard et al, 2013; Keating et al, 2012; Keating et al, 2015).

Exercícios moderados parecem não influenciar significativamente as características morfológicas do tecido hepático ou a função hepática. Por outro lado, em exercícios pesados e prolongados, observam-se estresse oxidativo, alterações histológicas, prejuízo da farmacocinética e níveis alterados de enzimas hepáticas. Após alguns dias de cessação do exercício, parece haver recuperação da função hepática normal. As alterações hepáticas com o exercício agudo parecem ser transitórias e possivelmente contribuem para adaptações ao exercício, mantendo a homeostase. (Shephard e Johnson, 2015)

## REFERÊNCIAS

- Bertola, A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. (2013) Mouse Model of Chronic and Binge Ethanol Feeding (The NIAAA Model). *Nat Protoc* 8: 627-36.
- Eckard C, Cole R, Lockwood J, Torres DM, Williams CD, Shaw JC, Harrison SA. (2013) Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. *Therap Adv Gastroenterol* 6: 249-59.
- Federico A, Cotticelli G, Festi D et al. (2015) The effects of alcohol on gastrointestinal tract, liver and pâncreas: evidence-based sugestions for clinical management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19: 1922-40.
- French SW. (2015) How to prevent alcoholic liver disease. *Experimental and Molecular*

*Pathology* 98:304-07.

Harrison DJ, Burt AD. (1993) Pathology of alcoholic liver disease. *Baillière's Clin Gastroenterol* 7:641-62.

Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. (1991) Alcoholic Liver Disease: Pathologic, Pathogenetic and Clinical Aspects. *Alcohol Clin Exp Res* 15:45-66.

Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. (2009) Aerobic Exercise Training Reduces Hepatic and Visceral Lipids in Obese Individuals Without Weight Loss. *Hepatology* 50: 1105-12.

Keating SE, Hackett DA, Parker HM et al. (2015) Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol* 63:174-82.

Keating SE., Hackett DA, George J. Johnson NA. (2012) Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 57:157-66.

Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK et al. (2008) Effect of 6-Month Calorie Restriction and Exercise on Serum and Liver Lipids and Markers of Liver Function. *Obesity* 16: 1355–62.

Lieber CS. (1993) Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 7: 581-608.

Lieber CS. (2004) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34: 9-19.

Liu J. (2014) Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver. *World J Gastroenterol* 20: 14672-85.

Mallikarjuna K, Nishanth K, Hou CW, Kuo CH, Reddy KS. (2009) Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats. *Alcohol* 43: 59-64.

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism - NIAAA. (2016) Turning Discovery Into Health National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Disponível

em:<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/AlcoholFacts&Stats/AlcoholFacts&Stats.pdf> e

<http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>. Acessado em 30/09/2016.

Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD. (2013) Global burden of alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 59: 160-68.

Rocco A, Compare D, Angrisani D, Zamparelli MS, Nardone G. (2014) Alcoholic disease: Liver and Beyond. *World J Gastroenterol*20: 14652-59.

Schwartz JM, Reinus JF. (2012) Prevalence and Natural History of Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis* 16: 659-666.

Shephard JR, Johnson N. (2015) Effects of physical activity upon the liver. *Eur J ApplPhysiol*115:1-46.

Vermelho L. L., Leal A. J. C. e Kale P. L. (2006) Indicadores de Saúde. In: Medronho R. A., editor. *Epidemiologia*. São Paulo: Editora Atheneu p.53-54.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

- ❖ Avaliar a histologia hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Sumarizar conceitos clássicos da patogênese da DHA e efeitos do exercício físico sobre o fígado saudável e na DHA.
- ❖ Descrever a morfologia hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*.
- ❖ Aferir área, perímetro, diâmetro máximo, diâmetro mínimo e fator forma de núcleos e citoplasmas de hepatócitos após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*.
- ❖ Correlacionar alterações na morfologia e morfometria hepáticas com o uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*.
- ❖ Descrever alterações do peso, tempo de exaustão e velocidade máxima de corrida dos animais durante o experimento.
- ❖ Verificar possíveis benefícios do treinamento físico na histologia hepática após uso crônico de álcool.

# ARTIGO 1

Esta é um versão gerada unicamente para visualização dentro do SGP.  
A versão a ser impressa utilizará outros padrões de formatação.  
This is a version generated only for visualization inside of SGP.  
The version to be printed will use other formatting patterns.

## ARTIGO DE REVISÃO

**Código de Fluxo (Flux Code): 445**

## Interações entre exercício físico, álcool e fígado

**Interactions between physical exercise, alcohol and liver**

### Autores (Authors)

**Marina Silva de Lucca:** Médica. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil - Médica Psiquiatra/Professora Auxiliar do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil

**Eveline Torres Pereira:** Educadora Física. PhD. - Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil

**Luciana Moreira Lima:** Bioquímica. PhD. - Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil

### Descritores em Português (Keywords in Portuguese)

Álcool, Exercícios Físicos, Doença Hepática Alcoólica.

### Descritores em Inglês (Keywords in English)

Alcohol, Physical Exercise, Alcoholic Liver Disease.

### Resumo em Português (Abstract in Portuguese)

A ingestão crônica de álcool causa danos tóxicos diretos e indiretos e as principais alterações são causadas pelo seu próprio metabolismo. O etanol aumenta o estresse oxidativo principalmente no fígado, reduz a relação NAD<sup>+</sup>/NADH, aumenta a produção de acetaldeído e altera a função mitocondrial. Essas alterações são frequentemente associadas com o aumento de produtos da peroxidação lipídica, essenciais ao desenvolvimento da doença hepática alcoólica (DHA). Os exercícios físicos moderados parecem não influenciar significativamente as características morfológicas do tecido hepático ou a função hepática. Em exercícios pesados e prolongados, observam-se estresse oxidativo, alterações histológicas, prejuízo da farmacocinética e níveis alterados de enzimas hepáticas. Cessado o exercício alguns dias, parece haver recuperação da função hepática normal. As alterações hepáticas com o exercício agudo parecem ser transitórias e possivelmente contribuem para a homeostase. A atividade física parece ter alguma influência 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. Entender os mecanismos subjacentes da doença hepática auxiliaria na descoberta de intervenções para reduzir a progressão dessa doença de uma condição benigna, como a esteatose, para formas graves como esteatohepatite, fibrose e cirrose. Portanto, exercícios podem ser uma terapia útil para melhorar a performance e a capacidade funcional em indivíduos com doença hepática, porém não está claro na literatura se o exercício físico pode restaurar a saúde hepática e nem qual seria a quantidade e o tipo de exercício necessários.

### Resumo em Inglês (Abstract in English)

Chronic alcohol intake causes direct and indirect toxic damage and major changes are caused by their own metabolism. Ethanol increases oxidative stress primarily in the liver, reduces NAD<sup>+</sup> / NADH ratio, increases the production of acetaldehyde and alters mitochondrial function. These changes are often associated with increased lipid peroxidation products that are essential to the development of alcoholic liver disease (ALD). The moderate intensity exercise does not seem to significantly influence the morphological characteristics of liver tissue or liver function. In heavy and prolonged exercise, oxidative stress, histological changes, impaired pharmacokinetics and altered levels of liver enzymes are noted. Liver function seems to improve a few days after the end of exercise. Hepatic changes with acute exercise appear to be transient and possibly contribute to homeostasis. Physical activity seems to have any direct influence on the liver pathology in addition to the simple modification of the levels of fat in the liver and it seems that the intensity of physical activity is important to prevent disease progression. Understanding the mechanisms underlying hepatic disease, this could help find interventions to slow the progression of liver disease of a benign condition, such as steatosis to severe forms, such as steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis. Therefore, exercise can be a useful therapy to improve the performance and functional capacity in patients with liver disease, but it is not clear in the literature that the exercise can restore liver health and even what the quantity and type of needed exercise.

Trabalho submetido em (Article's submission in): 28/05/2016 22:48:46

Instituição (Affiliation): Universidade Federal de Viçosa

Correspondência (Correspondence): Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs, s/n - Centro - Viçosa, Minas Gerais - CEP 36570-000 - Tel: (31) 3899-3904

Suporte Financeiro (Financial support): FAPEMIG/Brasil

Submetido para (Submitted for): Revista Médica de Minas Gerais

## Conteúdo(Content)

### 1 INTRODUÇÃO

2 A Doença Hepática Alcólica (DHA) inclui um espectro de alterações, desde uma simples esteatose ao carcinoma hepatocelular, cujos fatores genéticos e ambientais interagem para produzir um fenótipo da doença e sua progressão.<sup>1,2</sup> Essa particularidade poderia explicar o motivo pelo qual alguns indivíduos que fazem uso pesado do álcool<sup>3</sup> não progridem para esteatohepatite, enquanto outros que fazem uso moderado a desenvolvem. Porém, a DHA está mais frequentemente associada a níveis altos de consumo de álcool.<sup>1,2</sup>

3 O álcool é um importante fator de risco para doenças crônicas e uma das principais causas preveníveis de morbimortalidade. A carga global de doença da DHA pode ser minimizada com intervenções principalmente nos estágios iniciais da doença.<sup>4</sup> Em princípio, toda a carga global da DHA é evitável, porém difícil de alcançar, pois interfere em hábitos individuais e culturais de longa data.

4 A esteatose é o estágio precoce da DHA e frequentemente é revertida com a abstinência ao álcool, sendo a cessação do consumo sua principal terapêutica, melhorando os desfechos clínicos e histológicos, além da sobrevivência.<sup>5</sup>

5 Tratamento farmacológico para esteatohepatite alcólica (EHA) é frequentemente usado para hepatite aguda e para promover abstinência alcólica. Porém, não há medicações específicas aprovadas para tratamento da DHA no momento, sendo seu uso experimental.<sup>5</sup> Por essa razão, é importante buscar intervenções no estilo de vida e comportamento que contribuam para o tratamento e a prevenção da DHA.

6 Evidências têm surgido quanto a possíveis benefícios hepáticos do treinamento físico. A ação do exercício aeróbio pode estar inversamente associada com o desenvolvimento de esteatose, seja mediada pela perda de peso, seja por efeitos diretos. Ou seja, o exercício aeróbio regular pode reduzir os níveis de gordura hepática e esse benefício pode ocorrer, embora em menor extensão, sem perda de peso.<sup>6,7,8,9</sup> Essa revisão sumariza conceitos clássicos da patogênese da DHA e efeitos do exercício físico sobre o fígado saudável e na DHA.

### 7 REVISÃO DE LITERATURA E DISCUSSÃO

#### 8 Fígado e Doença Hepática Alcólica

9 O álcool possui propriedade de nutriente, fornecendo calorias (7Kcal/g), sendo também uma toxina. Gera uma carga metabólica e subprodutos oxidativos, funcionando como solvente orgânico e regulador fisiológico direto.<sup>10</sup> As calorias derivadas do metabolismo do álcool são produzidas às custas do metabolismo dos demais nutrientes, pois a oxidação do álcool é preferencial ao de outros nutrientes.<sup>11</sup> Embora as taxas variem, a capacidade metabólica média para remover o álcool é de cerca de 170 a 240 g por dia para uma pessoa com um peso corporal de 70 kg. Esta capacidade é aproximadamente uma dose-padrão por hora<sup>12</sup> (Tabela 1).

10 Tabela 1. Dose padrão de álcool definida pela Organização Mundial de Saúde

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

[http://www.sgoonline.com.br/mmg/sgo/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fiuvn=4458/cod\\_vercao=87480h5submitao=18/cache=54958](http://www.sgoonline.com.br/mmg/sgo/detalhe_simples.asp?cod_fiuvn=4458/cod_vercao=87480h5submitao=18/cache=54958)



Cerveja/Chope	Vinho	Destilados	Dose padrão (álcool puro)
330 mL a 4%	100 mL a 12% ou 70 mL a 18%	30 mL a 40%	10-12 g

**11** A lesão hepática por uso crônico de álcool origina-se na zona perivenosa do lobo hepático por ser uma região menos oxigenada, com menor capacidade de reações de redução, maior concentração de citocromo P450 (CYP2E1) e menores níveis de antioxidantes (glutathione)<sup>1,2</sup>.

**12** Os achados morfológicos da DHA não são específicos dessa condição.<sup>10,13</sup> As alterações iniciam-se com a esteatose hepática como resultado do prejuízo da síntese, armazenamento, mobilização e quebra de gorduras. Com a progressão da injúria, há indução de inflamação, lesão celular e apoptose, todos contribuindo para a esteatohepatite. O etanol induz o citocromo CYP2E1, produzindo acetaldeído tóxico e espécies reativas de oxigênio; endotoxinas derivadas do intestino ativam células de Kupffer, produzindo citocinas inflamatórias; ácidos graxos livres armazenados promovem estresse oxidativo e apoptose de hepatócitos. Por fim, ocorre deposição de fibrose por células estreladas hepáticas ativadas.<sup>1,2,14</sup>

**13** A esteatose é definida por conteúdo hepatocitário de gordura  $\geq 5\%$ <sup>6</sup> e desenvolve-se em aproximadamente 90% dos indivíduos que ingerem mais de 60g/dia de etanol, sendo completamente reversível após 4 a 6 semanas de abstinência. A fibrose e a cirrose desenvolvem-se em 5 a 10% dos indivíduos. Existe um risco elevado para desenvolver lesão hepática progressiva mesmo na esteatohepatite (EHA) leve, com cirrose desenvolvendo-se em mais de 50%. Abstinência alcoólica está associada com normalização histológica em 27% dos pacientes com hepatite alcoólica, com progressão para cirrose em 18% e hepatite persistente nos demais.<sup>14</sup> Apesar de ser considerada uma anormalidade histológica benigna e reversível, pacientes com esteatose que persistem no uso de álcool podem desenvolver fibrose e, em alguns casos, cirrose, sem desenvolvimento prévio de EHA.<sup>15</sup> Pode cursar como uma hepatomegalia assintomática e sintomas digestivos inespecíficos.

**14** O álcool e seus metabólitos (acetaldeído, ésteres de ácidos graxos e etanol, compostos proteínas-etanol) atuam como hepatotoxinas, sendo que seu metabolismo (vias oxidativas e não-oxidativas) é o responsável pelos principais mecanismos de toxicidade do álcool.<sup>11</sup> Figura 1.

1. Via oxidativa citosólica (desidrogenases)

**15** Via usual, gera energia oxidativa abundante e as enzimas álcool desidrogenase e a acetaldeído desidrogenase participam do processo. Os produtos finais dessa reação são acetaldeído, acetato e altos níveis de NADH. O excesso de NADH não pode ser oxidado a  $NAD^+$  nas mitocôndrias e seu excesso entra na reação de síntese de ácidos graxos, formando triglicerídeos, que se acumulam em gotículas lipídicas citosólicas, contendo além dos triglicerídeos e ácidos graxos, monoglicerídeos e diglicerídeos. O fígado normalmente não estoca triglicerídeos, mas após ingestão moderada de álcool, gotículas lipídicas microvesiculares acumulam-se nos hepatócitos. A redução da relação  $NAD^+/NADH$  pode afetar reações bioquímicas na mitocôndria e expressão gênica no núcleo. A carga de NADH requer quantidades extras de oxigênio na mitocôndria para ser oxidada e os hepatócitos não conseguem captar oxigênio do sangue arterial em quantidades suficientes para suprir adequadamente todas as regiões do fígado. Assim, o consumo de álcool resulta em hipóxia significativa perivenular, região que mostra a primeira evidência de lesão do consumo crônico de álcool e pode ser suficiente para levar a prejuízos na síntese protéica<sup>2</sup>. O acetaldeído é gatilho para inflamação, remodelamento da matriz extracelular e fibrogenese por meio de ação nas células estreladas. Sua forma covalente liga-se a proteínas e DNA levando a produtos imunogênicos, como malondialdeído, e efeitos pró-carcinogênicos.<sup>1,2,11,14</sup> O dano oxidativo afeta o transporte da carga de lipídeos produzidos, prejudicando sua liberação para circulação. Ocorre acúmulo de lipoproteínas como VLDL, distendendo o aparelho de Golgi, contribuindo para a esteatose. Essa maior disponibilidade de vesículas gordurosas fornece amplo substrato para peroxidação lipídica em subprodutos como malondialdeído. Existe uma clara relação entre dano oxidativo e inflamação e doenças associadas ao alcoolismo, como disfunção cerebral, doenças ósseas e musculares, alterações pulmonares, aumento da gravidade de infecções, subnutrição e aumento da prevalência de doenças cardiovasculares ou câncer.<sup>16,17</sup> O aumento da relação  $NADH/NAD$  também pode relacionar-se a hipoglicemia grave por intoxicação aguda ao álcool e o álcool pode, em certas condições, relacionar-se a hiperglicemia por menor uso periférico da glicose. O metabolismo de esteróides, assim como o da galactose, serotonina e outras aminas podem interferir ainda no aumento da relação

NADH/NAD<sup>2</sup>.

**16** 2. Via oxidativa Citocromo P450 (especialmente CYP2E1)

**17** O consumo crônico de álcool leva a "*up-regulation*" do citocromo P450, especialmente o 2E1 (CYP2E1), que auxilia a álcool desidrogenase na conversão do etanol em acetaldeído. Trata-se de uma via de menor importância em condições usuais para o metabolismo de álcool, mas extremamente tóxica: forma acetaldeído e o radical 1-hidroxietil, responsável por interações drogas-álcool; ativa toxinas como acetaminofen, halotano, benzeno, hidrocarbonetos halogenados em produtos intermediários reativos tóxicos; ativa procarcinogênicos como nitrosaminas e compostos azo em carcinogênicos ativos; ativa o oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, que induzem a peroxidação lipídica e formação de produtos proteína-acetaldeído. A produção do radical superóxido e peróxido de hidrogênio podem ser mecanismos para a lesão hepática induzida pelo estresse oxidativo.<sup>1,2,11,18</sup>

**18** 3.Via Peroxissomal

**19** Via não usual, mas a enzima catalase peroxissomal pode utilizar o álcool como substrato na presença de excesso de peróxido de hidrogênio<sup>2</sup>. A atividade da catalase aumenta significativamente após uso combinado de álcool e atividade física, tanto por liberação da enzima dos tecidos para o plasma, quanto por mecanismo compensatório para lidar com excesso de peróxido de hidrogênio.<sup>19</sup>

**20** 4. Reações de conjugação e síntese de acil graxos.

**21** O etanol pode reagir com o ácido glicurônico formando etilglucoronide e, com ácidos graxos, produzindo esteracil graxos, principalmente no fígado e pâncreas, podendo ser tóxicos ao inibir a síntese de DNA e de proteínas. Se o metabolismo oxidativo é bloqueado, a via de síntese de acil graxos aumenta sua função.<sup>11</sup>

**22** Mecanismos imunes também relacionam-se com o aparecimento e progressão da DHA.<sup>18</sup> Os lipopolissacarídeos derivados do intestino são um ponto crítico para esteatose hepática, inflamação e fibrose. O álcool favorece translocação bacteriana (gram positivas e negativas) por alterar a barreira intestinal, aumentando níveis de endotoxinas circulantes que se ligam aos receptores de superfície CD14 nas células de Kupffer. Essas células são ativadas precocemente na DHA, produzem espécies reativas de oxigênio, liberam citocinas inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) e podem ter um papel chave na patogênese da lesão induzida pelo álcool. Portanto, disfunção na barreira intestinal, clearance alterado de endotoxinas ou alteração da composição da microbiota são alguns dos mecanismos que podem explicar os altos níveis de endotoxinas após exposição ao álcool, existindo evidências de que a disfunção da barreira intestinal e a endotoxemia precedem a lesão hepática. As endotoxinas ativam isoladamente as células de Kupffer, enquanto o TNF- $\alpha$ , por sua vez, mantém a lesão hepática por piorar a permeabilidade intestinal e sustentar o dano necroinflamatório do fígado.<sup>4</sup>

**23** Exercício Físico, Álcool e Fígado

**24** O fígado é o principal órgão do corpo na regulação dos estoques de carboidratos e lipídeos, garantindo oferta de metabólitos tanto para atividades físicas, quanto para síntese de tecido muscular e cerebral<sup>9</sup>.

**25** De forma geral, o álcool em esportes e exercícios pode afetar as habilidades psicomotoras pelo uso agudo, podendo reduzir a performance e interferir nos mecanismos de regulação da temperatura corporal durante o exercício. Além disso, o consumo de álcool reduz o uso de glicose e aminoácidos pelo músculo esquelético com efeitos adversos no fornecimento de energia e prejuízo de processos metabólicos durante o exercício, podendo causar miopatia alcóolica.<sup>20</sup>

**26** Com relação ao fígado, o exercício isoladamente não alterou a função mitocondrial em um estudo experimental, mas quando associado ao consumo de álcool, verificou-se a ausência de alteração significativa na função oxidativa da mitocôndria hepática, concluindo-se que o treinamento físico pode ter atenuado o declínio mitocondrial hepático induzido pelo etanol.<sup>21</sup>

**27** Tanto o exercício agudo, quanto o treinamento físico podem aumentar as taxas de metabolismo hepático microsomal do álcool sem alterar a atividade da enzima álcool desidrogenase.<sup>22</sup>

**28** Sugere-se que o aumento da temperatura corporal durante o exercício pode aumentar a atividade de enzimas



hepáticas envolvidas no metabolismo do etanol.<sup>11,19</sup> Parece haver um pequeno aumento na taxa de eliminação do álcool, causada provavelmente por aumento da temperatura corporal ou pela liberação de catecolaminas.<sup>11</sup>

**29** A interação entre exercício físico e fígado apresenta os seguintes achados<sup>9</sup>:

**30** 1) O exercício agudo reduz transitoriamente o fluxo sanguíneo hepático, mas parece haver recuperação do fluxo sanguíneo com o repouso, inclusive podendo aumentar algumas horas após sua interrupção. Esse aumento poderia refletir inflamação, mas também serviria para reposição dos estoques de glicogênio e aumento da depuração de triglicerídeos da circulação.

**31** 2) O exercício aumenta a liberação de glicose a partir da glicogenólise e gliconeogênese para manter sob controle a glicemia sanguínea e aumenta a oxidação da glicose para obter energia durante o exercício prolongado. Após 90-180 minutos de exercício aeróbio vigoroso, dependendo da dieta e treinamento do indivíduo, os estoques de glicogênio do fígado e músculo podem se exaurir. O aumento da gliconeogênese induzida pelo exercício é estimulada pela redução da secreção de insulina e aumento das concentrações de glucagon. Existem muitas hipóteses concorrentes sobre gatilhos das adaptações hepáticas do metabolismo de carboidratos durante o exercício agudo. Ainda não está claro, se alterações hormonais, alterações na concentração substrato/metabólito, citocinas, espécies reativas de oxigênio ou alterações associadas ao fluxo sanguíneo hepático iniciam essas alterações metabólicas. Parece que o treinamento aeróbico induz adaptações metabólicas tanto em humanos, quanto em animais, auxiliando na homeostase da glicose durante o exercício prolongado, incluindo aumento dos estoques de glicogênio tanto no fígado quanto no músculo e fornecimento de carboidratos por meio de maior metabolismo lipídico.

**32** 3) Uma série aguda de exercícios tem pouco efeito imediato no metabolismo lipídico e pode realmente aumentar levemente o conteúdo de triglicerídeos no fígado. O exercício crônico pode mostrar *up-regulation* de enzimas hepáticas e redução global dos níveis de gordura hepática, havendo uma adaptação positiva, levando a redução dos triglicerídeos hepáticos. Durante o exercício agudo, pode haver *up-regulation* de enzimas hepáticas e redução da expressão de enzimas lipogênicas. Ocorre aumento da capacidade do uso de gordura durante o treinamento físico regular pelo músculo esquelético, sendo que, até o momento, parece que o fígado contribuiria muito pouco com essa resposta. O treinamento físico também ameniza o hormônio lipolítico em resposta ao exercício, estando associado com alterações no metabolismo lipídeo/lipoproteína, associando-se ainda com a redução da quantidade de triglicerídeos estocados no fígado.

**33** 4) Uma série de exercício agudo sustentado pode aumentar a síntese protéica hepática, mas durante atividade prolongada, o fígado produz glicose a partir de aminoácidos liberados da musculatura esquelética para manter o controle glicêmico. Já o treinamento resistido parece que aumenta a produção de proteínas do choque térmico e reduz a secreção de proteínas orexígenas, aumentando a concentração de albumina sérica.

**34** 5) Durante o exercício agudo, pode haver *up-regulation* dos sistemas protetores contra mutação gênica e choque térmico e aumento de fatores de crescimento transformadores como a folistatina.

**35** Existem poucos achados epidemiológicos sobre o efeito da atividade física sobre a DHA. Confirmar o efeito preventivo da atividade física sobre o acúmulo de gordura hepática para alcoolistas leves e pesados é uma informação muito útil para todas as pessoas, mas especialmente para aqueles que não conseguem reduzir ou interromper o uso de álcool.<sup>24</sup> Além disso, 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.<sup>6,7,8,9</sup>

**36** Porém, torna-se necessário salientar que a fadiga dificulta a implementação e manutenção da atividade física regular em pessoas com doença hepática avançada. Pacientes com cirrose apresentam capacidade aeróbica reduzida e menor força muscular que paciente saudáveis, parecendo haver correlação inversa entre gravidade da doença hepática, independente de sua causa, e a capacidade física.<sup>24,25</sup>

**37** O treinamento físico pode atenuar danos hepáticos oxidativos induzidos pelo álcool e auxiliar na manutenção do sistema antioxidante. Sugere-se que o aumento da temperatura corporal durante o exercício pode aumentar a atividade de enzimas hepáticas envolvidas no metabolismo do etanol.<sup>19</sup>

**38** A atividade física moderada a vigorosa está associada inversamente com mortalidade por todas as causas entre

indivíduos com história auto-relatada de doença hepática, sendo que o uso de álcool e hepatite C parecem não influenciar essa relação. Ou seja, aumentos modestos na atividade física moderada a vigorosa podem ter benefícios na sobrevivência de pacientes com doença hepática. Esse benefício pode ser por efeitos cardiometabólicos favoráveis e influência no metabolismo lipídico.<sup>26</sup>

**39** O consumo crônico de álcool e o envelhecimento são os principais fatores que levam a redução das atividades das enzimas antioxidantes hepáticas. O álcool reduz os níveis de superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione, enquanto aumenta os níveis de malondialdeído no tecido hepático, sendo que o estresse oxidativo produzido pelo álcool em idosos é provavelmente maior pela redução de antioxidantes que ocorre naturalmente com a idade.<sup>27</sup>

**40** Nesse sentido, o treinamento físico parece contribuir para atenuar os danos oxidativos, com aumento do estado antioxidante hepático.<sup>19</sup> O treinamento físico (30 minutos de esteira, 5 vezes por semana, durante 2 meses) conseguiu reverter o aumento da peroxidação lipídica hepática e a redução do estado antioxidante em ratos idosos (1 ano e meio de vida) induzidos pelo consumo de álcool por 2 meses (2g etanol/Kg a 20%).<sup>28</sup> Parece que a redução idade-dependente do sistema de depuração de radicais livres pode sofrer deterioração com o uso de álcool e o treinamento físico pode auxiliar na reversão dessa deterioração.<sup>29</sup>

**41** O prejuízo no estado redox pode levar à lesão do DNA, modificação protéica e peroxidação lipídica. O índice de estado redox sanguíneo reflete geralmente o estado redox corporal e o estresse oxidativo pode alterar a permeabilidade da membrana e levar a hemólise como citado anteriormente. O consumo excessivo de álcool está associado com redução da glutathione reduzida e aumento da GGT e substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas. O exercício agudo aumentou a resposta das enzimas hepáticas em bebedores pesados, enquanto atenuou a resposta elevada antioxidante após o exercício físico agudo quando comparado ao grupo controle<sup>17</sup>. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a verdadeira relação entre o treinamento físico e a função hepática e não apenas considerando o exercício agudo.

**42** O estresse oxidativo induzido pelo exercício ativa as vias de sinalização que aumentam a expressão de antioxidantes e são também responsáveis pelo processo de adaptação induzida pelo exercício. Essa adaptação é influenciada por vários fatores, incluindo o volume do treinamento físico, intensidade, frequência e modalidade do exercício.<sup>30</sup>

#### **43 CONCLUSÃO**

**44** A ingestão crônica de álcool causa danos tóxicos diretos e indiretos ao aumentar o estresse oxidativo, reduzir os níveis de antioxidantes não-enzimáticos, reduzir a relação NAD<sup>+</sup>/NADH, alterar a função mitocondrial, aumentar a peroxidação lipídica e aumentar a produção de acetaldeído.

**45** Por outro lado, os exercícios podem ser uma terapia útil para melhorar a performance e capacidade funcional em indivíduos com doença hepática, podendo ter alguma influência positiva direta, além da simples modificação dos níveis de gordura no fígado. Parece também que a intensidade da atividade física é importante para prevenir a progressão da doença, porém mais estudos são necessários para definir se o exercício físico pode restaurar a saúde hepática e qual seria a quantidade e o tipo de exercício necessários.

#### **46 CONFLITO DE INTERESSES**

**47** Esse artigo é parte da Dissertação de Mestrado de Marina Silva de Lucca (UFV/MG). Os autores não possuem ligação com indústrias do álcool, farmacêuticas ou esportivas, nem conflitos de interesse com organizações que promovem auxílio para o tratamento de dependência ao álcool. Esse trabalho não foi financiado por indústrias das áreas mencionadas acima.

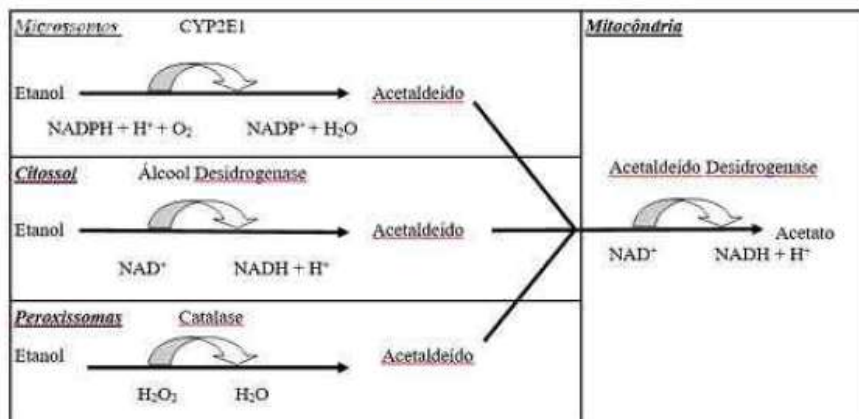
#### **48 REFERÊNCIAS**

1. Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. Alcoholic Liver Disease: Pathologic, Pathogenetic and Clinical Aspects. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991; 15: 45-66.
2. Lieber CS. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. 1993; *Baillieres Clin Gastroenterol* 7: 581-608.
3. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism - NIAAA. (2016) Turning Discovery Into Health National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Disponível em: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/AlcoholFacts&Stats/AlcoholFacts&Stats.pdf> e <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol->

- health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking Acesso em 03/06/2016 às 15:26.
4. Rocco A, Compare D, Angrisani D, Zamparelli MS, Nardone G. Alcoholic disease: Liver and Beyond. *World J Gastroenterol.* 2014; 28: 14652-9.
  5. Scaglioni F, Ciccia S, Marino M, Bendogni G, Bellentani S. ASH and NASH. *Dig Dis.* 2011; 29: 202-10.
  6. Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK et al. Effect of 6-Month Calorie Restriction and Exercise on Serum and Liver Lipids and Markers of Liver Function. *Obesity.* 2008; 16: 1355-62.
  7. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. Aerobic Exercise Training Reduces Hepatic and Visceral Lipids in Obese Individuals Without Weight Loss. *Hepatology.* 2009; 50 (4): 1105-12.
  8. Keating SE, Hackett DA, Parker HM et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol.* 2015; 63:174-82.
  9. Shephard JR, Johnson N. Effects of physical activity upon the liver. *Eur J Appl Physiol.* 2015; 115:1-46.
  10. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012; 16: 667-85.
  11. Crawford JM. Histologic Findings in Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2012; 16: 699-716.
  12. World Health Organization. (2010) Self-help strategies for cutting down or stopping substance use: a guide. 1.Substance-related disorders - prevention and control. 2.Self care. 3.Attitude to health. 4.Internal-external control. I. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44322/1/9789241599405\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44322/1/9789241599405_eng.pdf) Acesso em 03/06/2016 às 15:28.
  13. Lefkowitz JH. Morphology of Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2005; 9:37-53.
  14. Federico A, Cotticelli G, Festi D, Schiumerini R, Addolorato G, Ferrulli A et al. The effects of alcohol on gastrointestinal tract, liver and pâncreas: evidence-based suggestions for clinical management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015; 19:1922-40.
  15. Schwartz JM, Reinus JF. Prevalence and Natural History of Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2012; 16: 659-66.
  16. González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol.* 2014; 28: 14.660 – 71.
  17. Georgakouli K, Manthou E, Fatouros IG et al. Effects of acute exercise on liver function and blood redox status in heavy drinkers. *Exp Ther Med.* 2015; 10: 2015-22.
  18. Duddempudi AT. Immunology in Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2012; 16: 687-98.
  19. Husain K, Somani SM. Interaction of Exercise Training and Chronic Ethanol Ingestion on Hepatic and Plasma Antioxidant System in Rat. *J Appl Toxicol.* 1997; 17: 189-94.
  20. El-Sayed MS, Ali N, Ali ZE. Interaction Between Alcohol and Exercise Psysiological and Haematological Implications. *Sports Med.* 2005; 35(3): 257-69.
  21. Ardies CM, Morris GS, Erickson CK, et al. Effects of exercise and ethanol on liver mitochondrial function. *Life Sci* 1987; 1640: 1053-61.
  22. Ardies CM, Morris GS, Erickson CK, et al. Both acute and chronic exercise enhance in vivo ethanol clearance in rats. *J Appl Physiol.* 1989; 66: 555-60.
  23. Tsunoda K, Kai Y, Uchida K et al. Physical activity and risk of fatty liver in people with different levels of alcohol consumption: a prospective cohort study. *BMJ Open.* 2014. 4:e005824. Doi:10.1136/bmjopen-2014-005824.
  24. Jones JC, Coombes JS, Macdonald GA. Exercise Capacity and Muscle Strength in Patients With Cirrhosis. *Liver Transplantation.* 2012; 18:146-51.
  25. Lemyzea M, Dharancy S, Wallaert B. Response to exercise in patients with liver cirrhosis: Implications for liver transplantation. *Digestive and Liver Disease.* 2013; 45: 362-6.
  26. Loprinzi PD e VanWagner LB. Survival effects of psysical activity on mortality among persons with liver disease. *Preventive Medicine Reports.* 2016; 3: 132-4.
  27. Mallikarjuna K, Nishanth K, Reddy KS. Hepatic glutathione mediated antioxidant system in ethanol treated rats: Decline with age. *Pathophysiology.* 2007; 14: 17-21.
  28. Mallikarjuna K, Nishanth K, Hou CW et al. Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats. *Alcohol.* 2009; 43: 59-64.
  29. Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K et al. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol.* 2010; 44: 523-9.
  30. Jamurtas AZ, Zourbanos n, Georgakouli K et al. Beta endorphin and alcohol urge responses in alcoholic patients following na acute bout of exercise. *J. Addict Res Ther.* 2014; 5: 1000194.

**Imagens enviadas pelo autor. (Images sent by the author)**

1 Figura





## ARTIGO 2

### Original Article

#### *Hepatocytes morphometry after chronic use of alcohol and exercise training in rats*

Marina Silva de Lucca<sup>1,2</sup>, Eveline Torres Pereira<sup>2</sup>, Thamires Righi<sup>3</sup>, Camilo Amaro de Carvalho<sup>1</sup>, Clayton Israel Nogueira<sup>1</sup>, Daise Nunes Queiroz da Cunha<sup>4</sup>, Antônio José Natali<sup>2</sup>, Luciana Moreira Lima<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Medicine and Nursing - Federal University of Viçosa, MG, Brazil*

<sup>2</sup> *Graduate Program in Physical Education - Federal University of Viçosa, MG, Brazil*

<sup>3</sup> *Department of Biochemistry and Molecular Biology - Federal University of Viçosa, MG, Brazil*

<sup>4</sup> *Department of Veterinary Medicine - Federal University of Viçosa, MG, Brazil*

\* Corresponding author:

Profa. Dra. Luciana Moreira Lima - Departamento de Medicina e Enfermagem, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs, s/n – Centro – Viçosa, Minas Gerais – CEP 36570-000 – Tel: (31) 3899-3904 – e-mail: [luciana.lima@ufv.br](mailto:luciana.lima@ufv.br)

#### **FUNDING**

This work was supported by the Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil). AJN is a fellow of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. This article is part of the Master's degree thesis of MSL (Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil).

## ABSTRACT

**Background:** Physical exercise can be an adjunctive therapy in Alcoholic Liver Disease, for its possible action inversely associated with the development of steatosis, mediated by weight loss or by direct effects. The aim of this study was to investigate the effects of physical training on the liver morphology and morphometry after chronic use of alcohol in rats.

**Methods:** Twenty-four Wistar rats were housed in cages with controlled environment and randomly divided into four groups according to treatment received. In the initial treatment, alcohol was administered to sedentary alcohol (SA) and exercise alcohol (EA) groups. After four weeks, physical training program was held on a treadmill with EA and exercise control (EC) groups. The following parameters were analyzed for the nucleus and cytoplasm of hepatocytes: area, perimeter, maximum and minimum diameter and form factor.

**Results:** Microvesicular fatty degeneration, predominantly pericentrolobular, of mild to moderate intensity, was found especially in animals treated with alcohol. EC group showed nucleus area greater than the nucleus area of EA and SA groups. The form factor was lower in the EC group than in the EA group. EA group showed maximum cytoplasm diameter lower than in sedentary control (SC) group.

**Conclusions:** Physical training for two weeks was not enough to suppress histopathologic changes in the liver caused by chronic use of alcohol in rats. Chronic use of alcohol seems to have minimized the beneficial effect of physical training in the nucleus area of hepatocytes.

**Keywords:** Alcohol, Exercise, Steatosis, Alcoholic liver disease, Animal Model.

## INTRODUCTION

Alcoholic liver disease (ALD) includes a spectrum of diseases ranging from simple steatosis to hepatocellular carcinoma, whose genetic and environmental factors interact to produce a disease phenotype and its progression (Ishak et al., 1991; Lieber, 1993; Harrison and Burt, 1993). This feature could explain why some individuals who make heavy use of alcohol (NIAAA, 2016) do not progress to steatohepatitis, while others who make moderate use do develop it (Lieber, 2004; Liu, 2014). However, ALD is most often associated with high levels of alcohol consumption (Bertola et al., 2013; Sheron, 2016).

Steatosis develops in approximately 90% of subjects who ingest more than 60g / day ethanol, but this condition is completely reversible after 4 to 6 weeks of abstinence. Fibrosis and cirrhosis develops in 5 to 10% of individuals. Even in mild forms of alcoholic hepatitis, there is a high risk of developing progressive liver damage, with the development of cirrhosis in over 50% of cases. Alcohol abstinence is associated with histological normalization in 27% of patients with alcoholic hepatitis, with progression to cirrhosis in 18% and persistent hepatitis in the others (Frederico et al., 2015; French, 2015). Although considered a benign and reversible histological abnormality, patients with steatosis that persist consuming alcohol may develop fibrosis and in some cases, cirrhosis, without prior development of steatohepatitis (Schwartz and Reinus, 2012).

In principle, the entire global burden of ALD is preventable but difficult to achieve because it interferes with longstanding individual and cultural habits. The approach to minimize the global burden of ALD involves interventions particularly in the early stages of the disease (Rehm et al., 2013; Rocco, 2014).

In this perspective, exercise can be an adjunctive therapy in ALD treatment because results have suggested that the action of aerobic exercise is inversely associated with the development of steatosis, either mediated by weight loss, either by direct effects. Regular

aerobic exercises can reduce the levels of hepatic fat, and this benefit may occur, although to a lesser extent, with no weight loss. Studies generally address nonalcoholic fatty liver disease and little is known about the effect of exercise on ALD (Larson-Meyer et al., 2008; Johnson et al., 2009; Keating et al., 2012; Eckard et al., 2013;. Keating et al., 2015; Shephard and Johnson, 2015).

Animal models have been an important tool for understanding the progression mechanism of the various stages of this disease, signaling pathways that lead to injury and regeneration, allowing the identification of therapeutic targets (Mathews, 2014). Therefore, the aim of the present study was to investigate the effects of exercise training on liver morphology and morphometry after chronic use of alcohol in rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Preparation of Animals***

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Viçosa (UFV). All experimental procedures were performed in accordance with the ethical principles of animal experimentation, proposed by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA).

Twenty-four male Wistar rats aged 90 days from the Central Animal Facility of the Laboratory of Biological Sciences and Health of UFV were used. The animals were randomly divided into four groups:

1. Sedentary control group (no alcohol) (SC, n = 6): animals that received no alcohol and were not exercised.
2. Exercise control group (no alcohol) (EC; n = 6): animals that received no alcohol but have been exercised.
3. Exercise alcohol group (EA; n = 6): Animals that received alcohol and were exercised.



4. Sedentary alcohol group (SA; n = 6): animals that received alcohol but were not exercised.

Animals from experimental groups were housed in cages and divided according to treatments, i.e., one cage for each group in an environment with controlled average temperature and light-dark cycle of 12 hours (07:00 am to 07:00 pm). Animals received food and water *ad libitum* on free demand. Food and water were replenished every other day, as well as the cleaning of cages. Animals received food or water throughout the experiment.

Alcohol was administered at the dosage of 4g / kg / day, considered as heavy use (Mathews et al., 2014), to EA and SA animals for four weeks by gavage from 12:30 pm to 13:30 pm (Bertola et al., 2013). Control animals received water by gavage at the same time for about 10 days. The initial ethanol concentration was 5% (v / v), increased by 5% (v / v) every two days up to final concentration of 20% (v / v). Final concentration was reached on the seventh day of gavage and maintained until completing the fourth week of treatment. Four to twelve weeks of alcohol consumption correspond to chronic use for Wistar rats (Mathews et al., 2014).

The weight of animals was obtained every two days to readjust the volume of alcohol administered, keeping the proportion of 4 g / Kg / day.

After the fourth week, alcohol administration was interrupted to EA and SA groups. EA and EC animals started the physical training program 24 hours after the cessation of alcohol consumption.

Physical training began with a period of adaptation of animals to run on the treadmill. During adaptation, the exercise groups walked 5 meters / minute for 10 minutes / day for 3 days (50 meters per day). After the adaptation phase, exhaustion test was conducted to determine the maximum running speed (MRS). This test was performed as follows: the animal started to run at a speed of 5 meters / minute, with increments of 3 meters / minute every 3 minutes until each animal from experimental groups reached fatigue. The time of

fatigue was set and the test was stopped when the animal failed to maintain the running speed on the treadmill.

The exercise was performed 5 days / week for 2 consecutive weeks (Abadi et al, 2013). On the first day, training duration was 30 minutes, and in the next four days, training duration was increased by 10 minutes / day up to 60 minutes and the intensity was maintained at 65% of MRS, which corresponds to physical activity of moderate intensity. Therefore, from the fifth day, animals exercised for 1 hour / day

A second exhaustion test was performed at the end of exercise training 24 hours prior to sacrifice in order to assess the performance of the animals. The same protocol was followed, calculating 65% of the new of maximum average running speed value.

All 24 animals completed the study after 6 weeks of experiment (four weeks of alcohol consumption followed by two weeks of exercise training). Euthanasia was performed by increasing anesthesia by 4.0% isoflurane in 100% oxygen ( $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) and immediate exsanguination by cardiac puncture. This procedure started after the finding of loss of all reflexes including of hind limbs.

### ***Histopathological Examination of the Liver***

After euthanasia, the liver was collected for histological analysis. The organ was fixed in 10% formalin for 24 hours to paralyze cellular metabolism and preserve tissue structures, followed by dehydration of tissues in 70, 80, 90 and 100% alcohol, followed by diafanization (whitening) with xylene and embedded in paraffin. Tissues were submitted to two dissolved paraffin exchanges ( $57 \pm 2$ ). Subsequently, the material was removed from the oven and left at room temperature to solidify.

The paraffin block with the tissue was taken to the microtome and sliced to a thickness of  $5\mu\text{m}$ . The paraffin sections were carefully separated by a scalpel and were placed

in a water bath (warm water) so that the folds caused by cutting the tissue disappeared.

The inclusion paraffin was removed. The section adhered to the glass slide was washed in xylol to dissolve the paraffin, immersed in a series of decreasing ethyl alcohol concentrations to be hydrated and then placed in the dye. In the case of eosin hematoxylin, the tissue was immersed first in haematoxylin, washed with water to remove excess and then immersed in eosin, being washed again, passing through increasing alcohol concentrations for removal of water (dehydration). A cover slip was placed over the cut delicately, covering and completely protecting the section.

Histological analysis was performed at the Laboratory of Pathology, Department of Medicine and Nursing, Federal University of Viçosa, in Olympus<sup>®</sup> BX 41 light microscope Olympus BX 41. Images were obtained in Olympus C31 photomicroscope, which were morphometrically analyzed using the Image-Pro Plus<sup>®</sup> software (Media Cybernetics). A veterinarian experienced in pathological analysis performed the blind reading of 48 hepatic tissue fragments (2 fragments per animal).

In addition to the qualitative analysis, the following parameters were analyzed for the nucleus and cytoplasm of hepatocytes: area, perimeter, maximum and minimum diameter and form factor. Six photos were taken of each fragment in 400X fields, 3 photos of the portal region and 3 photos of the central region, since fat accumulation initially occurs in zone 3 (perivenular) of hepatocytes and, with the progression of steatosis, it reaches zones 2 and 1 (periportal) (Ishak et al., 1991; Lieber, 1993; Schwartz and Reinus, 2012; Rehm et al, 2013; Rocco et al, 2014.). In each photos, 10 nuclei and 10 cytoplasm tissues were analyzed. The analysis of parameters was performed by three different researchers and the value considered was the average of the measurements obtained.

For the morphometric analysis of the cytoplasm, the Image-Pro Plus<sup>®</sup> software was used (Media Cybernetics). Variables "area" and "Perimeter" were directly obtained by

manual measurement. Since the morphology of the cytoplasm of hepatocytes is heterogeneous, dysmorphic and not circumferential, the cytoplasmic perimeter of hepatocytes obtained was transformed into circumference in order to obtain the same diameter. For this, parameters "maximum diameter" and "minimum diameter" were indirectly obtained using variables "maximum perimeter" and "minimal perimeter" (provided by manual measurement) and the mathematical formula  $C = 2\pi R$ , where  $C =$  length (perimeter)  $R =$  radius and diameter  $= 2R$ .

The form factor of nucleus and cytoplasm was calculated using the mathematical formula  $[(\text{perimeter})^2 / 4\pi \cdot \text{area}]$ . The smallest value of this factor is equal to one, which means that the shape of the cytoplasm and / or nucleus resembles the shape of a circle. When this factor is greater than one, it is understood that the shape of the cytoplasm and / or nucleus is not circular (Silva et al, 2011).

### ***Statistical analysis***

Initially, all data were submitted to Komolgorov-Smirnov test to verify the normality of data. Then, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test were used for parameters with normal distribution. Nonparametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis test. The T-Student paired test was used to compare the parameters of the initial and final exhaustion test. Sigma Stat software version 1.0 (San Jose, California, United States of America) was used to perform the analyses. The significance level was 0.05. Regarding animal experimentation, the minimum sample size was defined according to an estimated variance previously described in literature (Mallikarjuna, 2009; Mallikarjuna, 2010; Mathews et al, 2014; Righi et al, 2016). The formula proposed by Callegari-Jacques and Cochran was used for the calculation. It was possible to observe significant differences with 5% significance, with a minimum of five animals in each group.

## **RESULTS**

### ***Characteristics of Animals***

The four groups of animals studied showed no statistically significant differences between them with respect to initial weight, weight after 4 weeks of alcohol use and weight at the end of two weeks of exercise (Table 1). The final weight was significantly increased in relation to the initial weight of SC, EC and SA groups, a fact that was not observed in the EA group. There was significant weight gain in EC and SA groups after 4 weeks of experiment. This finding was not found in SC and EA groups (Table 1).

Before starting the experiment, the exhaustion time (when the animal reaches fatigue) and the maximum running speed did not differ significantly between groups (Table 2 e 3). Exercise groups (EC and EA) showed significant increases in the exhaustion time and maximum running speed compared to SA group at the end of the experiment. However, only EA group showed increased exhaustion time compared to SC group (Table2 e3).

### ***Qualitative Histological Analysis (Morphology of Hepatocytes)***

Qualitative analysis of the blades defined the following diagnostic impressions:

- SC and EC groups: very mild microvesicular and pericentrolobular fatty degeneration of normal aspect and without alterations.
- EA group: mild microvesicular and pericentrolobular fatty degeneration with small amount of Mallory bodies.
- SA group: mild microvesicular and pericentrolobular fatty degeneration with rare Mallory bodies.

Therefore, there was microvesicular fatty liver degeneration, predominantly pericentrolobular of mild to moderate intensity, especially in animals fed with diet with alcohol.

### ***Quantitative Histological Analysis (Morphometry of Hepatocytes)***

Tables 4 and 5 show the results observed for the analysis of nucleus and cytoplasm of hepatocytes, respectively, in the different groups.

EC group showed nucleus area significantly greater than the nucleus area of EA and SA groups. However, the form factor observed was significantly lower in the EC group compared with the EA group. For the other nucleus parameters, significant differences were observed among groups.

EA group exhibited maximum cytoplasm diameter lower than the maximum diameter for SC group. For the other parameters, no significant differences were observed among groups.

## **DISCUSSION**

This study evaluated morphometric and histopathologic changes of hepatocytes induced by chronic alcohol use and the effect of physical activity on them. The main finding was the larger nuclear area of hepatocytes in control exercise group compared to both groups treated with alcohol. Initial fatty liver degeneration was also observed in animals treated with alcohol, with no improvement of the histopathological pattern in animals submitted to physical activity.

The hepatocyte nuclear morphometric analysis showed that the group of animals that were not treated with alcohol and participated in physical training (EC) had a significantly higher nuclear area than the nuclear area of groups treated with alcohol (SA and EA) and form factor significantly smaller than in the alcohol and exercise group (EA) (Table 4). The explanation for a smaller nuclear area observed in these animals could be that the direct damage to cellular DNA is among the dangers of alcohol consumption (Gallego-Durán et al., 2013). Moderate physical activity can help reduce the hepatic oxidative stress through

modulation of reactive oxygen species, increase the synthesis of antioxidant enzymes, up-regulation of protective systems against gene mutation and thermal shock, and increase growth factors such as follistatin (Shephard and Johnson, 2015; Guo et al, 2015). The increase of these substances requires larger nuclear activity, since it requires that the DNA is mostly in the form of euchromatin and devoid of spiral form to allow RNA transcription and hence with increased nuclear area. This could explain the greater nuclear area observed in animals that received no alcohol and underwent exercise. In the group submitted to exercise and alcohol consumption, this beneficial effect of exercise may have been minimized by previous changes caused by alcohol. Regarding the shape factor of the nucleus, closer to 1, the more circular its shape, possibly meaning less deformation, minor damage, which would be expected in the SC group.

In cytoplasmic morphometry, EA group had maximum cytoplasmic diameter significantly lower than the maximum cytoplasmic diameter of the sedentary control group (no alcohol intake) (Table 5). Despite this lower value, other studies have shown similar values for the cytoplasm of control groups (Matheus et al., 2014). Therefore, it could not be concluded that physical exercise in the EA group is associated with cytoplasm reduction. Regarding the form factor of the cytoplasm, the average of groups was between 1.44 and 1.56 (not so close to value 1), not differing significantly, showing that its polyhedral shape with 6 or more surfaces should have kept, even though the EA group has remained with more histological changes.

Histological analysis has shown microvesicular fatty liver degeneration, predominantly pericentrolobular, of mild to moderate intensity, especially in animals fed with diet containing alcohol. ALD appears from oxidative stress, from the toxic effects of the conversion of ethanol into acetaldehyde and increased lipogenic activity and decreased removal of liver triglycerides (Ishak et al., 1991; Lieber, 1993; Donohue, Jr., 2007; Friedrich

et al., 2015). The presence of more pronounced steatosis in animals receiving alcohol by gavage compared to those who did not use this substance confirm the effects already described of alcohol on liver (Schwartz and Reinus, 2012; Bertola et al, 2013; Liu, 2014; Frederick et al, 2015; Sheron, 2016). In these two groups, rare Mallory bodies (MB) were observed, whose presence occurs in approximately 65% to 75% of cases of alcoholic hepatitis (Jensen and Gluud, 1994; Basaranoglu, 2011). MB are intracytoplasmic hyaline corpuscles that although unspecific, are primarily associated with ALD. The pathophysiology and pathological significance are not entirely clear; however, it is known that these bodies are aggregates of intermediate filaments and polypeptides of cytokeratin and other proteins, precipitates and insoluble, resulting from hepatocyte injury. Cytokeratins are products of toxic liver damage, and can contribute to the perpetuation or inflammatory injury (Kato et al, 2006; Basaranoglu, 2011; Crawford, 2012).

The analysis of groups receiving alcohol, when morphologically compared to each other, showed that the exercise group persisted with more MB and pericentrolobular fatty vesicles than the sedentary group, contrary to our initial hypothesis that physical training associated with the cessation of the alcohol use would intensify the regression of alterations caused by alcohol (Ardies et al, 1987; Ardies et al., 1989; Husain & Somani, 1997). One factor that may have contributed to this finding may be the fact that when stopping using alcohol, exercised rats increased consumption of *ad libitum* diet to compensate for the calorie loss due to exercise. Increased food intake, even without significant weight gain in exercise alcohol group (Table 1), may have contributed to the alterations observed. Controlling caloric intake in further studies can help in this differentiation. Another possibility is that acute series of exercises transiently reduce hepatic blood flow and may reduce even more if held for long periods or hot environments, which could increase oxidative stress and favors the permanence of histological changes found (Cederbaum, 2012). It appears that the blood flow



progressively decreases as the exercise intensity increases. Vigorous and / or prolonged exercises also reduce the clearance of substances that depends on the blood flow to their purification. Although the intensity of exercises in our study have been moderate (Tables 2 and 3), it was not possible to observe the liver benefits described in literature with physical activity in animals evaluated.

Aerobic and resistance exercises are also effective in reducing liver fat in patients with nonalcoholic fatty liver disease (Loomba and Cortez-Pinto, 2015). However, there is no data to support that exercise alone without weight loss can improve or reverse nonalcoholic steatohepatitis. Stages of the disease that progressed beyond simple steatosis may require more than exercise alone to achieve histological improvement. Results for non-fatty liver disease have shown that interventions such as changing lifestyle using exercise and calorie restriction inducing weight loss (loss of about 5-10% body weight) are required for improvement of nonalcoholic steatohepatitis (Loomba and Cortez -Pinto, 2015). The results observed in this study support the finding with respect to ALD, but it was not possible to demonstrate the benefit of physical exercise in the regression of liver histological changes caused by alcohol.

Some limitations of this study were the lack of control of the amount of water and diet consumed by animals; the lack of liver biopsy of animals at the end of alcohol consumption to evaluate histology prior to physical training, which would allow a comparison of the magnitude of changes caused by alcohol; the lack of serial biopsies during physical training to observe changes over time; the lack of liver weights; the exercise training is done after alcohol consumption and not combined with it; control animals received water by gavage at the same time in view to avoid placebo effect, but it was stopped after 10 days to avoid unnecessary injury and suffering; others trials used longer exercise protocols: 6,5 to 8 weeks (Husain &Somani, 1997; Mallikarjuna, 2009; Mallikarjuna, 2010).

In conclusion, the results have indicated that aerobic physical training carried out for two weeks was not enough to suppress the histopathological changes in the liver caused by chronic alcohol use in rats. However, these data do not exclude the hepatic benefits of aerobic physical activity, since chronic alcohol use seems to have minimized the beneficial effect of physical training in the nuclear area of hepatocytes.

### **CONFLICT OF INTEREST**

None of the Authors have any connection to alcohol, pharmaceutical or sport industries, nor has the present work been funded by any of these organizations. None of the authors have any financial conflict of interest with organizations that seek to provide help with or promote recovery from addiction.

## REFERENCES

- Abadi THN, Vaghef L, Babri S, Mahmood-Alilo M, Beirami M. (2013) Effects of different exercise protocols on ethanol-induced spatial memory impairment in adult male rats. *Alcohol* 47: 309-316.
- Ardies CM, Morris GS, Erickson CK, Farrar RP. (1987) Effects of exercise and ethanol on liver mitochondrial function. *Life Sci* 1640: 1053-61.
- Ardies CM, Morris GS, Erickson CK, Farrar RP. (1989) Both acute and chronic exercise enhance in vivo ethanol clearance in rats. *J Appl Physiol* 66: 555-60.
- Basaranoglu M, Turhan N, Sonsuz A, Basaranoglu G. (2011) Mallory Denk Bodies in chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 17: 2172-77.
- Bertola, A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. (2013) Mouse Model of Chronic and Binge Ethanol Feeding (The NIAAA Model). *Nat Protoc* 8: 627-36.
- Cederbaum AI. (2012) Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis* 16: 667-85.
- Crawford JM. (2012) Histologic Findings in Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis* 16: 699-716.
- Donohue Jr TM. (2007) Alcohol-induced steatosis in liver cells. *World J. Gastroenterol* 13: 4974-78.
- Eckard C, Cole R, Lockwood J, Torres DM, Williams CD, Shaw JC, Harrison SA. (2013) Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. *Therap Adv Gastroenterol* 6: 249-59.
- Federico A, Cotticelli G, Festi D *et al.* (2015) The effects of alcohol on gastrointestinal tract, liver and pancreas: evidence-based suggestions for clinical management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19: 1922-40.
- French SW. (2015) How to prevent alcoholic liver disease. *Experimental and Molecular*

*Pathology* 98:304-07.

Gallego-Durán R, Ampuero J, Funuyet J, Romero-Gómez M. (2013) Esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica: ¿quiénesson los pacientes y qué podemos hacer por ellos?

*Gastroenterología y Hepatología*36: 587-96.

Guo R, Liong EC, So KF, Fung ML, Tipoe GL. (2015) Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease.

*Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int*14: 139-44.

Harrison DJ, Burt AD.(1993) Pathology of alcoholic liver disease. *Baillière's Clin Gastroenterol* 7:641-62.

Husain K, Somani SM. (1997) Interaction of Exercise Training and Chronic Ethanol Ingestion on Hepatic and Plasma Antioxidant System in Rat. *J Appl Toxicol* 17: 189-94.

Ishak KG, Zimmerman HJ, Ray MB. (1991) Alcoholic Liver Disease: Pathologic, Pathogenetic and Clinical Aspects. *Alcohol Clin Exp Res*15:45-66.

Jensen K, Gluud C. (1994) The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). *Hepatology*20: 1061-77.

Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. (2009) Aerobic Exercise Training Reduces Hepatic and Visceral Lipids in Obese Individuals Without Weight Loss. *Hepatology* 50: 1105-12.

Kato M, Kato S, Horiuchi S, Nagai R, Horie Y, Hayashi K. (2006). Mallory bodies in hepatocytes of alcoholic disease and primary biliary cirrhosis contain N-(carboxymethyl)-lysine-modified cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells. *Yonago Acta Medica* 49: 83-92.

Keating SE, Hackett DA, Parker HM et al. (2015) Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol* 63:174-82.

- Keating SE., Hackett DA, George J. Johnson NA. (2012) Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*57:157-66.
- Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK et al. (2008) Effect of 6-Month Calorie Restriction and Exercise on Serum and Liver Lipids and Markers of Liver Function. *Obesity* 16: 1355–62.
- Lieber CS. (1993) Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 7: 581-608.
- Lieber CS. (2004) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34: 9-19.
- Liu J. (2014) Ethanol and liver: Recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver. *World J Gastroenterol*20: 14672-85.
- Loomba R, Cortez-Pinto H. (2015) Exercise and improvement of NAFDL: Practical recommendations. *J Hepatol* 63:10-12.
- Mallikarjuna K, Nishanth K, Hou CW, Kuo CH, Reddy KS. (2009) Effect of exercise training on ethanol-induced oxidative damage in aged rats. *Alcohol* 43: 59-64.
- Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K, Wu MC, Hou CH, Kuo CH, Reddy KS. (2010) Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 44: 523-529.
- Mathews S, Xu M, Wang H, Bertola A, Gao B. (2014) Animals Models of Gastrointestinal and Liver Diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306: 819–23.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism - NIAAA. (2016) Turning Discovery Into Health National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Available at: <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/AlcoholFacts&Stats/AlcoholFacts&Stats.pdf> e

- <http://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>. Accessed September 30, 2016.
- Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD. (2013) Global burden of alcoholic liver diseases. *JHepatol* 59: 160-68.
- Righi T, Carvalho CA, Ribeiro LM et al. (2016) Consumo de Álcool e a Influência do Exercício Físico na Atividade Enzimática de Ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte*. 22 : 40-44.
- Rocco A, Compare D, Angrisani D, Zamparelli MS, Nardone G. (2014) Alcoholic disease: Liver and Beyond. *World J Gastroenterol*20: 14652-59.
- Schwartz JM, Reinus JF. (2012) Prevalence and Natural History of Alcoholic Liver Disease. *Clin Liver Dis* 16: 659-666.
- Shephard JR, Johnson N. (2015) Effects of physical activity upon the liver. *Eur J ApplPhysiol*115:1–46.
- Sheron N. (2016) Alcohol and liver disease in Europe – Simple measures have the potencial to prevent tens of thousands of premature deaths. *JHepatol* 64: 957-67.
- Silva MHM, Pacheco MR, Girardi,AM, Beraldi-Artoni SM, Santos E, Barreiro FR. (2011) Avaliação Morfométrica dos Hepatócitos de Ratos Diabéticos tratados com NEEM (*Azadirachta indica* A. JUSS) e Estrepto-zootocina 6 CH. *Acta Veterinaria Brasilica* 5: 270-77.

**Table 1 - Average weight of animals during the experimental procedure**

Groups	Parameters			p
	Initial weight (g)	Weight after 4 weeks of the experiment (g)	Final weight (g)	
CS (n=6)	325 ± 22	364 ± 25	376 ± 30 <sup>a</sup>	0.011
CE (n=6)	325 ± 17	379 ± 20 <sup>a1</sup>	375 ± 27 <sup>a2</sup>	<0.01
AE (n=6)	324 ± 31	357 ± 38	362 ± 44	0.206
AS (n=6)	328 ± 29	382 ± 32 <sup>a3</sup>	389 ± 35 <sup>a4</sup>	<0.05

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation (p <0.05). Significant differences are represented by letter: a. vs. Initial weight (p = 0.002 a1; a2 p = 0.003; p = 0.012 a3; a4 p = 0.026, ANOVA followed by Tukey test).

**Table 2 - Mean exhaustion test and maximum speed values at the beginning and end of the experiment**

Parameters	Groups				p
	CS (n=6)	CE (n=6)	AE (n=6)	AS (n=6)	
<b>Time (minutes) – Beginning</b>	13 ± 3	14 ± 4	16 ± 4	11 ± 2	0.092
<b>Time (minutes) – End</b>	15 ± 2	21 ± 6 <sup>b1</sup>	22 ± 5 <sup>a</sup>	13 ± 2	<0.05
<b>Maximum average speed</b>					
<b>(m/min) – Beginning</b>	17 ± 3	17 ± 4	20 ± 4	15 ± 2	0.090
<b>Maximum average speed</b>					
<b>(m/min) – End</b>	19 ± 2	25 ± 7 <sup>b2</sup>	26 ± 6 <sup>b3</sup>	17 ± 2	<0.05

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation (p <0.05). Significant differences are represented by letter: a. vs AS (p=0.006) and CS (p=0.031) groups, b. vs AS group (b1 p=0.017; b2 p=0.020; b3 p=0.014; ANOVA followed by Tukey test).



**Table 3 - Mean exhaustion test and maximum speed values at the beginning and end of the experiment**

<b>Groups</b>	<b>Exhaustion time (min) – Beginning</b>	<b>Exhaustion time (min) – Final</b>	<b>p</b>
<b>CS (n=6)</b>	13 ± 3	15 ± 2	0.193
<b>CE (n=6)</b>	14 ± 4	21 ± 6	0.010
<b>AE (n=6)</b>	16 ± 4	22 ± 5	0.034
<b>AS (n=6)</b>	11 ± 2	13 ± 2	0.086
	<b>Maximum speed</b>	<b>Maximum speed</b>	
	<b>(m/min) – Beginning</b>	<b>(m/min) – End</b>	
<b>CS (n=6)</b>	17 ± 3	19 ± 2	0.185
<b>CE (n=6)</b>	17 ± 4	25 ± 7	0.005
<b>AE (n=6)</b>	20 ± 4	26 ± 6	0,048
<b>AS (n=6)</b>	15 ± 2	17 ± 2	0,175

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference (p <0.05). Significant differences are represented by the letter: a. vs CS group (paired Student t-test).

**Table 4 - Parameters assessed in the nucleus of hepatocytes**

Parameters	Groups				p
	CS (n=6)	CE (n=6)	AE (n=6)	AS (n=6)	
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	42.2 $\pm$ 4.1	45.7 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	41.8 $\pm$ 4.5	41.5 $\pm$ 5.2	<0.05
Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	23.0 (22.0 – 23.9)	22.6 (21.9 – 23.3)	22.4 (22.0 – 23.7)	22.1 (21.4 – 23.6)	0.537
<b>Maximum diameter</b>					
( $\mu\text{m}$ )	9.3 (8.8 – 9.9)	8.9 (8.6 – 9.4)	8.9 (8.3 – 9.4)	9.4 (8.9 – 9.4)	0.878
<b>Minimum diameter</b>					
( $\mu\text{m}$ )	5.6 (5.1 – 5.7)	5.7 (5.2 – 5.8)	5.6 (5.2 – 5.8)	5.7 (5.2 – 6.0)	0.613
<b>Form Factor</b>	0.983 (0.982 – 0.988)	0.981 (0.783 – 0.984) <sup>b</sup>	0.985 (0.983 – 0.989)	0.983 (0.977 – 0.987)	0.044

CS = sedentary control (no alcohol), CE = control exercise (no alcohol), AE = alcohol exercise, AS = sedentary alcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference (p <0.05). Significant differences are represented by the letters: a. vs AE (p=0,026) and AS groups (p=0,047), b. vs AE group (ANOVA followed by Tukey test).

**Table 5 - Parameters evaluated in the cytoplasm of hepatocytes**

Parameters	Groups				p
	CS (n=6)	CE (n=6)	AE (n=6)	AS (n=6)	
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	327 $\pm$ 41	326 $\pm$ 33	288 $\pm$ 25	320 $\pm$ 29	0.152
Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	76.2 $\pm$ 1.9	79.0 $\pm$ 3.9	74.9 $\pm$ 4.3	77.6 $\pm$ 3.6	0.263
Maximum diameter ( $\mu\text{m}$ )	29.8 $\pm$ 2.3	27.7 $\pm$ 1.2	26.6 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	28.0 $\pm$ 1.6	0.027
Minimum diameter ( $\mu\text{m}$ )	21.2 $\pm$ 1.8	22.7 $\pm$ 1.3	21.4 $\pm$ 1.3	21.7 $\pm$ 0.8	0.264
Form Factor	1.44 (1.34 – 1.57)	1.53 (1.49 – 1.57)	1.56 (1.49 – 1.58)	1.49 (1.48 – 1.52)	0.331

CS = sedentary control (no alcohol), CE = control exercise (no alcohol), AE = alcohol exercise, AS = sedentary alcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference ( $p < 0.05$ ). Significant differences are represented by the letters: a. vs CS ( $p=0,026$ ) and AS groups ( $p=0,047$ ) (ANOVA followed by Tukey test).

## **TABLE LEGENDS**

### **TABLE 1**

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation ( $p < 0.05$ ). Significant differences are represented by letter: a. vs. Initial weight ( $p = 0.002$  a1; a2  $p = 0.003$ ;  $p = 0.012$  a3; a4  $p = 0.026$ , ANOVA followed by Tukey test).

### **TABLE 2**

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation ( $p < 0.05$ ). Significant differences are represented by letter: a. vs AS ( $p=0.006$ ) and CS ( $p=0.031$ ) groups, b. vs AS group (b1  $p=0.017$ ; b2  $p=0.020$ ; b3  $p=0.014$ ; ANOVA followed by Tukey test).

### **TABLE 3**

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference ( $p < 0.05$ ). Significant differences are represented by the letter: a. vs CS group (paired Student t-test).

### **TABLE 4**

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference ( $p$

<0.05). Significant differences are represented by the letters: a. vs AE (p=0,026) and AS groups (p=0,047), b. vs AE group (ANOVA followed by Tukey test).

#### **TABLE 5**

CS = sedentarycontrol (no alcohol), CE = controlexercise (no alcohol), AE = alcoholexercise, AS = sedentaryalcohol. Area: Data presented as mean and standard deviation, the form factor data presented as median and interquartile difference (p <0.05). Significant differences are represented by the letters: a. vs CS (p=0,026) and AS groups (p=0,047 (ANOVA followed by Tukey test).

## CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro estudo de revisão demonstrou que a ingestão crônica de álcool causa danos tóxicos diretos e indiretos ao aumentar o estresse oxidativo, reduzir os níveis de antioxidantes não-enzimáticos, reduzir a relação NAD<sup>+</sup>/NADH, alterar a função mitocondrial, aumentar a peroxidação lipídica e aumentar a produção de acetaldeído. Por outro lado, os exercícios podem ser uma terapia útil para melhorar a performance e capacidade funcional em indivíduos com doença hepática, podendo ter alguma influência positiva direta, além da simples modificação dos níveis de gordura no fígado. Parece também que a intensidade da atividade física é importante para prevenir a progressão da doença, porém mais estudos são necessários para definir se o exercício físico pode restaurar a saúde hepática e qual seria a quantidade e o tipo de exercício necessários.

O principal achado do segundo estudo foi a maior área nuclear dos hepatócitos no grupo controle exercitado comparada a ambos os grupos tratados com álcool. Degeneração hepática gordurosa inicial também foi observada nos animais tratados com álcool, sem melhora do padrão histopatológico nos animais que praticaram atividade física. A análise morfométrica nuclear hepatocitária demonstrou que o grupo CE apresentou área nuclear significativamente maior do que a área nuclear dos grupos AS e AE e fator forma significativamente menor do que no grupo AE. Portanto, os resultados apresentados pelo segundo estudo evidenciaram que o treinamento físico aeróbico realizado por duas semanas não foi suficiente para suprimir as alterações histopatológicas do fígado causadas pelo uso crônico de álcool em ratos *Wistar*. No entanto, esses dados não excluem os benefícios hepáticos da atividade física aeróbica, uma vez que o uso crônico do álcool parece ter minimizado o efeito benéfico do treinamento físico na área do núcleo dos hepatócitos. Além disso, a presença de esteatose hepática foi mais pronunciada nos animais que receberam álcool por gavagem em comparação aos que não fizeram uso dessa substância, confirmando os efeitos já descritos do álcool no fígado.

Os resultados encontrados nessa dissertação evidenciam que a Doença Hepática Alcolólica contribui significativa para a carga global de morbimortalidade, sendo a cessação do uso de álcool sua principal terapêutica. Porém, mesmo com a interrupção do uso de álcool, uma vez que lesões mais graves aparecem e, em alguns casos lesões mais leves como a esteatose, a doença continua sua progressão. Portanto, terapêuticas

coadjuvantes em seu tratamento precisam ser investigadas. O exercício físico tem sido correlacionado com benefícios na histologia e função hepáticas tanto por reduzir a gordura hepática, quanto por efeitos diretos, havendo necessidade de mais estudos. Nosso experimento não conseguiu demonstrar supressão das alterações hepáticas causadas pelo uso crônico de álcool pelo treinamento físico, mas sugeriu que o álcool minimizou o efeito do álcool na área do núcleo. É possível que uma duração maior do treinamento físico seja necessária para demonstrar benefícios, levando a perspectiva de novo experimento, aperfeiçoando o protocolo de exercício físico e controle das limitações identificadas.

# **Anexo A**

**Aprovação do projeto pela  
Comissão de Ética no Uso de  
Animais (CEUA) da Universidade  
Federal de Viçosa (UFV)**



## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo n.º 42/2013, intitulado “Alterações metabólicas provocadas pelo exercício físico durante o processo de abstinência alcoólica em ratos Wistar adultos”, coordenado pela professora, Luciana Moreira Lima do Departamento de Medicina e Enfermagem, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 28/08/2013, com validade de 12 meses.

## CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 42/2013, named “Metabolic changes caused by exercise during withdrawal of alcohol in Wistar rats” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory of Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on August 28, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca  
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV

Viçosa, 28 de agosto de 2013

Ilmo(a). Sr(a).  
Luciana Moreira Lima  
Coordenadora do Projeto  
DEM/UFV


Sr(a). Coordenadora,

“Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “Alterações metabólicas provocadas pelo exercício físico durante o processo de abstinência alcoólica em ratos Wistar”, aqui nomeado Processo 42/2013, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, baseado nas Normas para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT, no Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, nas Normas da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e a legislação vigente.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

1. Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV:
2. Metodologia completa obrigatoriamente com:
  - Local (is) Geral e específico oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
  - O nome científico do animal em questão;
  - Número Total de Animais Utilizados na Pesquisa.
3. Resultados:
4. Nome do Coordenador do Projeto:  
Assinatura:
5. Nome do Responsável Técnico:  
Assinatura:  
Inscrição em CRMV:

  
Prof. Cláudio César Fonseca  
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV

# **Anexo B**

## **Comprovantes de Submissão dos**

### **Artigos**

---

## RMMG - Artigo Submetido

---

De: [sgp@sgponline.com.br](mailto:sgp@sgponline.com.br)  
Enviada: sexta-feira, 3 de junho de 2016 10:51:04  
Para: [lucca\\_marina@hotmail.com](mailto:lucca_marina@hotmail.com)

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) Marina Silva de Lucca

Referente ao código de fluxo: 445  
Classificação: ARTIGO DE REVISÃO

Comunicamos o recebimento do manuscrito "Interações entre exercício físico, álcool e fígado", que será enviado para apreciação pelo Corpo Editorial da RMMG para possível publicação na(o) Revista Médica de Minas Gerais.

Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número do código de fluxo apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) Revista Médica de Minas Gerais

Dados de Acesso  
Usuário: [lucca\\_marina@hotmail.com](mailto:lucca_marina@hotmail.com)  
Senha: 9815002msl

Atenciosamente,

Maria Piedade Fernandes Ribeiro Leite  
Editor Administrativo

Revista Médica de Minas Gerais – Faculdade de Medicina da UFMG  
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 – Sala 12. CEP 30130-100  
Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: 55-31-3409-9796

«« Favor não responder esta mensagem, pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»»

## Alcoholism: Clinical and Experimental Research - message regarding ACER-16-2847

Alcoholism: Clinical and Experimental Research

sex: 30/09/2016 17:57

From: lucca\_marina@hotmail.com - lucca\_marina@hotmail.com >;

1 anexos (54 KB)

Attached file: de-Lucca-2847-Manuscript-093016.docx;

30-Sep-2016

ACER-16-2847 - Hepatocytes morphometry after chronic use of alcohol and exercise training in rats

Dear Prof. de Lucca:

Your manuscript submission has now been processed by the Editorial Office and will soon be assigned to a Field Editor.

I have fixed some of the formatting of your manuscript and have attached the updated version, here. As this is the version that will be sent to the Field Editor, please use it to make any revisions requested by the Field Editor and/or Reviewers following their review.

Best regards,  
Lisa Daitch  
Associate Managing Editor  
Alcoholism: Clinical and Experimental Research

# **Anexo C**

## **Folha de Produtividade**

## MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

	
Universidade Federal de Viçosa Departamento de Educação Física	Universidade Federal de Juiz de Fora Faculdade de Educação Física e Desportos

### FOLHA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO CURSO

#### 1. PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Não há

#### 2. PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS ACEITOS EM PERIÓDICOS

Não há

#### 3. PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS

AUTORES: Marina Silva de Lucca, Eveline Torres Pereira, Luciana Moreira Lima.

**TÍTULO:** Interações entre exercício físico, álcool e fígado

REVISTA: *Revista Médica de Minas Gerais*

Origem:

Trabalho originário de disciplina do mestrado: EFI 792

Trabalho originário do texto da dissertação.

Trabalho originário de outras parcerias

AUTORES: Marina Silva de Lucca, Eveline Torres Pereira, Thamires Righi, Camilo Amaro de Carvalho, Clayton Israel Nogueira, Daise Nunes Queiroz da Cunha, Antônio José Natali, Luciana Moreira Lima

**TÍTULO: Hepatocytes morphometry after chronic use of alcohol and exercise training in rats**

REVISTA: *Alcoholis: Clinical & Experimental Research*.

Origem:

Trabalho originário de disciplina do mestrado: EFI 616

Trabalho originário do texto da dissertação.

Trabalho originário de outras parcerias

AUTORES: Bruno David Henriques, Amanda Márcia dos Santos Reinaldo, Lilian Fernandes Arial Ayres, Marina Silva de Lucca, Regina Lunardi Rocha.

**TÍTULO: Uso de crack e outras drogas: percepção familiar em relação à rede de suporte em um centro de referência.**

REVISTA: *Revista Ciência e Saúde Coletiva*

Origem:

Trabalho originário de disciplina do mestrado: EFI 616

Trabalho originário do texto da dissertação.

Trabalho originário de outras parcerias

AUTORES: Bruno David Henriques, Amanda Márcia dos Santos Reinaldo, Lilian Fernandes Arial Ayres, Marina Silva de Lucca, Regina Lunardi Rocha.

**TÍTULO: Análise compreensiva do significado dado pelos pais e responsáveis às ações do poder público em relação ao uso de crack e outras drogas pelo filho.**

REVISTA: *Revista Médica de Minas Gerais*

Origem:

Trabalho originário de disciplina do mestrado: EFI 616

Trabalho originário do texto da dissertação.

Trabalho originário de outras parcerias



AUTORES: Bruno David Henriques, Amanda Márcia dos Santos Reinaldo, Lilian Fernandes Arial Ayres, Marina Silva de Lucca, Tiago Ricardo Moreira, Regina Lunardi Rocha.

**TÍTULO: O uso de crack e outras drogas por crianças e adolescentes e suas repercussões no ambiente familiar.**

REVISTA: *Revista de Enfermagem Anna Nery*.

Origem:

Trabalho originário de disciplina do mestrado: EFI 616

Trabalho originário do texto da dissertação.

Trabalho originário de outras parcerias

#### **4. LIVROS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

Não há

#### **5. PARTICIPAÇÃO EM CAPÍTULO DE LIVROS PUBLICADOS**

Não há

#### **6. PARTICIPAÇÃO EM JORNAIS DE NOTÍCIAS OU REVISTAS**

Não há

#### **7. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS, SEMINÁRIOS, CURSOS, SIMPÓSIOS COMO PALESTRANTE**

Não há

## 8. RESUMOS ENVIADOS PARA CONGRESSOS – aceitos

**PÔSTER:** Uso crônico de álcool, Treinamento Físico e DHA

**EVENTO:** XXXIV Congresso Brasileiro de Psiquiatria

**PÔSTER:** Esquizofrenia de início tardio ou muito tardio

**EVENTO:** XXXIV Congresso Brasileiro de Psiquiatria

**PÔSTER:** Insight e esquizofrenia: breve revisão de conceito

**EVENTO:** XXXIV Congresso Brasileiro de Psiquiatria

**APRESENTAÇÃO ORAL:** Histologia Hepática após uso crônico de álcool e treinamento físico em ratos *Wistar*.

**EVENTO:** XV Semana Brasileira do Aparelho Digestivo – SBAD 2016

**PÔSTER:** Interações entre exercício físico, álcool e fígado

**EVENTO:** XV Semana Brasileira do Aparelho Digestivo – SBAD 2016

## 9. VISITAS TÉCNICAS, INTERCÂMBIOS OU ESTÁGIOS

Não há

## 10. ORIENTAÇÕES

Orientação de bolsista de extensão universitária na UFV – 2 alunos

Orientação de estagiário voluntário da UFV – 1 aluno

## 11. PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Banca de seleção de monitores no Departamento de Medicina e Enfermagem :

1) 08/04/2016

O Chefe do Departamento de Medicina e Enfermagem, da Universidade Federal de Viçosa, no uso de suas atribuições, conferidas pela Portaria Nº 0581/2015/RTR, de 19/06/2015, resolve 1. Reconhecer a banca formada pelos professores LEANDRO DAVID WENCESLAU, matrícula 11408-1/UFV, ALEX FABRÍCIO DE OLIVEIRA, matrícula 12075-8/UFV e MARINA SILVA DE LUCCA, matrícula 11067-1/UFV, para, sob a presidência do primeiro, comporem a Banca Examinadora de Concurso para seleção de 6 (seis) Monitores Voluntários, Nível I, para atuarem nas disciplinas MED 291- Prática profissional e saúde III e MED 292- Prática Profissional e saúde IV Eixo: Comunicação clínica e raciocínio clínico epidemiológico, no 1º período letivo de 2016.

2) 04/07/2016

O Chefe do Departamento de Medicina e Enfermagem, da Universidade Federal de Viçosa, no uso de suas atribuições, conferidas pela Portaria N° 0581/2015/RTR, de 19/06/2015, resolve 1. Reconhecer a banca formada pelos professores LEANDRO DAVID WENCESLAU, matrícula 11408-1/UFV, ALEX FABRÍCIO DE OLIVEIRA, matrícula 12075-8/UFV e MARINA SILVA DE LUCCA, matrícula 11067-1/UFV, para, sob a presidência do primeiro, comporem a Banca Examinadora de Concurso para seleção de 1 (um) Monitores Bolsista, Nível I, para atuarem nas disciplinas MED 291- Prática profissional e saúde III e MED 292- Prática Profissional e saúde IV Eixo: Comunicação clínica e raciocínio clínico epidemiológico, no 1º período letivo de 2016.

3) 27/03/2015

Reconhecer a banca formada pelos professores LEANDRO DAVID WENCESLAU, matrícula 11408-1/UFV, DÉBORA FERREIRA DE CARVALHO, matrícula 11069-8/UFV e MARINA SILVA DE LUCCA, matrícula 11067-1/UFV, para, sob a presidência do primeiro, comporem a Banca Examinadora de Concurso para seleção de 1 (um) Monitor Bolsista, Nível I, para atuar nas disciplinas MED 291 – Prática Profissional e Trabalho em Saúde III e MED 292 – Prática Profissional e Trabalho em Saúde IV, no 1º período letivo de 2015.

4) 27/03/2015

Reconhecer a banca formada pelos professores LEANDRO DAVID WENCESLAU, matrícula 11408-1/UFV, DÉBORA FERREIRA DE CARVALHO, matrícula 11069-8/UFV e MARINA SILVA DE LUCCA, matrícula 11067-1/UFV, para, sob a presidência do primeiro, comporem a Banca Examinadora de Concurso para seleção de 5 (cinco) Monitores Voluntários, Nível I, para atuarem nas disciplinas MED 291 – Prática Profissional e Trabalho em Saúde III e MED 292 – Prática Profissional e Trabalho em Saúde IV, no 1º período letivo de 2015.

**12. AULAS MINISTRADAS DE GRADUAÇÃO NA UFV**

<b>Código</b>	<b>Disciplina</b>	<b>Ano</b>	<b>Sem.</b>	<b>Alunos</b>	<b>Teóricas</b>	<b>Práticas</b>
<u>MED</u> <u>192</u>	PRÁTICA PROFISSIONAL E TRABALHO EM SAÚDE II	2014	2	24	2	76
<u>MED</u> <u>222</u>	MECANISMOS BÁSICOS DO PROCESSO SAÚDE-DOENÇA II	2014	2	48	0	140
<u>MED</u> <u>292</u>	PRÁTICA PROFISSIONAL E TRABALHO EM SAÚDE IV	2014	2	48	1	120
<u>MED</u> <u>351</u>	CUIDADO INTEGRAL À SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE II	2014	2	30	4	0
<u>MED</u> <u>362</u>	CUIDADO INTEGRAL À SAÚDE DO ADULTO E DO IDOSO II	2014	2	46	13	0
<u>MED</u> <u>394</u>	PRÁTICA PROFISSIONAL E TRABALHO EM SAÚDE VIII	2014	2	44	0	4
<b>Disciplinas : 6</b>		<b>Horas lecionadas : 360</b>		<b>Alunos : 240</b>		